



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Memòria de tesi presentada per:**

Ignasi Esteban Riera

**Per a optar al grau de:**

Doctor en Immunologia

**Títol de la Tesi:**

Estudi de l'activitat biològica i antitumoral d'un nou agonista sintètic dels limfòcits iNKT.

**Director de la Tesi:**

Doctor Ángel Raúl Castaño García, professor agregat de la Universitat Autònoma de Barcelona i cap del grup d'Immunologia Molecular de l'institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

**Doctorand**

**Director**

**Ignasi Esteban Riera**

**Dr. Ángel Raúl Castaño García**

Bellaterra, Novembre del 2017



## ABREVIATURES

AHR: *Airway hyperresponsiveness*

APC: *Antigen-presenting cell*

ApoE: *Apolipoproteína E*

$\beta_2m$ : *Beta-2 microglobulin*

CDR: *Complementarity-determining regions*

CMFDA: *5-chloromethylfluorescein diacetate*

DAMP: *Damage-associated molecular pattern*

DC: *Dendritic cell*

DC-SIGN: *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

DP: *double positive*

EAE: *Experimental autoimmune encephalomyelitis*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*

GalCer: *Galactosylceramide*

GlcCer: *Glucosylceramide*

ICAM: *Intercellular adhesion molecule*

IFN: *Interferon*

IGb3: *Isoglobotrihexosylceramide*

IL: *Interleukin*

NKT: *Natural killer T*

LDL-R: *Low-density lipoprotein receptor*

LFA: *Lymphocyte function-associated antigen*

LysoPC: *Lysophosphatidylcholine*

MHC: *Major histocompatibility complex*

MO: *Medulla òssia*

M $\phi$ : *Macròfag*

MTTP: *Microsomal triglyceride transfer protein*

MZ: *Marginal zone*

NK: *Natural killer*

NOD: *Non-obese diabetic*

OVA: *Ovalbumin*

PALS: *Periarteriolar lymphoid sheaths*

PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell*

PMN: *Leucòcit polimorfonuclear*

PRR: *Pattern recognition receptor*

RE: *Reticle endoplasmàtic*

SCID: *Severe combined immunodeficiency*

SLAM: *Signaling lymphocytic activation molecule*

TAP: *Transporter associated with antigen processing*

TCR: *T-cell receptor*

TGF: *Transforming growth factor*

TNF: *Tumor necrosis factor*



## INDEX

RESUM	9
1.INTRODUCCIÓ	11
• <u>1.2.Descobrimet de les cèl·lules iNKT</u>	11
• 1.3. Les cèl·lules NKT	14
○ 1.3.1 Grups d'NKT	14
○ 1.3.2 El TCR $\alpha\beta$	14
○ 1.3.3 NKTs de tipus I o NKTs invariants	15
○ 1.3.4 NKTs de tipus II	15
• <u>1.4. Presentació d'Antigen per CD1d i reconeixement a través del TCR semi-invariant</u>	16
○ 1.4.1 La família de CD1	16
○ 1.4.2 El CD1d	17
○ 1.4.3 Expressió i distribució de CD1d en l'organisme	19
○ 1.4.4 Obtenció d'antígens de CD1d per l'APC	19
○ 1.4.5 Tràfic intracel·lular i càrrega de CD1d amb l'antigen	20
○ 1.4.6 Reconeixement de CD1d i antigen per el TCR semi-invariant	22
• <u>1.5. Desenvolupament de les cèl·lules iNKT</u>	24
• <u>1.6. Distribució de les cèl·lules iNKT en la perifèria</u>	26
• <u>1.7. Subpoblacions d'iNKT</u>	27
○ 1.7.1 NKT1 i NKT2	28
○ 1.7.2 NKT17	28
• <u>1.8. Activació de les iNKT</u>	29
○ 1.8.1 Activació a través del TCR	29
○ 1.8.2 Activació independent del TCR	31
○ 1.8.3 Integració de les senyals activadores	31
• <u>1.9. Resposta a l'Activació</u>	33
○ 1.9.1 Resposta de la cèl·lula iNKT a l'activació	33
○ 1.9.2 Interacció de les cèl·lules iNKT amb altres cèl·lules del sistema immune	34
• <u>1.10. Les cèl·lules iNKT en la resposta antitumoral</u>	35
• <u>1.11. Aplicacions terapèutiques de l'<math>\alpha</math>GalCer</u>	38

• <u>1.12. Anàlegs sintètics de l'αGalCer</u>	38
• <u>1.13. Anàlegs aminociclitols de l'αGalCer</u>	42
2.HIPÒTESI I OBJECTIUS	45
3.ANIMALS, MOSTRES, MATERIALS Y MÈTODES	47
• <u>3.1 αGalCer, anàlegs aminociclitols i manipulació</u>	47
• <u>3.2 Animals i manutenció</u>	47
• <u>3.3 Mostres de sang perifèrica humana</u>	48
• <u>3.4 Processament dels teixits de ratolí i obtenció de leucòcits</u>	48
○ 3.4.1 Peritoneu	48
○ 3.4.2 Melsa	48
○ 3.4.3 Medul·la Òssia	48
○ 3.4.4 Sang	49
○ 3.4.4.1 Leucòcits	49
○ 3.4.4.1 Sèrum	49
• <u>3.5 Processament de sang perifèrica humana</u>	49
• <u>3.6 Línies cel·lulars i models tumorals utilitzats</u>	50
• <u>3.7 Cultiu de les línies cel·lulars</u>	51
• <u>3.8 Assajos <i>in vitro</i> de presentació amb hibridomes</u>	51
• <u>3.9 Citometria de flux</u>	52
○ 3.9.1. Anticossos utilitzats	52
○ 3.9.2. Tetràmers utilitzats	53
○ 3.9.3. Protocol de citometria de flux	53
• <u>3.10. ELISA</u>	54
○ 3.10.1. Protocol d'ELISA	54
• <u>3.11 Generació d'una línia RMA deficient en CD1d</u>	55
• <u>3.12 Expansió <i>in vitro</i> de les cèl·lules iNKT humanes</u>	55
• <u>3.13. Quantificació de citocines i quimiocines <i>in vivo</i></u>	56
• <u>3.14. Activació i polarització <i>in vivo</i></u>	57
• <u>3.15. Mobilització i expansió cel·lular <i>in vivo</i></u>	57

• <u>3.16. Supervivència enfront la línia tumoral RMA i derivades</u>	58
• <u>3.17. Citotoxicitat <i>in vivo</i> contra la línia tumoral RMA i derivades</u>	58
○ 3.17.1. Protocol de marcatge amb CMFDA	59
○ 3.17.2. Depleció de cèl·lules efectores	59
○ 3.17.3. Citotoxicitat amb bloqueig de CD1d	59
• <u>3.18 Vacunació terapèutica enfront el model tumoral EG-7</u>	60
• <u>3.19. Vacunació terapèutica amb cèl·lules necròtiques contra el model tumoral RMA</u>	60
• <u>3.20. Eliminació de cèl·lules B endògenes amb activació d'iNKTs</u>	60
• <u>3.21. Supervivència enfront el model tumoral E<math>\mu</math>-myc amb anti-CD20 i activació iNKT</u>	61
4. RESULTATS	64
• <u>4.1. Els anàlegs sintètics són reconeguts i activen hibridomes iNKT</u>	64
• <u>4.2. Els anàlegs sintètics indueixen la producció de citocines i quimiocines <i>in vivo</i></u>	67
• <u>4.3. Els anàlegs sintètics indueixen l'expansió de les cèl·lules iNKT humanes</u>	69
• <u>4.4. Activació cel·lular en resposta a l'AC11: l'<math>\alpha</math>GalCer i l'AC11 produeixen cinètiques d'activació <i>in vivo</i> diferents</u>	72
• <u>4.5. L'AC11 indueix l'expansió i activació <i>in vivo</i> de diverses poblacions de cèl·lules del sistema immune</u>	75
○ 4.5.1. L'AC11 genera una major expansió de les cèl·lules iNKT que l' $\alpha$ GalCer.	75
○ 4.5.2. L'AC11 genera un augment en el nombre total de cèl·lules de la melsa i el peritoneu.	77
○ 4.5.3. L'AC11 indueix una major activació de les cèl·lules B i de les dendrítiques en la melsa i la MO	78
• <u>4.6. La via d'administració modifica la resposta de l'<math>\alpha</math>GalCer i de l'AC11 en el peritoneu</u>	81
• <u>4.7. Resposta antitumoral: l'AC11 incrementa la supervivència enfront la línia tumoral RMA</u>	83
• <u>4.8. Citotoxicitat <i>in vivo</i> enfront la línia tumoral RMA</u>	85



○ 4.8.1. La resposta citotòxica de l'AC11 i l'αGalCer implica un increment en el nombre total de diverses poblacions de cèl·lules efectores	87
○ 4.8.2. Paper de les cèl·lules efectores en la resposta antitumoral: diferències qualitatives entre els dos agonistes	89
○ 4.8.2.1. Eliminació de les cèl·lules natural killer (NK)	90
○ 4.8.2.2. Eliminació dels macròfags (MØ)	91
○ 4.8.2.3. Eliminació dels neutròfils (PMN)	93
○ 4.8.2.4. Eliminació dels limfòcits T-CD8	94
○ 4.8.2.5. Citotoxicitat <i>in vivo</i> amb bloqueig/eliminació del CD1d en les cèl·lules tumorals	96
● <u>4.9. Inducció d'una resposta adaptativa: acció adjuvant de l'AC11</u>	100
● <u>4.10. Vacunació amb cèl·lules necròtiques i agonistes iNKT</u>	103
● <u>4.11. Aplicació terapèutica de les iNKT en el tractament de limfoma B amb anti-CD20</u>	105
○ 4.11.1. Sinèrgia dels activadors iNKT en l'efecte deplecionant de l'anti-CD20 sobre els limfòcits B	106
○ 4.11.2. Tractament combinat amb agonistes iNKT i anticòs anti-CD20 en un model de limfoma no-Hodgkin	109
 5. DISCUSSIÓ	 113
● <u>5.1. Anàlegs aminociclitols: activitat <i>in vitro</i></u>	113
● <u>5.2. AC11: resposta <i>in vivo</i></u>	115
● <u>5.3. AC11: resposta antitumoral</u>	121
● <u>5.4. AC11: Vacunació antitumoral</u>	127
● <u>5.5. AC11: teràpia combinada amb anti-CD20</u>	129
 6. CONCLUSIONS	 133
 7. BIBLIOGRAFIA	 135

## RESUM

Les cèl·lules iNKT són una subpoblació de limfòcits T que mostren característiques pròpies tant de les cèl·lules del sistema immune innat com de l'adaptatiu, i per aquest motiu es considera que constitueixen un pont entre els dos sistemes. S'identifiquen per expressar un TCR semi-invariant (iTCR) que reconeix el glicolípid  $\alpha$ -galactosilceramide (aGalCer) i altres antígens de naturalesa lipídica presentats per CD1d. Tot i la gran conservació estructural en el reconeixement del CD1d, la resposta de les iNKT contra un antigen determinat pot ser molt variable en funció de les característiques físico-químiques d'aquest, podent generar respostes quantitativa i qualitativament molt diferents amb una gran capacitat per modular l'activació de tot el sistema immune. Aquesta darrera característica ha fet que les cèl·lules iNKT siguin objecte d'estudi important per molts investigadors, que han centrat esforços en trobar reactius que permetin manipular l'activació de les iNKT i poder-los aplicar en el tractament de patologies en les que hi ha una implicació rellevant del sistema immune.

En aquest treball s'ha estudiat l'activitat biològica i antitumoral d'un nou anàleg sintètic de l' $\alpha$ GalCer, anomenat AC11, amb una estructura més hidrofòbica i resistent a la degradació enzimàtica. Primerament s'ha descrit la seva capacitat per a ser reconegut i estimular a les cèl·lules iNKT tant de ratolí com d'humà *in vitro*. Després, utilitzant un model *in vivo* de ratolí s'ha descrit la capacitat de l'AC11 per induir una resposta de citocines i quimiocines totalment polaritzada cap a Th1, en contrast amb la resposta de tipus Th0 que indueix l' $\alpha$ GalCer. També s'han estudiat els efectes de l'administració *in vivo* d'aquest compost en l'activació i expansió de diversos tipus de cèl·lules del sistema immune, en diferents òrgans i a diferents temps, veient que l'AC11 produeix una expansió més gran i prolongada que l' $\alpha$ GalCer de cèl·lules limfoides i mieloides. A més, s'ha comprovat la capacitat de l'AC11 per induir una forta resposta anti-tumoral contra el model de tumor hematològic transplantable de ratolí RMA, demostrant que aquest nou anàleg és més eficaç i potent que l' $\alpha$ GalCer, provocant una resposta quantitativa i qualitativament diferent. També s'ha estudiat la capacitat de l'AC11 per a actuar com a adjuvant en la generació d'una resposta específica antitumoral, tant en la vacunació contra un únic antigen proteic (ovoalbúmina) com en la vacunació contra múltiples

antígens (cèl·lules necròtiques), veient que aquest agonista és capaç d'induir una resposta antitumoral específica. Finalment s'ha analitzat la viabilitat d'una nova teràpia que utilitza l'activació del sistema immune produïda per els agonistes iNKT per incrementar els efectes depleccionants d'un anticòs anti-CD20, i encara que per diversos motius no s'ha mostrat efectiu en el tractament d'un limfoma B, si que ha estat capaç d'augmentar l'acció eliminadora de l'anticòs sobre les cèl·lules B.

En conclusió, el compost AC11 presenta moltes característiques que el fan de gran interès com a potencial agent en tractaments anti-tumorals.

### 1. INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules iNKT (invariant natural killer T cells) són una subpoblació de limfòcits T especialitzada en el reconeixement d'antígens lipídics presentats per CD1d. Mostren característiques pròpies tant de les cèl·lules del sistema immune innat com de les cèl·lules del sistema immune adaptatiu. De la mateixa manera que les cèl·lules T convencionals, expressen un TCR $\alpha\beta$  format per recombinació somàtica i són seleccionades al Tim. Però a diferència de les cèl·lules T convencionals, les iNKT quan abandonen el Tim ja presenten un fenotip pre-activat de memòria que els hi permet respondre ràpida i massivament als agonistes, senyals de perill i citocines pro inflamatòries, el que es tradueix en la transactivació secundària de multitud de cèl·lules del sistema immune. Per totes aquestes característiques es consideren un pont entre el sistema immune innat i l'adaptatiu. Aquesta naturalesa híbrida i les seves capacitats funcionals fan que s'hagi observat la seva implicació en molts tipus d'estats patològics; càncer, infeccions microbianes, malalties autoimmunitàries o al·lèrgies<sup>1</sup>.

### 1.2. Descobrimet de les cèl·lules iNKT

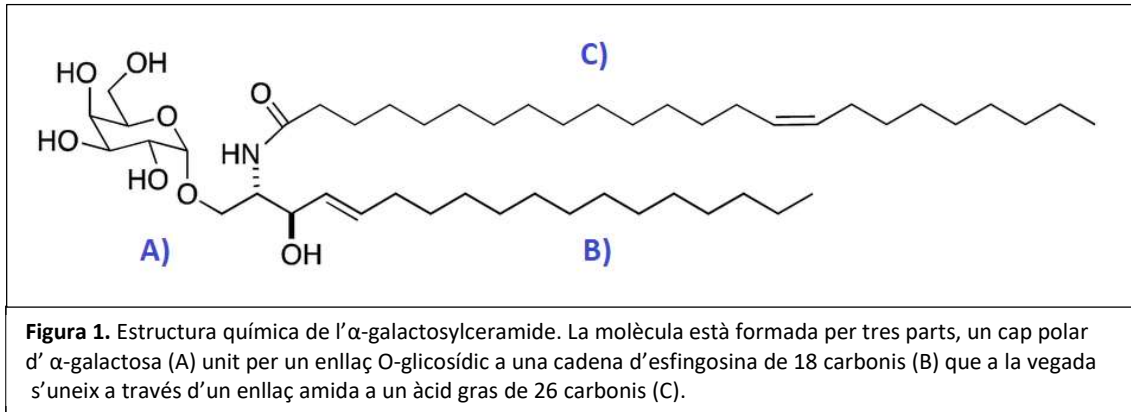
L'any 1987 tres grups van descriure l'existència d'una subpoblació de limfòcits T de ratolí amb una expressió de TCR $\alpha\beta$  més baixa que la de les cèl·lules T convencionals<sup>2-5</sup>. Aquesta nova població era negativa tant per CD4 com per CD8 i el seu TCR mostrava una freqüència de segments V $\beta$ 8 tres vegades superior a la de les T convencionals. Funcionalment es caracteritzaven per ser una font important de citocines immunoreguladores<sup>5,6</sup>. Paral·lelament altres grups van descriure l'existència d'una subpoblació de cèl·lules T que expressava NK1.1, un marcador que fins aleshores es considerava exclusiu de les cèl·lules NK. Dins d'aquesta altre població de cèl·lules T n'hi havia de positives i negatives per CD4, i també expressaven nivells intermedis de TCR amb una preferència per els segments V $\beta$ 8.2. També posseïen una gran capacitat de producció de citocines<sup>6,7</sup>. Ben aviat va quedar clar que tots els estudis es referien mateixa població de limfòcits, definida fenotípicament per l'expressió d'NK1.1 i TCR, i funcionalment per les seves importants propietats immunoreguladores.

Poc després es va comprovar que aquesta població de limfòcits T expressava sempre un TCR amb una cadena  $\alpha$  formada per els segments V $\alpha$ 14 i J $\alpha$ 18<sup>8</sup> reordenats canònicament i aparellada amb una cadena  $\beta$  que contenia els segments V $\beta$ 8.2 o V $\beta$ 2 o V $\beta$ 7, formant el que s'anomena un TCR semi-invariant (iTTCR). Simultàniament es va descriure una població anàloga en humans, però en aquest cas amb la cadena  $\alpha$  del TCR formada per els segments V $\alpha$ 24 i J $\alpha$ 18 i aparellada amb una cadena V $\beta$ 11<sup>8,9</sup>.

Un altre pas important en l'estudi d'aquesta nova població va sorgir de l'observació que el seu desenvolupament era independent d'MHC de classe II, i encara que eren negatives per CD8 si que requerien la presència de  $\beta$ 2-microglobulina<sup>10</sup>. En aquest context l'any 1995 es va publicar un dels treballs clau per entendre la biologia d'aquesta nova població; els limfòcits T NK1.1+ reconeixen CD1<sup>11</sup>.

De manera paral·lela es va a descobrir la funcionalitat de les molècules de la família de CD1. Aquestes van ser descobertes per Cesar Milstein<sup>12,13</sup> que les va descriure com a molècules genètica i estructuralment similars a les molècules d'MHC de classe I, encara que no va ser fins uns anys més tard que es van començar a tenir proves de la seva funcionalitat. Les primeres evidències es van obtenir l'any 1992 quan es va descriure que les molècules de CD1 eren reconegudes per limfòcits doble negatius<sup>14</sup>. L'any 1995 es van publicar 3 treballs fonamentals que descrivien la capacitat de CD1 per a presentar antígens hidrofòbics<sup>15</sup> i lipídics<sup>6,17</sup>, tant en humans com en ratolí. Per tant es tractava d'un tercer grup de molècules presentadores diferent a les clàssiques MHCI i MHCII, que era capaç de presentar un conjunt d'antígens fins al moment "ignorats" per els limfòcits T<sup>8</sup>. Dos anys més tard, l'any 1997, es van publicar dos treballs clau que van propiciar l'explosió de la investigació bàsica i aplicada en aquest camp<sup>19,20</sup>: les cèl·lules T NK1.1+ reconeixien i responien potentment a la presentació a través de CD1d del glicolípid *alfagalactosylceramide* ( $\alpha$ GalCer) (Fig.1). Aquest glicolípid havia estat aïllat i identificat en un *screening* de lípids en una mostra de l'esponja marina *Agelas mauritanus* per la seva activitat antitumoral. Quan les cèl·lules iNKT són activades per el reconeixement de l' $\alpha$ GalCer indueixen una potent resposta antitumoral capaç de controlar l'establiment de metàstasis en un model de melanoma en ratolí. Al mateix temps també

es va determinar l'estructura cristal·logràfica del CD1d de ratolí, permetent explicar la seva capacitat presentadora de lípids <sup>8</sup>.



En aquest punt es va començar a utilitzar de manera imprecisa el terme NKT (Natural Killer T cell) per a referir-se als limfòcits T que expressaven NK1.1, que tenien un TCR Vα14-Jα18 i que reconeixien αGalCer<sup>2</sup>. Aquest terme però generava confusió, ja que en la soca de ratolins C57BL/6 s'havia comprovat que part dels limfòcits T que tenien el TCR Vα14-Jα18 i reconeixien a αGalCer no expressaven NK1.1<sup>2,21</sup>. En altres soques de ratolins també molt utilitzades com BALB/c o CBA, no s'expressava NK1.1 en cap tipus cel·lular, tot i que també s'hi havien identificat poblacions equivalents de limfòcits T amb el TCR Vα14-Jα18 i amb la mateixa reactivitat<sup>1</sup>. Per altre banda també s'havien descrit poblacions de cèl·lules T que expressaven marcadors NK però que no expressaven el TCR invariant, i que per tant eren totalment diferenciables de les cèl·lules descrites. Dins d'aquestes poblacions NKT amb un TCR més divers hi havien tant cèl·lules restringides<sup>22</sup> com no restringides per CD1<sup>23</sup>.

Finalment el desenvolupament dels tetràmers de CD1d carregats amb αGalCer va permetre identificar de manera inequívoca la població de limfòcits T amb el TCR semi-invariant (en ratolí TCR Vα14-Jα18 i en humà Vα24 i Jα18) reactiva a αGalCer<sup>24</sup>, actualment coneguda com a iNKT (*invariant Natural Killer T cell*).

### **1.3. Les cèl·lules NKT**

#### **1.3.1 Grups d'NKT**

El terme NKT defineix una població molt heterogènia de limfòcits madurs que es divideix en tres subpoblacions més o menys definides: NKT de tipus I (iNKT), NKT de tipus II i NKT no restringides per CD1d. Els grups I i II mostren restricció per CD1d, i la classificació en un o altre grup es realitza en base a la diversitat de segments gènics que componen el seu TCR i en la capacitat d'aquest de reconèixer o no  $\alpha$ GalCer<sup>1,25</sup>. El tercer grup és el més heterogeni i menys estudiat, i s'hi inclouen tots aquells limfòcits T amb receptors NK que no responen a la presentació per CD1d<sup>26</sup>, encara que poden reconèixer altres isotips de CD1 o simplement expressar els receptors NK a conseqüència de l'activació.

#### **1.3.2 El TCR $\alpha\beta$**

El TCR $\alpha\beta$  està compost per dues cadenes  $\alpha$  i  $\beta$ , que a la vegada estan formades per dos dominis, un variable (V) i un altre constant (C). En el domini V de cada cadena hi trobem tres regions complementàries (CDR1, CDR2 i CDR3) que juntes formen la zona de contacte amb l'antigen.

El domini V de la cadena  $\alpha$  es forma per l'unió d'un segment gènic V $\alpha$  amb un J $\alpha$ , i el domini variable de la cadena  $\beta$  ho fa per la triple unió dels fragments gènics V $\beta$ , D $\beta$  i J $\beta$ . En les cadenes  $\alpha$  y  $\beta$  les regions CDR1 y CDR2 estan codificades en la línia germinal per el segment V, i el CDR3 en la cadena  $\alpha$  ho està per la recombinació dels segments V i J, i en la cadena  $\beta$  per la recombinació dels segments V, D i J. Diferents combinacions V(D)J juntament amb la inexactitud d'unió dels nucleòtids P i N en l'intersecció dels fragments produeixen una gran variabilitat en la regió CDR3. Aquesta gran variabilitat en les regions CDR genera una immensa quantitat de TCRs amb diferents especificitats<sup>25,27</sup>.

### 1.3.3 NKTs de tipus I o NKTs invariants

Les NKT de tipus I o NKT invariants (iNKT) de ratolí es caracteritzen per expressar un TCR canònic amb una cadena  $\alpha$  invariant composta per els segments V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 (en humans V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18) que s'aparella amb una cadena  $\beta$  que expressa una limitada diversitat de segments V $\beta$  (V $\beta$ 11 en humans, i V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 o V $\beta$ 2 en ratolí)<sup>2,8</sup>. Tot i que per anomenar-les s'utilitza el terme d'NKT invariants degut al seu iTCR, seria més correcte utilitzar el terme de semi-invariants, ja que si que hi ha diversitat en la cadena  $\beta$  del TCR. Funcionalment el iTCR tant en ratolí com en humà, es caracteritza per reconèixer glicolípid restringits per CD1d, en particular el complex CD1d- $\alpha$ GalCer. El reconeixement i resposta a la presentació d' $\alpha$ GalCer caracteritza funcionalment aquestes cèl·lules i en permet la seva identificació inequívoca<sup>19,28,29</sup>.

### 1.3.4 NKTs de tipus II

En contraposició a les NKT de tipus I aquestes mostren una diversitat de TCRs molt més gran i no són capaços de reconèixer  $\alpha$ GalCer<sup>2,30</sup>. En humans les NKT de tipus II són més abundants que les iNKT, però la falta d'un reactiu que permeti la seva identificació específica (com en el cas dels tetràmers de CD1d- $\alpha$ GalCer amb les iNKT) en dificulta molt l'estudi. Es sap que són reactives a fosfolípids i glicolípid. Uns d'aquests antígens són les sulfatides com la 3-O-sulfogalactosylceramide, molt abundant en la mielina del sistema nerviós central<sup>31</sup>. A diferència de les iNKT les NKT de tipus II poden reconèixer glicolípid amb enllaços en posició beta ( $\beta$ GlcCer,  $\beta$ GalCer)<sup>30</sup> i no tenen un TCR invariant, encara que en elles la diversitat de TCRs és més reduïda que en els limfòcits T clàssics.

De la mateixa manera que en el cas de les iNKT, la funció principal d'aquestes cèl·lules també sembla ser la regulació de la resposta immunitària alliberant citocines, però a diferència de les iNKT, que com explicarem més endavant poden ser activades directament a través del TCR o de manera indirecta per citocines, aquestes majoritàriament només ho són a través del TCR<sup>32</sup>.



En diversos estudis s'ha observat la seva implicació com a cèl·lules reguladores en respostes immunes contra tumors i patògens, i també en autoimmunitat i malalties metabòliques<sup>3,34</sup>. En la majoria d'aquests estudis es produeix una funció antagònica de les NKT de tipus II sobre les iNKT, i de manera general s'accepta que juguen un paper contraposat al de les iNKT en la resposta immune, induint una resposta més supressora o reguladora.

### **1.4. Presentació d'antigen per CD1d i reconeixement a través del TCR semi-invariant**

#### **1.4.1 La família de CD1**

Els gens de CD1 mostren una estructura d'introns/exons similars a la que s'observa en l'MHC de classe I, codificant per a una proteïna transmembranal que presenta tres dominis  $\alpha 1, \alpha 2$  i  $\alpha 3$  semblants als del MHC de classe I i que també s'uneix a  $\beta 2$ -microglobulina<sup>12,35</sup>. La comparació de les seqüències primàries demostra que existeix la mateixa similitud genètica tant amb les molècules d'MHC de classe I com amb les molècules d'MHC de classe II, indicant un origen molt antic del CD1 en l'evolució dels vertebrats, possiblement en el mateix moment que es va produir la divergència entre classe I i classe II<sup>36</sup>.

En els humans s'han identificat cinc gens de CD1 localitzats en el cromosoma 1q23: *CD1A*, *CD1B*, *CD1C*, *CD1D* i *CD1E*, que codifiquen per cinc proteïnes; CD1a, CD1b, CD1c, CD1d i CD1e<sup>2,37</sup>. Aquestes isoformes de CD1 es classifiquen en dos grups 1 i 2 en funció de l'homologia de les seqüències del domini  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ; el grup 1 compren les isoformes CD1a, b, c i e, i en el grup 2 només hi trobem el CD1d<sup>38</sup>. Les isoformes CD1a, CD1b, CD1c i CD1d realitzen funcions de presentació a diferents poblacions de cèl·lules T, encara que cadascuna d'elles té unes característiques d'unió a l'antigen, tràfic intracel·lular, distribució i presentació al TCR diferents. L'isoforma CD1e no intervé directament en la presentació, sinó que es localitza majoritàriament en l'Aparell de Golgi i en els lisosomes, realitzant funcions de suport a la presentació d'antígens lipídics<sup>39</sup> d'una manera semblant al paper de DM en la presentació peptídica per MHC de classe II<sup>40</sup>.

Per el contrari en ratolí només trobem dos gens de CD1; *CD1D1* i *CD1D2* que es localitzen en el cromosoma 3<sup>37,41</sup>. L'existència de dos gens de *CD1D* en ratolí és el resultat d'una duplicació recent a partir d'un únic gen original de *CD1D* (en rata trobem un únic gen de CD1). Tot i que aquests dos gens comparteixen un grau molt elevat d'homologia en les seqüències nucleotídiques, únicament el *CD1D1* sembla codificar per una proteïna amb activitat funcional rellevant<sup>42</sup>. En el cas de la soca C57BL/6 a més *CD1D2* té una mutació en el domini  $\alpha 3$  que introdueix un codó de terminació i per tant la proteïna no és funcional.

Un trencament genètic es creu que és el responsable de la desaparició dels gens del grup 1 de CD1 en rosegadors<sup>1,43</sup>. De la mateixa manera que el seu gen ortòleg humà, el *CD1D* de ratolí codifica per el CD1d, dedicat a presentar antígens lipídics a determinades poblacions de cèl·lules T<sup>1</sup>.

Contràriament al gran polimorfisme present en les molècules d'MHC de classe I i II, el polimorfisme en les molècules de CD1 és pràcticament inexistent degut probablement al tipus d'antigen que uneixen, majoritàriament lípids, la unió dels quals es realitza a través d'interaccions hidrofòbiques poc específiques amb les cadenes lipídiques en les quals la variabilitat estructural és molt menor que en el cas de les proteïnes<sup>38</sup>.

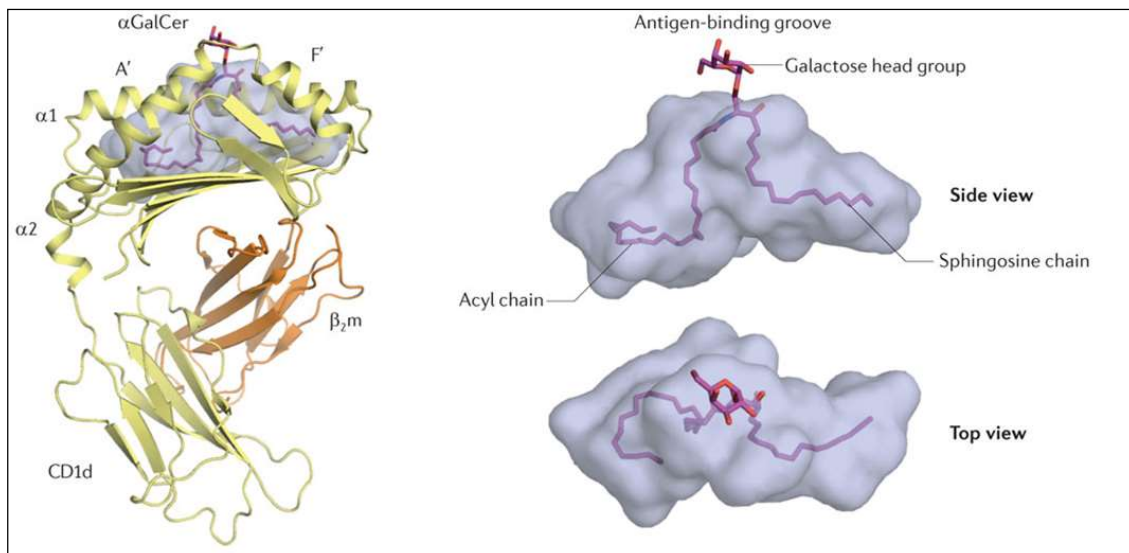
L'absència gairebé total de polimorfisme en el gen del *CD1D* i la gran homologia genètica i estructural entre les molècules de CD1d en diverses espècies de mamífers permeten un fenomen de reactivitat creuada entre espècies<sup>44</sup>. Des d'un punt de vista pràctic aquest fet és especialment rellevant entre humà i ratolí, ja que atorga majors possibilitats translacionals als estudis realitzats amb ratolins<sup>45</sup>.

### 1.4.2 El CD1d

L'estructura cristal·logràfica del CD1d de ratolí va ser la primera estructura de CD1 que es va resoldre<sup>18</sup>. En aquesta s'hi observa una característica fonamental per a la funció presentadora que també es manté en els altres membres de la família de CD1<sup>46</sup>, l'existència d'un lloc d'unió a l'antigen profund que conté múltiples residus hidrofòbics.

Les clàssiques butxaques (*pockets*) de les molècules d'MHC en aquest cas formen dos grans bosses de naturalesa hidrofòbica que creen un ambient ideal per a inserir-hi les llargues cadenes d'hidrocarburs dels antígens lipídics.

L'estructura tridimensional general de CD1d és la típica d'una molècula presentadora de classe I. És un heterodímer format per una cadena pesada d'uns 50KDa que s'uneix de manera no covalent a  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ). La cadena pesada és una glicoproteïna transmembranal de tipus I amb una porció extracel·lular formada per tres dominis ( $\alpha_1, \alpha_2$  i  $\alpha_3$ ) i una cua intracitoplàsmica petita<sup>18,47</sup>. El punt d'unió a l'antigen està situat entre els dominis  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ , formant un canal hidrofòbic que es subdivideix en dos bosses asimètriques anomenades A' i F'<sup>18</sup>. La presència de residus de Phe i Trp en la bossa A', i de Met, Pro, Val, i Leu en la bossa F', unit a la poca presència de aminoàcids capaços de formar ponts d'hidrogen, proporcionen un ambient ideal per a l'acoblament de lípids. La flexibilitat relativa de la que disposen aquests canals possiblement facilita el procés de càrrega<sup>48</sup>. L' $\alpha$ GalCer es posiciona en la molècula de CD1d introduint la cadena d'acil en la bossa A' i la cadena d'esfingosina en la bossa F'. La galactosa queda situada en la part exterior de la molècula on pot establir contacte amb el iTCR<sup>9</sup> (Fig.2).



**Figura 2.** Estructura del CD1d humà unit a  $\alpha$ GalCer. La molècula de CD1d està formada per una cadena pesada (en groc) unida de manera no covalent a  $\beta_2$ -microglobulina (en taronja). El punt d'unió a l'antigen està situat entre els dominis  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  de la cadena pesada, i forma dos bosses hidrofòbiques anomenades A' i F'. L' $\alpha$ GalCer s'uneix al CD1d introduint la cadena d'acil en el canal A' i la cadena d'esfingosina en el canal F'. El cap de galactosa queda situada a l'exterior de la molècula adoptant una orientació semi paral·lela respecte de la superfície del CD1d [Figura extreta de la referència 25].

### 1.4.3 Expressió i distribució de CD1d en l'organisme

CD1d s'expressa en la majoria d'òrgans i teixits del cos: en l'intestí, pàncreas, pell, ronyó, úter, teixit conjuntiu, testicles, tim, nòduls limfàtics, pulmons, cervell i melsa<sup>50,51</sup>. La màxima expressió es troba en els teixits que contenen alts nombres de cèl·lules d'origen hematopoètic, com la melsa, els nòduls limfàtics i l'intestí prim. A nivell cel·lular la màxima expressió de CD1d la trobem en leucòcits, tot i que també s'expressa en molts altres tipus de cèl·lules somàtiques com per exemple en cèl·lules epitelials<sup>52</sup>, cèl·lules de Schwann<sup>53</sup> o hepatòcits<sup>54</sup>. En la superfície de les cèl·lules epitelials intestinals s'expressa una forma funcional de CD1d que no està associada a  $\beta$ 2-microglobulina<sup>55,56</sup>. En les cèl·lules d'origen hematopoètic el CD1d està present en limfòcits B, limfòcits T, timòcits, DC i M $\Phi$ <sup>51,55,57</sup>. És en les APC però on n'hi trobem els nivells més elevats. En condicions basals són les cèl·lules B IgM<sup>hi</sup> de la zona marginal de la melsa les que n'expressen uns majors nivells<sup>58</sup>. En les DC i els M $\Phi$  l'expressió de CD1d és molt depenent de l'estat d'activació, incrementant-se quan major és el nivell d'activació de la cèl·lula<sup>59</sup>.

### 1.4.4 Obtenció d'antígens de CD1d per l'APC

Degut a l'insolubilitat dels lípids en aigua, aquests majoritàriament no es troben lliures en el medi extracel·lular sinó que formen bicapes lipídiques o s'associen amb lipoproteïnes plasmàtiques. Aquestes propietats bio-físiques particulars requereixen mecanismes específics per part de les cèl·lules que els hi permetin extreure els lípids de les membranes i carregar-los en el CD1d.

En el cas d'alguns lípids presentats per CD1b, CD1c i CD1d aquests es troben formant part de les partícules de VLDL (Very low-density lipoprotein) i poden ser captats per la cèl·lula a través del LDL-R (low-density lipoprotein receptor)<sup>60,61</sup>. L'unió d'VLDL per part d'LDL-R és depenent de la lipoproteïna ApoE. En ratolins que no tenen ApoE l'activació de les iNKT en resposta a l'administració de lípids intravenosos es troba disminuïda<sup>60</sup>. També la capacitat activadora de les DC sobre les iNKT disminueix quan les DC no expressen LDL-R<sup>61</sup>.

Els receptors de la família de les lectines de tipus-C també poden captar antígens que poden ser presentats a través de les molècules de CD1. El receptor *langerin* (CD207) és indispensable per a que les cèl·lules de Langerhans puguin presentar òptimament antígens lipídics de *Mycobacterium leprae* a través de CD1a<sup>62</sup>. El receptor de mannanosa (CD206) també és capaç de captar el LAM (*mycobacterial lipoglycan lipoarabinomannan*) de les micobacteries per a que pugui ser presentat per les molècules de CD1b<sup>63</sup>. La capacitat d'altres receptors de la família de les lectines de tipus-C que reconeixen carbohidrats presents en bacteries com DEC205 i DC-SIGN per incrementar la captura d'antígens i per tant la presentació a través d'MHC en les DC està ben documentada, i s'ha hipotetitzat que aquests receptors podrien actuar de la mateixa manera en la presentació a través de CD1d<sup>64</sup>.

També s'ha demostrat que les cèl·lules B són capaces de captar lípids units als antígens específics del seu BCR, i que aquests lípids un cop internalitzats i processats poden estimular molt eficientment a les iNKT<sup>65,66</sup>.

Així mateix, certs glicolípidis capaços d'activar a les iNKT s'uneixen a CD1d directament en la superfície de la cèl·lula, sense una necessitat prèvia de processament intracel·lular. Aquests glicolípidis tenen cadenes lipídiques més curtes i amb una menor saturació, de manera que són menys hidrofòbics i per tant poden trobar-se lliures parcial o totalment en el medi extracel·lular<sup>67,68</sup>.

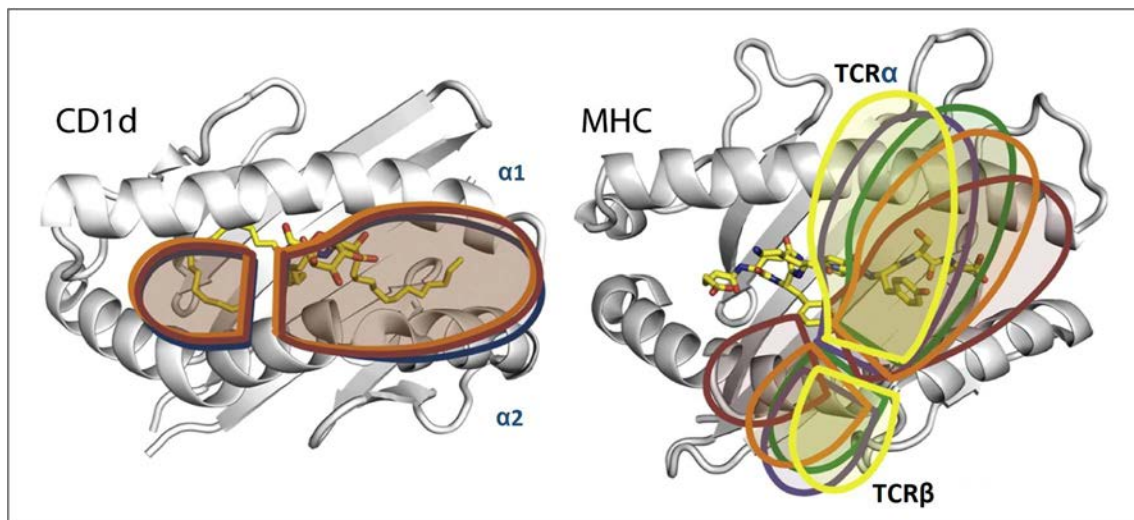
### 1.4.5 Tràfic intracel·lular i càrrega de CD1d amb l'antigen

Les molècules de CD1d es sintetitzen i maduren en el RE (reticle endoplasmàtic)<sup>69</sup>. En el RE s'hi uneixen les xaperones calnexina i calreticulina. Aquesta unió permet la interacció de CD1d amb la proteïna ERp57 que catalitza la formació dels ponts disulfur en la cadena pesada de CD1<sup>70,71</sup>. La unió de  $\beta$ 2m ( $\beta$ 2-microglobulina) també es realitza en el RE, després que la molècula s'hagi oxidat completament per acció de la ERp57. En l'epiteli intestinal la cadena pesada no s'associa amb  $\beta$ 2m<sup>55</sup>. En el RE també s'hi carreguen lípids endògens que li atorguen estabilitat, una funció similar a la que realitzen els pèptids en la formació de les molècules del MHC. La proteïna MTTP (*Microsomal triglyceride*

*transfer protein*) intervén en el procés de càrrega de lípids endògens. En aquest compartiment la nova molècula de CD1d es mourà per la ruta secretora passant per l'aparell de Gogi fins arribar a la membrana cel·lular<sup>64</sup>. En la membrana cel·lular la molècula de CD1d és reinternalitzada a través del sistema endocític cap als LE (*late endosomes*) i els lisosomes, on es substitueix el lípid unit al RE per un lípid exògen o un altre lípid endogen. La reinternalització dependent de clatrina del CD1d cap als LE i els lisosomes es realitza a través del reconeixement d'un motiu de tirosina present en la cua citoplasmàtica del CD1d per part de les proteïnes AP-2 (*adaptor protein 2*)<sup>38</sup> i AP-3 (*adaptor protein 3*)<sup>72,73</sup>. AP-2 dirigeix majoritàriament les molècules de CD1d cap als LE<sup>74</sup>, i AP-3 ho fa cap als lisosomes<sup>72,73</sup>. En el CD1d humà no s'hi uneix AP-3 i la localització de CD1d en els lisosomes és menor que en el seu homòleg de ratolí<sup>75</sup>. Els diferents isotips de CD1 humans interaccionen de manera diferencial amb els adaptadors AP2 i AP3 en funció de la seva cua citoplasmàtica i determina la seva localització en els compartiments endosòmics (CD1c i CD1d amb AP2, CD1b amb AP2 i AP3, i CD1a s'internalitza de manera independent de clatrina), permetent-los hi mostrejar el contingut lipídic de tota la ruta endosomal<sup>76</sup>. En els LE i els lisosomes el lípid unit al RE és substituït per un altre lípid endogen o exogen. El pH baix dels LE i els lisosomes indueix un canvi conformacional en el CD1d que permet l'intercanvi del lípid estabilitzador unit en el RE per lípids del compartiment endocític<sup>4,77,78</sup>. En aquests compartiments les proteïnes intercambiadores de lípids com les saposines, GM2-AP o NPC2, transferiran lípids de la bicapa lipídica i/o internalitzats per receptors en el CD1d<sup>39</sup>, en un procés que en humans estarà facilitat per el CD1e<sup>40</sup>. En els endosomes i lisosomes alguns lípids complexos per a poder ser carregats en les molècules de CD1 prèviament s'han de processar per lipases i glucosidases residents com l' $\alpha$ -Galactosidasa A<sup>79</sup>,  $\alpha$ -mannosidasa<sup>40</sup> i  $\beta$ -hexosaminidasa B<sup>80</sup>. Les molècules de CD1d seran novament dirigides a la membrana cel·lular on podran interactuar amb el TCR. El procés de retorn a la membrana cel·lular no es coneix tan bé com el d'internalització, però es sap que les molècules de CD1d retornen en unes zones de la membrana riques en colesterol conegudes com a *lipid rafts*<sup>81,82</sup>. La presentació d'antígens en els *lipid rafts* afecta la intensitat i la naturalesa de la resposta de les cèl·lules T i també de les iNKT<sup>68</sup>.

### 1.4.6 Reconeixement de CD1d i antigen per el TCR semi-invariant

La resolució de l'estructura cristal·logràfica del complex CD1d- $\alpha$ GalCer-iTCR humà va revelar importants diferències respecte de totes les estructures MHC-pèptid-TCR conegudes<sup>83</sup>. L'eix del iTCR que va d' $\alpha$  cap a  $\beta$  es posiciona sobre el CD1d adoptant una posició paral·lela a l'eix que es forma entre els extrems dels canals F' i A' del CD1d (Fig.3). En les estructures MHC-pèptid-conegudes aquests dos eixos es tallen majoritàriament en diagonal, encara que les orientacions poden variar des de gairebé perpendicular fins a gairebé en paral·lel<sup>84</sup>. Poc després també es va resoldre l'estructura CD1d- $\alpha$ GalCer-iTCR en ratolí, que mostra una interacció del iTCR amb el CD1d pràcticament idèntica a la humana<sup>49</sup>. La interacció del iTCR amb el CD1d-antigen és relativament rígida<sup>25</sup>, i no es veu modificada en el reconeixement de diferents antígens<sup>85</sup>, ni tampoc per l'ús de diferents segments V $\beta$  en el iTCR, que tan sols juguen un paper modulador de la afinitat de la interacció<sup>84</sup>, posant en evidència el caràcter innat d'aquest reconeixement.



**Figura 3.** Interacció del TCR amb el CD1d o el MHC. La interacció del iTCR amb el CD1d-antigen (esquerra) es produeix en tots els casos posicionant l'eix  $\alpha\beta$  del TCR de manera gairebé paral·lela a l'eix que es forma entre els dominis  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  del CD1d. Aquesta interacció s'adopta independentment de l'antigen carregat en el CD1d [en la imatge es mostra un antigen model en groc ( $\alpha$ GalCer), però les tres "petjades" del iTCR sobre el CD1d corresponen a interaccions amb antígens diferents]. Per el contrari en els complexos MHC-pèptid-TCR la interacció es produeix adoptant orientacions en diagonal del TCR respecte del MHC que poden variar des de gairebé en perpendicular fins a gairebé en paral·lel respecte de l'eix  $\alpha 1\alpha 2$  [Figura extreta de la referència 84].

Totes les estructures CD1d-Antigen-iTCR resoltes fins al moment mantenen la mateixa orientació del iTCR respecte el CD1d, independentment de quins segments V $\beta$  contingui el iTCR o de la naturalesa del antigen<sup>84,86,87</sup>. Aquesta característica recorda el funcionament dels PRRs (*Pathogen Recognition Receptors*) de la immunitat innata, ja que també són receptors que interactuen d'una manera altament conservada amb els seus lligands<sup>25</sup>.

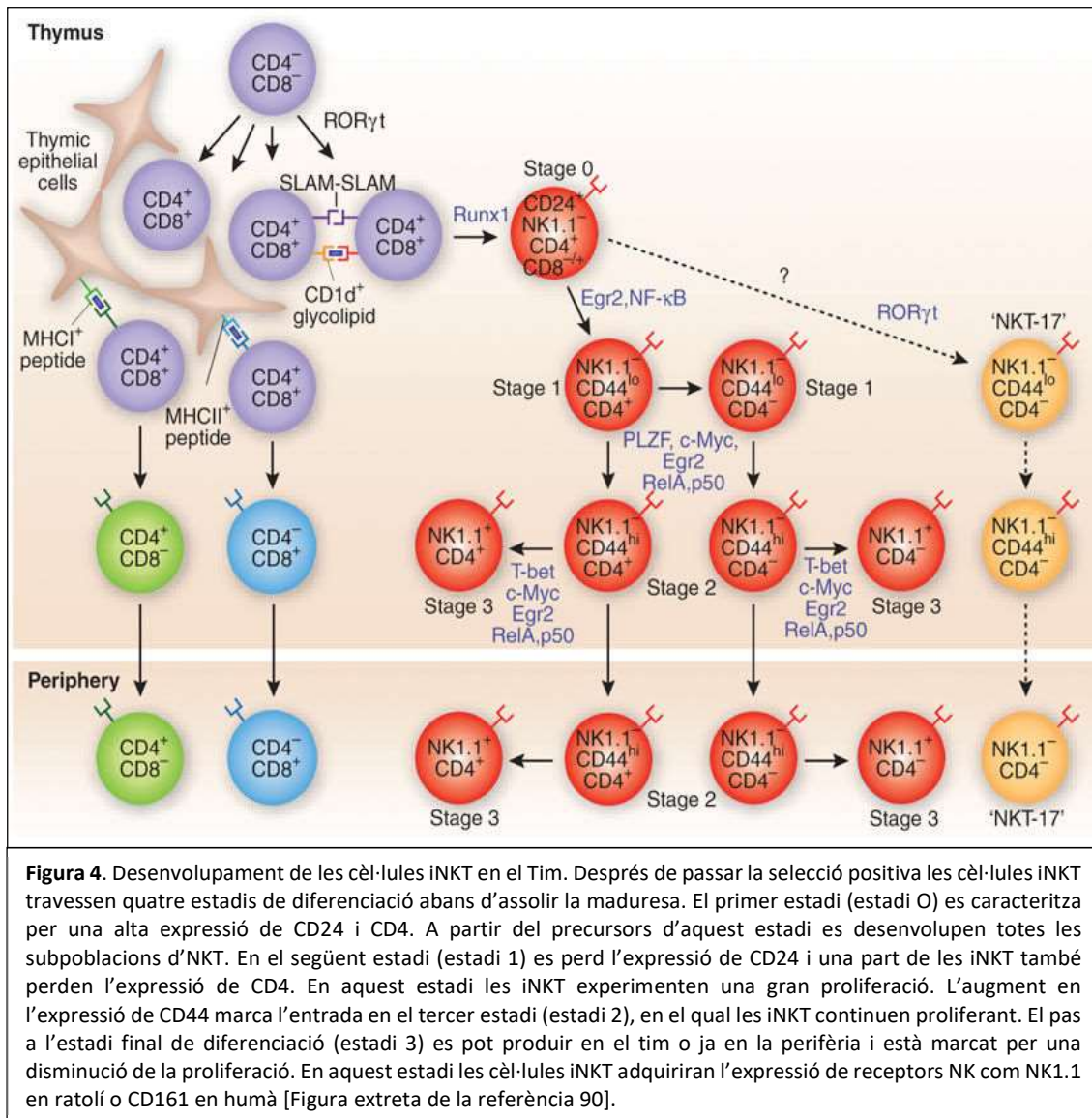
Des d'un punt de vista estructural només la cadena  $\alpha$  del iTCR manté contacte directe amb l'antigen<sup>25</sup> a través de les regions CDR1 $\alpha$  i CDR3 $\alpha$ . En estudis de mutagènesi i cristal·lografia del iTCR s'han trobat diversos residus en la cadena- $\alpha$  conservats evolutivament que són clau per el reconeixement del CD1d: en la regió CDR1 $\alpha$  el residu Pro28 $\alpha$ , i en la regió CDR3 $\alpha$  els residus Asp94 $\alpha$ , Arg95 $\alpha$ , Gly96 $\alpha$ , Ser97 $\alpha$  i sobretot Leu99 $\alpha$ <sup>49</sup>. En l'estructura CD1d- $\alpha$ GalCer-iTCR s'estableixen quatre ponts d'hidrogen entre el iTCR i l' $\alpha$ GalCer, dos a través de la regió CDR1 $\alpha$  que interacciona amb els grups 4"OH i 3"OH de la galactosa, i dos a través de la regió CDR3 $\alpha$  que interacciona amb el grup 2"OH de la galactosa i el grup 3'OH de la cadena d'esfingosina<sup>49</sup>. En estudis amb agonistes amb una estructura similar a l' $\alpha$ GalCer una orientació diferent del grup 2"OH de la galactosa elimina gairebé totalment l'activitat dels compostos<sup>19</sup>; per el contrari, la pèrdua dels contactes a través dels grups 3"OH i 4"OH de la galactosa disminueixen l'afinitat del iTCR per el CD1d-antigen però encara es manté part de l'activitat funcional<sup>88,89</sup>. La regió CDR3 $\alpha$  també estableix contacte directe amb el CD1d. La cadena  $\beta$  no interacciona amb l'antigen, únicament ho fa amb l'hèlix  $\alpha$ 1 del CD1d, aportant estabilitat al conjunt, modulant la afinitat de la interacció i essent determinant per a l'adopció de la característica interacció en paral·lel sobre el CD1d<sup>25</sup>, principalment a través de la regió CDR2 $\beta$ . En aquesta regió el residu Tyr50 $\beta$  que està present en les cadenes V $\beta$ 8.2 i V $\beta$ 7 de ratolí i en la V $\beta$ 11 d'humà és imprescindible per a la interacció de la cadena- $\beta$  amb el CD1d.



### 1.5. Desenvolupament de les cèl·lules iNKT

Les iNKT es desenvolupen al Tim a partir dels mateixos precursors que donen lloc a les cèl·lules T convencionals<sup>90</sup>. És en l'estadi de timòcits doble positius (DP) on el desenvolupament de les iNKT es separa del de les cèl·lules T convencionals. L'inici de la diferenciació es produeix quan un timòcit DP, que per atzar ha generat el iTCR canònic de les iNKT, segurament reconeix un lípid endogen presentat per CD1d<sup>91-93</sup>. En aquest cas a diferència del que passa amb les cèl·lules T convencionals la selecció positiva no es produeix per la interacció amb una cèl·lula tímica epitelial sinó per l'interacció amb un altre timòcit DP que expressa CD1d. Tot i que l'identitat dels lípids endògens involucrats en la selecció positiva no està clar, recentment s'han identificat dos lípids, el pLPE (*plasmalogen lysophosphatidic acid*) i eLPA (*ether lysophosphatidic acid*) involucrats en el procés de selecció. Aquests lípids es produeixen en el peroxisoma per acció de l'enzim GNPAT (*glyceronephosphate O-acyltransferase*). Els animals deficientes en GNPAT mostren una important reducció en el nombre de cèl·lules iNKT en el tim i en els teixits perifèrics que podria estar relacionat amb la absència dels lligands mencionats<sup>94</sup>.

Per a que es doni el fenomen de selecció positiva es requereix una senyal a través del iTCR relativament forta<sup>95</sup> que promou l'expressió dels factors de transcripció EGR1 i EGR2 (*early growth response protein*)<sup>96</sup>. EGR1 i EGR2 activen l'expressió de PLZF (*promyelocytic leukaemia zinc finger protein*) que es el factor de transcripció clau en la diferenciació cap a iNKT<sup>96</sup>. En la selecció positiva a part de les interaccions a través del iTCR, les interaccions homotípiques a través de molècules de la família SLAM (*signalling lymphocytic activation molecule*) són fonamentals. D'entre els diferents receptors de la família dels SLAM el CD150 i el Ly108 són els més importants per al desenvolupament de les cèl·lules iNKT<sup>97</sup>. Els ratolins que no expressen Ly108 o CD150 mostren una reducció del 50-70% en el nombre de cèl·lules iNKT en el tim, la melsa i el fetge. L'eliminació conjunta dels dos receptors genera una reducció entorn el 90% del nombre total de cèl·lules iNKT en aquests òrgans<sup>98,99</sup>.



Després de la selecció positiva els timòcits avancen per quatre estadis de diferenciació abans d'abandonar el Tim, uns estadis que es defineixen en base al patró d'expressió de diverses molècules de superfície (Fig.4). Algunes de les modificacions més rellevants que pateixen les futures iNKT durant aquest procés són: la pèrdua de l'expressió de CD8 (en ratolí el 80% de les iNKT madures són CD4+ i el 20% restant DN), l'adquisició de CD44 i la capacitat de produir IL-4 i IFN $\gamma$ <sup>100,101</sup>. En aquest procés de diferenciació en el tim també es produeix la separació entre les subpoblacions NKT1, NKT2 i NKT17 de cèl·lules iNKT. S'ha documentat que durant la diferenciació en el tim algunes iNKT amb gran afinitat per el complex CD1d-antígen són eliminades per selecció negativa. Encara que la selecció negativa de les iNKT és molt desconeguda, es sap que no es produeix per la interacció amb els timòcits DP sinó amb les DC del Tim<sup>57,102</sup>.

Finalment un cop les iNKT han abandonat el Tim, acaben el seu desenvolupament en la perifèria mitjançant el reconeixement de CD1d en les APC. La maduració final en la perifèria produeix en les iNKT característiques diferents en funció del teixit on es localitzen<sup>103-105</sup>. També és en la perifèria on la majoria d'iNKT adquireix l'expressió d'NK1.1, tot i que una part ja ho ha fet al Tim<sup>106</sup>.

### **1.6. Distribució de les cèl·lules iNKT en la perifèria**

Al finalitzar el procés de desenvolupament al Tim les iNKT es distribueixen per tot l'organisme. En el ratolí les majors quantitats es troben en la melsa, el tim i la medul·la òssia<sup>107</sup>. En la majoria dels òrgans de la soca C57BL/6 les iNKT representen respectivament entre un 0,5 i 2,5 per cent del total de limfòcits T, però en el fetge suposen fins a un 20-30 per cent. La distribució de les iNKT en els humans no està tan ben estudiada, però normalment la freqüència és unes deu vegades més baixa en humans que en ratolins<sup>108</sup>, tot i que en humans les diferències entre individus poden arribar a ser molt grans de fins a 100 vegades<sup>109</sup>. Al contrari del que passa amb les cèl·lules T restringides per MHC, en el cas de les iNKT la recirculació homeostàtica per els teixits és molt limitada<sup>25</sup>.

Els recents avanços en tècniques d'imatge com la microscopia intravital juntament amb les noves tècniques de manipulació genètica, han permès la visualització *in situ* de la posició i moviment de les iNKT. Per exemple en la melsa s'ha pogut veure que en condicions d'homeòstasi les iNKT es troben disperses en diverses zones com els PALS (*Periarteriolar lymphoid tissue*)<sup>110</sup>, la MZ (*Marginal zone*)<sup>111</sup>, la zona T, la polpa vermella i també pròximes a la zona vascular<sup>110</sup>, però quan s'estimula el sistema immune amb antigens glicolípidis o bacteries es redistribueixen en la proximitat de les zones vascular i marginal<sup>110</sup>. En el fetge les cèl·lules iNKT s'acumulen en el lumen dels sinusoides venosos formant una població resident que no s'intercanvia amb la sang<sup>112</sup>. La retenció de les cèl·lules iNKT en els sinusoides es realitza a través d'interaccions entre ICAM-1 i LFA-1. Aquesta localització intravascular de les iNKT els hi permet estar en contacte estret amb les cèl·lules de Kuppfer, que davant l'aparició d'un antigen estrany

(microbià) en la sang el poden capturar i presentar a les iNKT, generant una ràpida resposta immune per tal d'impedir la disseminació del microorganisme<sup>113</sup>.

### **1.7. Subpoblacions d'iNKT**

Com hem indicat les cèl·lules iNKT poden ser positives i negatives per CD4, amb percentatges relatius dels quals varien considerablement entre diferents individus i soques<sup>1,114</sup>. L'expressió de CD4 en les cèl·lules iNKT s'ha relacionat amb una major producció de citocines de tipus Th2, però tant les iNKT positives com les negatives per CD4 tenen la capacitat de produir citocines de tipus Th1<sup>114,115</sup>. En humà, però no en ratolí, també existeix una petita proporció de cèl·lules iNKT que expressen CD8<sup>114</sup> i que tenen una major capacitat de producció d'IFN $\gamma$  i activitat citotòxica que les altres poblacions d'iNKT<sup>116</sup>.

Recentment s'ha començat a aprofundir en l'estudi de les subpoblacions de cèl·lules iNKT, demostrant-se l'existència de tres poblacions funcionals anàlogues a les poblacions Th1, Th2 i Th17 de cèl·lules T-CD4 convencionals<sup>117</sup>. Aquestes subpoblacions han estat anomenades com a NKT1, NKT2 i NKT17 en base a diversos marcadors i característiques funcionals, però sobretot en funció a una alta expressió dels mateixos factors de transcripció que defineixen els llinatges de limfòcits T-CD4 convencionals: NKT1 (T-bet), NKT2 (GATA3) i NKT17(ROR $\gamma$ t). La separació de les iNKT en aquests llinatges es produeix durant el desenvolupament en el tim i no en la perifèria<sup>118</sup>.

També s'han definit dos altres poblacions de cèl·lules iNKT, NKT10 o reguladores per la seva gran capacitat per secretar IL-10, i NKT<sub>FH</sub> per la seva similitud amb les cèl·lules T<sub>fh</sub> convencionals<sup>1</sup>. El seu origen encara no està molt clar, i no es coneix si també es desenvolupen al tim o en la perifèria a partir de l'estimulació dels altres subsets<sup>117</sup>.

No obstant els criteris utilitzats per definir aquestes subpoblacions d'iNKTs disten de ser absoluts, ja que mostren un cert grau de solapament entre elles i per tant és probable que en un futur es modifiquin o sorgeixin noves classificacions<sup>119</sup>.

### 1.7.1 NKT1 i NKT2

Les NKT1 es caracteritzen principalment per expressar alts nivells del factor de transcripció T-bet i per alliberar grans quantitats d'IFN $\gamma$  quan s'activen<sup>117</sup>. També poden produir IL-4 en resposta a un estímul potent a través del iTCR. La majoria són CD4 positives<sup>118</sup> encara que també n'hi han de doble negatives. En C57BL/6 les NKT1 representen la major part de les iNKT. La majoria de les NKT1 expressen NK1.1, requereixen IL-15 per al seu desenvolupament i són la població de cèl·lules iNKT predominant en la melsa i el fetge<sup>120</sup>.

Les NKT2 es caracteritzen fenotípicament per a expressar CD4 i IL-17RB, i funcionalment per alliberar IL-4, IL-9, IL-10 i IL-13 quan són activades<sup>120,121</sup>. Tot i que no expressen nivells més alts de GATA3 que altres poblacions d'iNKT, les poques iNKT que es desenvolupen en absència d'aquest factor de transcripció tenen importants defectes en la producció de citocines de tipus Th2. Es localitzen principalment en els pulmons<sup>122</sup>, la medul·la del tim i en la zona T dels nòduls limfàtics<sup>120</sup>.

Un estudi recent ha demostrat que la producció de citocines diferencial que s'observa segons la ruta per on s'administra l' $\alpha$ GalCer, és deguda a la localització d'aquestes dos poblacions d'iNKT<sup>120</sup>. L'administració d' $\alpha$ GalCer genera grans quantitats d'IFN $\gamma$  i també IL-4, sobretot per part de les cèl·lules NKT1, que són la gran majoria de les iNKT en la melsa i el fetge. Per el contrari l'administració per via oral únicament indueix l'alliberació d'IL-4 en els nòduls limfàtics propers per part de les NKT2, ja que en aquests no hi han NKT1.

### 1.7.2 NKT17

Són negatives per CD4 i alliberen IL-17A en resposta a l'estimulació amb  $\alpha$ GalCer<sup>123</sup>. Requereixen i expressen alts nivells del factor de transcripció ROR $\gamma$ t durant el seu desenvolupament en el tim<sup>124</sup>. Es localitzen fonamentalment en els NL perifèrics, la pell i els pulmons<sup>123,125</sup>. De manera similar a les CD4 Th17, s'ha documentat la seva implicació en reaccions al·lèrgiques com la AHR (*airway hyperreactivity*)<sup>126</sup>, malalties autoimmunes

com l'artritis (*collagen-induced arthritis*)<sup>117</sup> i en la resposta a infeccions microbianes com *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*<sup>127,128</sup>.

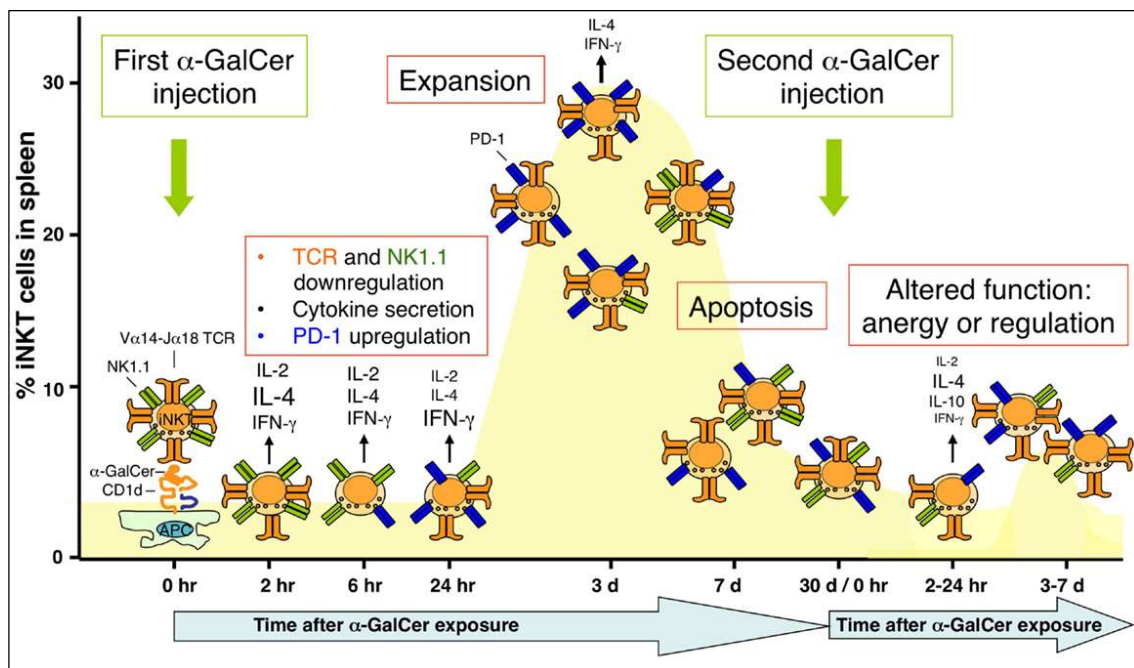
### **1.8. Activació de les iNKT**

A diferència de les cèl·lules T, que per a ser activades requereixen una senyal del TCR (senyal 1) juntament amb una senyal de coestimulació (senyal 2), les iNKT s'activen a través del iTCR sense necessitat de coestimulació<sup>1</sup>. Així mateix, les iNKT poden activar-se per citocines pro-inflamatòries sense rebre cap senyal a través del iTCR. Tot i que aquests dos mecanismes són independents, quan es produeixen a la vegada generen una activació molt més potent. Entre aquests dos extrems, hi han situacions en les que es requereixen la presència de citocines juntament amb lligands endògens o exògens d'afinitat intermitja per a la seva completa activació.

#### **1.8.1 Activació a través del TCR**

Les iNKT poden activar-se a través del iTCR per lligands exògens i per lligands endògens. La gran majoria dels lligands activadors són o glicoesfingolípis (una ceramida unida a un sucre) o bé glicerolípid (glicerol que uneix dos cadenes d'hidrocarbur). D'aquests lligands el més ben estudiat amb diferència és l' $\alpha$ GalCer, que al ser reconegut per el iTCR genera una potent activació i expansió de les iNKT (Fig.5). L' $\alpha$ GalCer inicialment va ser identificada en un *screening* de possibles molècules antitumorals en una mostra de l'esponja marina *Agellus mauritanus*, tot i que es creu que realment provenia d'un bacteri que contaminava la mostra<sup>25</sup>. Els agonistes glicoesfinoglipídics requereixen un enllaç O-glicosídic d'orientació  $\alpha^1$ . El fet que els mamífers no puguin generar aquest tipus d'enllaç va servir per hipotetitzar un mecanisme d'acció de les iNKT enfront la infecció, en el qual l'activació envers l'estrany es decideix en base a la presència o absència d'aquest enllaç<sup>1</sup>. Així s'han trobat glicolípid activadors d'iNKT amb enllaç  $\alpha$  en *Sphingomonas spp* ( $\alpha$ -glucuronosylceramides i  $\alpha$ -galactosyldiacylglycerols)<sup>129-131</sup>, *Borrelia burgdorferi* ( $\alpha$ -galactosyldiacylglycerols)<sup>132</sup> i *Streptococcus pneumoniae* ( $\alpha$ -

glucosyldiacylglycerols)<sup>128</sup>. Tot i això estudis amb APC estimulades amb agonistes de TLR mostren que les iNKT es poden activar en absència de patògens a través del iTCR<sup>133-136</sup>. Aquest fet, unit a l'activació de les iNKT en càncer i autoimmunitat, i la implicació de lípids endògens en el procés de selecció en el Tim, implicaven l'existència de lligands endògens activadors. La intensa recerca d'agonistes endògens per nombrosos grups ha permès trobar una gran quantitat de lligands capaços d'unir-se a CD1d, però amb nul·la capacitat d'estimulació<sup>137-139</sup>. Tan sols uns pocs compostos com el iGb3 (isoglobotrihexosylceramide)<sup>140</sup> i la lysoPC (lysophosphatidilcholine)<sup>137</sup> son reconeguts per les iNKT, encara que no son imprescindibles per la selecció tímica<sup>140-142</sup> ni tampoc grans activadors<sup>142,143</sup>. Anecdòticament, fa uns cinc anys es va publicar que la  $\beta$ GalCer endògena podia activar les iNKT<sup>142</sup>. Recentment nous estudis desmenteixen aquest fet, i conclouen que l'activació observada era deguda a l'existència de petites quantitats de formes endògenes d' $\alpha$ -galactosyl i  $\alpha$ -glucosylceramides<sup>144</sup>. Aquests lípids endògens podrien ser els principals responsables de l'activació de les iNKT en la perifèria en absència d'agonistes exògens.



**Figura 5.** Cinètica d'expansió de les iNKT en la melsa en resposta a l' $\alpha$ GalCer. Al cap de poques hores després de activar-se perden l'expressió de TCR i NK1.1. A les 24 hores es recuperen els nivells inicials de TCR, però l'NK1.1 continuarà *downregulat* durant un període de temps llarg. L'expansió de les iNKT assolirà un màxim al cap de 3 dies, i després per apoptosi retornaran als nivells inicials als 7 dies. Durant el procés d'expansió incrementarà l'expressió de PD1. Les iNKT que no hauran mort per apoptosi entraran en un estat d'anergia funcional durant el qual seran molt menys reactives, amb menys capacitat de proliferació i un perfil de citocines alterat amb predominança per la IL-4 i la IL-10 [Figura extreta de la referència 243].

### 1.8.2 Activació independent del TCR

Diverses citocines com la IL-23 i IL-25, i sobretot l'IL-12 i IL-18 són capaces d'activar les iNKT sense la necessitat d'una senyal a través del iTCR<sup>133,145-149</sup>. D'entre aquestes la més potent és la IL-12, citocina que poden alliberar les cèl·lules dendrítiques quan són estimulades a través de PRRs. L'IL-12 és fonamental per a l'activació de les iNKT, ja que a diferència del que passa amb les cèl·lules T convencionals on el receptor de la IL-12 només s'expressa un cop han estat activades, en les iNKT ho fa de manera constitutiva<sup>93</sup>. De fet, la producció d'IFN $\gamma$  per part de les iNKT enfront les infeccions bacterianes és més dependent de la presència d'IL-12 que no de les interaccions a través del iTCR<sup>133,150,151</sup>. S'ha descrit que per a la producció d'IFN $\gamma$  per part de les iNKT, l'efecte de l'IL-12 és més important que la interacció a través del iTCR, independentment de si els microorganismes contenen (*Sphingomonas yanoikuyae* i *Streptococcus pneumoniae*) o no (*Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella Typhimurium*) antígens capaços de ser reconeguts i activar a les iNKT<sup>151</sup>.

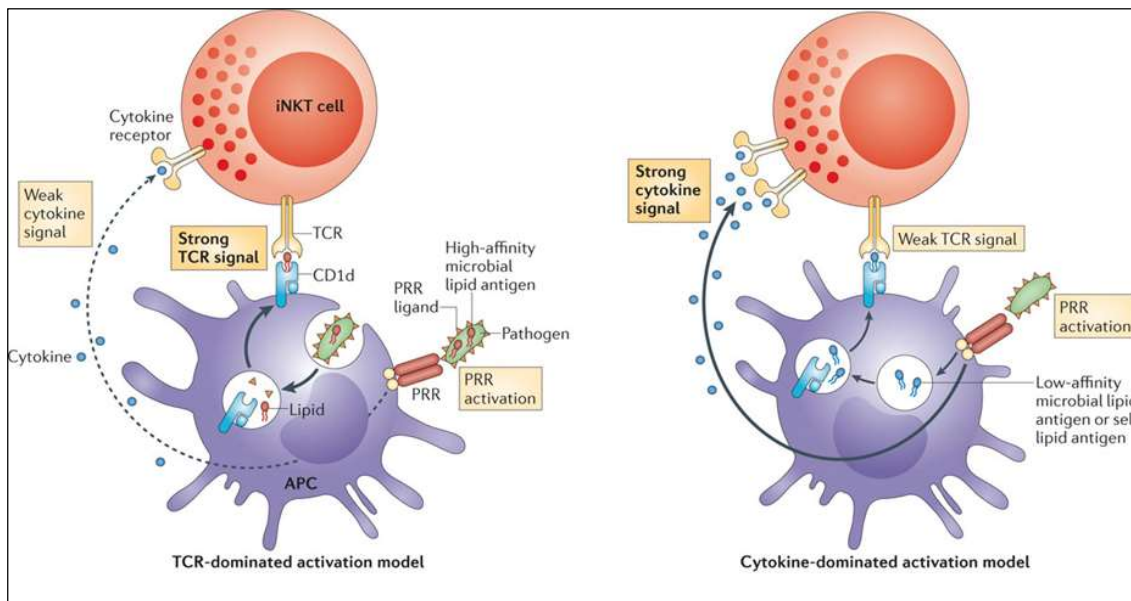
Tal com indica el seu nom les iNKT comparteixen algunes característiques fenotípiques amb les cèl·lules NK. Algunes d'aquestes característiques són la presència en superfície de receptors típicament associats amb les NK capaços de modificar l'estat d'activació de la cèl·lula (activar o inhibir), com per exemple el NK1.1<sup>152</sup> en ratolí o el CD161 (equivalent al NK1.1) en humans<sup>153</sup> i NKG2D en ratolins i humans<sup>154</sup>. Tot i això el paper dels receptors NK en l'activació de les iNKT no està clar, sobretot degut a la gran heterogeneïtat d'expressió en les diverses subpoblacions d'iNKT<sup>1,2</sup>.

### 1.8.3 Integració de les senyals activadores

Tot i les dades experimentals que demostren com l'activació de les iNKT es pot portar a terme per un o altre mecanisme, de manera dependent o independent del reconeixement per el iTCR, en la gran majoria de situacions *in vivo* l'activació final és el resultat d'una integració de les senyals provinents a través d'ambdós mecanismes. En base a aquest model d'activació mixt TCR-citocines diversos autors han suggerit dos vies diferents d'activació en les iNKT<sup>1</sup> (Fig.6). En les dos vies intervenen les dos senyals, però



en una predomina la senyal a través del iTCR i en l'altre la senyal de les citocines. Per exemple enfront d'una infecció amb un bacteri que conté antígens que poden ser reconeguts directament a través del iTCR, el reconeixement d'aquests antígens exògens (que solen ser reconeguts amb alta afinitat) genera una forta senyal activadora i per tant el paper de les citocines és secundari. Per el contrari davant d'una infecció amb un bacteri que no conté antígens capaços de ser reconeguts per el iTCR l'activació es porta a terme majoritàriament per citocines. Quan els PAMP del microorganisme són reconeguts per els PRR de l'APC aquesta respon alliberant citocines que activen a la iNKT. El reconeixement a través dels PRR també augmenta la presentació d'antígens endògens de baixa afinitat que són reconeguts i que també contribueixen a l'activació de la iNKT.



**Figura 6.** Activació fisiològica de les iNKT. S'han proposat dos mecanismes d'activació fisiològica de les iNKT, en els dos intervenen dos senyals, una a través del iTCR i una altre per citocines. En el primer (esquerra) l'activació es produeix principalment a través del iTCR i el paper de les citocines és secundari. En el segon (dreta) l'activació es produeix a través de les citocines, tot i que també hi intervé el iTCR [Figura extreta de la referència 1].

### 1.9. Resposta a l'Activació

#### 1.9.1 Resposta de la cèl·lula iNKT a l'activació

Les iNKT responen principalment a l'activació alliberant grans quantitats de citocines i quimiocines amb efectes molt diversos sobre el sistema immune (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, GM-CSF)<sup>1</sup>. També proliferen i augmenten l'expressió en superfície d'algunes molècules de coestimulació fonamentals en l'activació del sistema immune <sup>151</sup>. En alguns casos elles mateixes també poden exercir funcions citotòxiques d'una manera similar a com ho fan les cèl·lules T<sup>155</sup>.

Una de les característiques més interessants de les iNKT des d'un punt de vista terapèutic, és la seva capacitat per respondre de manera quantitativa i qualitativament diferent en funció de les propietats biofísiques del antigen amb el qual són estimulades<sup>156</sup>. Per exemple si a través del iTCR reconeixen un antigen amb molta afinitat responen alliberant citocines d'un perfil mixt Th1 i Th2. En canvi si la interacció a través del iTCR ha estat de baixa afinitat i l'activació s'ha produït predominantment a través de l'IL-12 la resposta serà exclusivament Th1<sup>133,145</sup>. Per altra banda els antígens suficientment hidrosolubles, capaços d'unir-se a CD1d directament en la superfície sense processament intracel·lular, tendeixen a generar una resposta de tipus Th2<sup>99,100</sup>. El grau de solubilitat de l'antigen sembla afectar a la manera en com es presenta l'antigen en la membrana: els antígens prou hidrosolubles per a estar en forma lliure en el medi extracel·lular es poden carregar directament al CD1d en la superfície i faciliten una presentació dispersa per tota la membrana de l'APC; per el contrari, els antígens molt insolubles requereixen un procés intracel·lular de càrrega al CD1d i es presenten agrupats en els *lipid rafts* <sup>157</sup>. Encara que com acabem de comentar l'afinitat del iTCR i el grau de solubilitat de l'antigen hi juguen un paper important, no estan totalment clars els mecanismes que permeten aquesta manipulació de la resposta immunitària per part de les iNKT. Per exemple, un altre factor que sembla jugar un paper important en la resposta de la cèl·lula iNKT és el tipus d'APC que presenta l'antigen: els monòcits i les DC semblen estar més implicats en les respostes de tipus Th1<sup>158</sup>, en canvi la presentació per cèl·lules B s'ha relacionat amb les respostes de tipus Th2<sup>159</sup>. Aquest factor es relaciona també amb la via d'entrada de l'antigen en l'organisme. Altres factors que

determinen la resposta fisiològica son l'estabilitat dels antígens, la biodisponibilitat o la cinètica de les interaccions.

A part de les interaccions a través del iTCR, les vies de presentació o el microambient de citocines i quimiocines, la resposta d'una iNKT enfront un antígen concret també està determinada per les propietats particulars de la cèl·lula iNKT en qüestió i la seva localització anatòmica. Com ja hem comentat encara que fa temps que es coneix l'existència de cèl·lules iNKT amb diferents característiques fenotípiques i funcionals<sup>102-104</sup>, tan sols fa relativament poc que s'han començat a estudiar i classificar en les tres subpoblacions més ben definides (NKT1, NKT2 i NKT17)<sup>160 117</sup>.

En resum, la resposta final d'una cèl·lula iNKT enfront l'activació sembla estar determinada per diversos factors, la naturalesa química de l'antigen que determina tant la via de presentació com l'afinitat de la interacció amb el iTCR, l'ambient de citocines, les propietats biològiques de l'APC que presenta l'antigen i també la pròpia naturalesa biològica i distribució anatòmica de la cèl·lula iNKT.

### **1.9.2 Interacció de les cèl·lules iNKT amb altres cèl·lules del sistema immune**

L'activació de les iNKT desencadena una gran quantitat d'interaccions en el sistema immune que provoquen la trans-activació secundària d'altres tipus cel·lulars, les més immediates de les quals són en les pròpies APC que han presentat l'antigen. Aquest fenomen d'estimulació recíproca ha estat molt ben estudiat en el cas de les DC en la melsa<sup>110,135,136,161</sup>. Davant d'una infecció bacteriana les DC reconeixen els PAMPS presents en els microorganismes a través dels PRR, augmentant la presentació de lípids endògens o microbians a través de CD1d i alliberant IL-12. L'IL-12 juntament amb la senyal del iTCR activen la cèl·lula iNKT, que a la vegada respon incrementant l'expressió de CD40L i alliberant IFN $\gamma$  i IL-17A. El CD40L i l'IFN $\gamma$  produiran un increment en l'activació de la DC i aquesta encara augmentarà més la seva capacitat activadora sobre la cèl·lula iNKT. El resultat d'aquest procés de retroalimentació positiu genera grans quantitats d'IFN $\gamma$  i IL-17A entre d'altres citocines, i aquestes citocines produiran una activació

global de molts altres tipus cel·lulars, entre els quals hi hauran MØ i neutròfils que eliminaran el microorganisme.

El sistema funciona de manera similar amb altres tipus cel·lulars com les cèl·lules NK; l'IL-12 alliberada per les DC i l'IFN $\gamma$  de les iNKT activen les NK, generant una potent resposta antitumoral<sup>157,162</sup>. Les cèl·lules iNKT també poden interaccionar directament amb les cèl·lules B a través de CD1d. En els òrgans limfoides secundaris poden establir una relació similar a la cooperació Tfh-B en la formació dels centres germinals<sup>163</sup>. Les cèl·lules B poden obtenir antígens lipídics que presenten per CD1d a través de dos mecanismes diferents: poden captar els antígens lipídics que es troben units a antígens proteics o haptens a través del BCR, o bé captar els antígens lipídics en les partícules de VLDL a través d'LDL-R. Quan la cooperació iNKT-B es produeix de manera simultània a la cooperació T-B, en la majoria de casos degut a que els antígens lipídics i proteics internalitzats estaven units, es produeix un gran augment en els títols dels anticossos específics contra l'antigen proteic<sup>164</sup>. Tot i que la unió d'un haptè a un agonista lipídic d'iNKT és capaç de produir la formació de centres germinals i la producció d'anticossos anti-lípid, la falta de cooperació Tfh-B impedeix la formació de cèl·lules plasmàtiques de llarga durada, i per tant la generació d'una resposta de memòria<sup>165</sup>. S'ha vist que les cèl·lules iNKT que intervenen en la cooperació iNKT-B comparteixen característiques fenotípiques i funcionals amb les Tfh, com són una elevada expressió del factor de transcripció Bcl-6 i la producció d'IL-21. A part de per interaccions directes a través de CD1d, les iNKT també són capaces d'influir en la resposta B de manera indirecta a través de la producció de citocines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 i IL-21)<sup>1</sup>, i també a través de l'activació per CD40L de les DC que presenten els antígens específics a les Tfh<sup>163</sup>.

### **1.10. Les cèl·lules iNKT en la resposta antitumoral**

Com ja hem vist, la funció de les iNKT està lligada a la resposta antitumoral des dels primers moments de la seva caracterització<sup>19</sup>. Especialment en ratolí existeixen clares evidències que relacionen la presència de les cèl·lules iNKT amb una vigilància immunitària més eficient dels processos tumorals. Son nombrosos els models tumorals

de ratolí on la activació de les iNKT per l'agonista prototípic  $\alpha$ GalCer indueix una potent resposta antitumoral capaç fins i tot d'eliminar completament el tumor<sup>166,167</sup>. S'ha comprovat que els animals que no tenen cèl·lules iNKT degut a que no expressen el segment  $J\alpha 18$  del TCR són més susceptibles a patir alguns tipus de tumors<sup>168,169</sup>, i que la transferència de cèl·lules iNKT en aquests animals restableix la capacitat antitumoral<sup>170</sup>. Comparant l'aparició de tumors en ratolins que no expressen el segment  $J\alpha 18$  del TCR i que per tant no tenen cèl·lules iNKT, amb ratolins que no expressen CD1d i que per tant no tenen cèl·lules iNKT ni tampoc cèl·lules NKT de tipus II, s'ha vist que l'augment en la incidència de tumors és molt similar en els dos casos, fet que recolza la importància de les cèl·lules iNKT en el control dels processos tumorals enfront de les NKT de tipus II. Els mecanismes per els quals en aquests casos, on no hi ha una activació potent amb un lligand conegut, les iNKT controlen l'aparició de tumors encara són en la gran majoria desconeguts<sup>171</sup>.

En estudis realitzats amb ratolins NOD/SCID humanitzats, s'ha demostrat que les cèl·lules iNKT poden controlar el desenvolupament de tumors de manera indirecta eliminant els macròfags associats al tumor<sup>172</sup>. En aquest cas les cèl·lules iNKT són capaces d'exercir una activitat citotòxica directa depenent de CD1d sobre els macròfags. En humans existeixen diversos estudis observacionals que recolzen la funció d'immunovigilància tumoral de les iNKT descrita en ratolins. En aquests estudis veuen com en diversos casos de pacients amb tumors sòlids la freqüència i/o funcionalitat de les cèl·lules iNKT està disminuïda<sup>173-175</sup>, i que una freqüència intratumoral augmentada es relaciona amb un pronòstic més favorable<sup>176</sup>.

L'activació del sistema immune amb  $\alpha$ GalCer i altres agonistes sintètics dóna lloc a potents respostes antitumorals<sup>166,171,177,178</sup>. En la majoria d'aquests casos l'activitat antitumoral no és exercida directament per acció de les iNKT sobre les cèl·lules tumorals, sinó de manera indirecte per l'activació de cèl·lules NK, limfòcits T i B, macròfags i neutròfils<sup>179</sup> i la subseqüent producció de citocines inflammatòries, principalment IFN $\gamma$ . Tot i això també s'ha demostrat la capacitat de les cèl·lules iNKT per actuar de manera citotòxica contra cèl·lules tumorals<sup>180-183</sup>. L'activitat citotòxica de les iNKT contra les cèl·lules tumorals en la majoria de casos és depenent de CD1d, encara que també hi han

cèl·lules iNKT capaces d'exercir una activitat citotòxica de manera independent de iTCR a través de receptors NK com NKG2D<sup>184</sup>. L'activitat citotòxica depenent de CD1d es produeix sobretot a través de la interacció Fas/FasL (CD95/CD178)<sup>182</sup> i en canvi la citotoxicitat depenent d'NKG2D sembla que es porta a terme a través de perforina<sup>184</sup>.

### **1.11. Aplicacions terapèutiques de l'αGalCer**

La gran potència de l'αGalCer per estimular les cèl·lules iNKT de ratolí i d'humà generant una potent activació del sistema immune des del primer moment va conduir a molts investigadors a buscar-ne possibles aplicacions terapèutiques. En poc temps es va demostrar el seu potencial terapèutic en un ampli ventall de models patològics en animals: prevenció de metàstasis<sup>19,185</sup>, reducció de l'encefalomielitis autoimmune experimental (EAE)<sup>186</sup>, diabetis<sup>187,188</sup>, així com per augmentar la resposta enfront d'infeccions víriques<sup>189</sup>, bacterianes<sup>190,191</sup> o parasitàries<sup>192</sup>. A part del seu efecte com a tractament únic, també es va estudiar el seu potencial com a adjuvant en la vacunació, demostrant-se eficaç en diferents vacunes contra microorganismes patògens com *Plasmòdium*<sup>193</sup>, VIH<sup>194</sup> i *Influença*<sup>195,196</sup>. Els resultats no únicament es van aconseguir en vacunes antimicrobianes, també es va demostrar l'efectivitat de l'αGalCer en diversos tipus de vacunes antitumorals<sup>197,198</sup>. En ratolins l'administració en forma lliure d'αGalCer i un antigen tumoral és capaç de generar una resposta antitumoral específica contra diferents tipus de tumors<sup>197-199</sup>, tot i que altres mètodes d'administració encara són més efectius. Un dels mètodes més utilitzats i eficaços és l'administració de l'αGalCer i els antigens tumorals a través de DC. Aquest mètode d'administració genera una resposta de citocines més prolongada i menys anergia en les iNKT<sup>167</sup>, i per tant una resposta antitumoral més potent i la possibilitat de realitzar una segona administració de la vacuna més aviat<sup>200,201</sup>. Altres mètodes d'administració com la càrrega d'αGalCer en cèl·lules tumorals<sup>202,203</sup> o en exosomes<sup>204</sup> també generen respostes antitumorals més efectives que l'administració en forma lliure.

També en humans s'han portat a terme assajos clínics de fase I en pacients oncològics on s'ha administrat el compost directament<sup>205</sup> o bé a través de DC autòlogues

carregades amb  $\alpha$ GalCer<sup>206</sup>. En aquests estudis si bé no s'observa una millora clínica apreciable, si que es detecten signes d'una activació NK i T augmentada, així com d'una major citotoxicitat NK. A més el tractament amb  $\alpha$ GalCer és segur i té uns mínims efectes secundaris. Les raons de la poca eficàcia de l' $\alpha$ GalCer en aquests estudis clínics poden ser múltiples<sup>207</sup>: dosi insuficient, variabilitat entre individus, baixos nivells de cèl·lules iNKT en humans i que en el cas d'un càncer encara disminueixen més, avançat estat de la malaltia i producció d'IL-10<sup>208</sup>. En el cas del tractament amb DC autòlogues també s'hi afegeix la dificultat per obtenir suficients monòcits precursors de DC en pacients de càncer que es troben immunodepromits. Una altra estratègia que s'ha utilitzat és la transferència de cèl·lules iNKT autòlogues expandides *in vitro*, però encara que genera un augment en el nombre de cèl·lules iNKT circulants i en els nivells en sang d'IFN $\gamma$  tampoc aconsegueix una resposta clínica significativa. Un tractament combinat entre DC autòlogues carregades amb  $\alpha$ GalCer i cèl·lules iNKT autòlogues expandides *in vitro*, si que ha estat capaç de produir una regressió en el creixement del tumor en alguns pacients amb carcinoma escamós (*head and neck squamous cell carcinoma*)<sup>209,210</sup>.

Malgrat l'existència d'alguns resultats esperançadors la resposta produïda per l'  $\alpha$ GalCer presenta inconvenients que limiten el seu ús terapèutic:

- Resposta Th0: L'administració d' $\alpha$ GalCer genera l'alliberació de molts tipus de citocines, algunes de les quals realitzen funcions antagòniques (Th1,Th2,Th17). Aquest fet disminueix l'especificitat del tractament, i pot ser més propens a generar efectes imprevistos<sup>211</sup>.
- Resposta de tipus superantigen: La resposta de gran potència amb l'alliberació de molts tipus de citocines amb funcions antagòniques induïda per l' $\alpha$ GalCer, genera un estat d'activació inespecífica i generalitzada en el sistema immune similar al que es produeix amb l'administració dels superantígens<sup>212</sup>.
- Anergia Funcional: Quan s'activen les iNKT amb  $\alpha$ GalCer, aquestes entren en un estat d'anergia funcional durant el qual responen amb una intensitat molt menor a un segon estímul a través del iTCR<sup>212</sup>. Aquest període de temps pot ser superior a un mes. Els mecanismes per els qual es produeix l'anergia no estan gaire clars, tot i que es coneix que a major intensitat de l'estímul major és el nivell d'anergia

que experimenten les iNKT. La intensitat de l'estímul està directament relacionada amb l'afinitat del complex CD1d-Antígen per el iTCR. El receptor PD1 ràpidament augmenta la seva expressió després de l'estimulació amb  $\alpha$ GalCer i pot estar implicat en el manteniment de l'estat d'anergia<sup>213</sup>. Estudis recents han demostrat que l'estat d'anergia funcional que experimenten les cèl·lules iNKT després de l'estimulació amb  $\alpha$ GalCer, pot ser degut en part a l'adquisició d'un fenotip NKT10 per part d'alguna de les altres poblacions<sup>208</sup>

### **1.12. Anàlegs sintètics de l' $\alpha$ GalCer**

Amb l'objectiu de millorar les propietats terapèutiques de la manipulació de les iNKT molts grups van treballar en la recerca de nous agonistes que solucionessin alguns dels problemes inherents a la funcionalitat de l' $\alpha$ GalCer, i que focalitzessin la resposta en la direcció apropiada a cadascuna de les possibles aplicacions desvetllades per els models de ratolí. Alguns d'ells van optar per buscar molècules naturals presents en microorganismes capaces d'activar les iNKT. S'han trobat diversos compostos d'origen microbià<sup>128,130-132,214</sup>, (la gran majoria glicolípid amb enllaç  $\alpha$ -glicosídic) capaços d'estimular les iNKT, tot i que de moment cap d'ells mostra unes propietats terapèutiques superiors a les de l' $\alpha$ GalCer. Altres grups van optar per a crear nous compostos sintètics en base a l'estructura de l' $\alpha$ GalCer, afegint, eliminant o modificant determinades parts de la molècula. Aquesta segona aproximació és la que serveix de punt de partida per al desenvolupament del present treball.

Partint de l'estructura molecular de l' $\alpha$ GalCer, diversos grups d'investigació han desenvolupat una gran varietat de compostos anàlegs. Aquests anàlegs presenten modificacions respecte de l' $\alpha$ GalCer en una o varies de les tres parts principals en les que es divideix la molècula; el sucre del cap polar, l'enllaç O-glicosídic i la cua lipídica. Aquestes modificacions funcionalment es tradueixen en variacions quantitatives i qualitatives de l'activitat de molt diversa índole.



- Modificacions en les cadenes lipídiques: Les majoria d'alteracions en les cadenes lipídiques dels anàlegs amb activitat funcional consisteixen bàsicament en la introducció d'insaturacions o en l'escurçament en el nombre de C d'una o de les dos cadenes. Aquestes modificacions normalment generen compostos més hidrosolubles i funcionalment es tradueixen en una resposta de tipus Th2. El primer d'aquests compostos que es va publicar va ser l'OCH<sup>215</sup>, que presenta una cadena d'esfingosina escurçada respecte de l'estructura de l' $\alpha$ GalCer i és capaç de generar una resposta de tipus Th2 que inhibeix el desenvolupament d'EAE. Aquest anàleg en humans no és efectiu ja que no produeix la desviació de la resposta cap a Th2. Un altre anàleg amb una de les cadenes lipídiques més curta que genera una potent resposta de tipus Th2 és el C20:2<sup>68,216</sup>, que té una cadena d'àcid gras escurçada de 20 àtoms de carboni i dos insaturacions, i quan s'administra en ratolins NOD és capaç de retardar l'aparició i reduir la incidència de la diabetis<sup>217</sup>. Altres compostos similars al C20:2 que també presenten cadenes d'àcid gras escurçades com el C20:4 i el C10:0 també generen una resposta de citocines exclusivament de tipus Th2<sup>68</sup>. A part dels compostos esmentats també existeixen molts altres compostos amb cadenes lipídiques escurçades o modificades que generen una resposta de tipus Th2<sup>68</sup>. També s'han generat altres compostos amb modificacions més complexes com és el cas d'una sèrie d'anàlegs que contenen grups fenil en la cadena d'esfingosina<sup>218</sup>. Alguns d'aquests anàlegs amb grups fenil indueixen potents respostes de tipus Th1. Aquests compostos a través dels grups fenil estableixen més contactes amb el CD1d i per tant l'estabilitat del complex CD1d-antigen-iTCR augmenta, generant una interacció més prolongada que afavoreix la producció d'una resposta Th1. Un d'aquests anàlegs, el 7DW8-5 és actiu en humans i ha generat bons resultats en estudis pre-clínics com a adjuvant en vacunes contra la malària o el VIH<sup>219,220</sup>.
- Modificacions en l'enllaç O-glicosídic: La naturalesa de l'enllaç entre el sucre i el component lipídic també juga un paper important a l'hora de determinar les propietats activadores sobre les iNKT. Les modificacions en aquesta part de la molècula consisteixen en substituir l'enllaç O-glicosídic per un altre tipus d'enllaç menys sensible a la degradació enzimàtica, produïnt compostos amb una vida

mitja més llarga en l'organisme<sup>221</sup>. L'exemple més conegut és el de la  $\alpha$ -C-GalCer<sup>162</sup>, en el que l'enllaç O-glicosídic és substituït per un enllaç C-glicosídic. Aquesta modificació funcionalment genera una desviació de la resposta cap a Th1, i una major activitat antitumoral i antimalària que l' $\alpha$ GalCer. Els mecanismes per els quals es produeix una resposta Th1 en aquest cas no estan gaire clars, tot i que s'ha hipotetitzat que podria ser degut a la major resistència a la hidròlisi, permetent que el compost actuï durant més temps, generant una major activació de les cèl·lules NK i per tant una major producció d'IFN $\gamma$ . En humans l' $\alpha$ -C-GalCer no és pràcticament actiu, demostrant que tot i les grans similituds estructurals i d'interacció del complex CD1d-antigen-iTCR d'humà i ratolí, la reactivitat de les iNKT no és totalment equivalent.

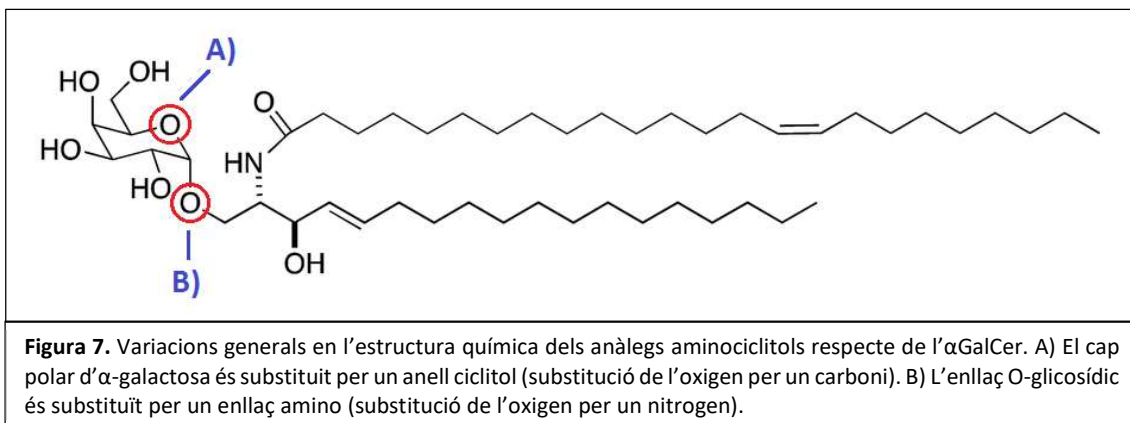
- Modificacions en el sucre del cap polar: Les modificacions en l'orientació del cap polar d' $\alpha$ -Galactosa a  $\beta$ -Galactosa, produeixen una pèrdua gairebé total de l'activitat funcional<sup>222</sup>, segurament perquè l'orientació diferent del sucre elimina totalment la configuració habitual de ponts d'hidrogen entre l'antigen i el iTCR. Les modificacions en el sucre poden ser molt diverses i també generen una gran diversitat funcional. Les més habituals són les que afecten als grups OH del cap polar o a la naturalesa de l'anell del sucre, havent-hi publicats una gran quantitat d'anàlegs amb aquest tipus de modificacions<sup>223-225</sup>. Les modificacions en els grups OH del sucre solen modificar l'afinitat del complex CD1d-antigen per el iTCR, per el contrari les modificacions en la naturalesa de l'anell disminueixen la degradació enzimàtica del compost. En el complex CD1d- $\alpha$ GalCer-iTCR, l' $\alpha$ -Galactosa de l' $\alpha$ GalCer forma tres ponts d'hidrogen amb el iTCR a través dels grups OH 2'', 3'' i 4''. Els compostos amb modificacions que afecten al grup 2''-OH pateixen una pèrdua gairebé total de l'activitat funcional<sup>226</sup>, en canvi si les modificacions afecten als grups 3'' i 4''-OH l'activitat disminueix degut a la pèrdua d'afinitat, però no s'elimina<sup>227,228</sup>. Aquest és el cas dels anàlegs 3',4''-deoxy- $\alpha$ GalCer i 4',4''-deoxy- $\alpha$ GalCer que perden els contactes amb el iTCR a través dels grups de la galactosa 3''-OH i 4''-OH respectivament, i l'afinitat del iTCR per el complex CD1d-antigen es redueix considerablement<sup>227,229</sup>. Aquests dos compostos mostren una capacitat per induir la producció de citocines *in vitro*

molt menor que l' $\alpha$ GalCer, encara que conserven bona part de la capacitat per expandir les iNKT. El grup 6''-OH, que en el complex CD1d- $\alpha$ GalCer-iTCR no interacciona amb el iTCR, permet modificacions relativament grans sense comprometre el reconeixement ni l'activitat funcional. Per exemple l'addició d'un petit fluorofor en aquesta posició, que permet visualitzar la posició de l' $\alpha$ GalCer, no modifica significativament les capacitats per estimular les iNKT<sup>230</sup>. Un altre compost, el  $\alpha$ GalCerMPEG incorpora una molècula de PEG (*polyethylene glycol*) en la posició 6''-OH i això produeix un augment en la solubilitat de la molècula<sup>231</sup>. El  $\alpha$ GalCerMPEG reté les propietats funcionals de l' $\alpha$ GalCer, i fins i tot es mostra més efectiu en la generació d'anticossos contra  $\beta$ -galactosidasa quan s'administra com a adjuvant. El compost NU- $\alpha$ GalCer incorpora un grup *naphthylurea* en la posició 6''-OH relativament gran, manté els mateixos contactes amb el iTCR que l' $\alpha$ GalCer i a través del grup *naphthylurea* genera un nou pont d'hidrogen entre l'antigen i el CD1d que atorga estabilitat al complex i allarga la vida mitja del compost<sup>232</sup>. Funcionalment aquesta modificació es tradueix en una resposta de citocines *in vivo* desviada cap a Th1 degut a la disminució de la producció de IL-4. Un altre anàleg amb una modificació en el grup 6''-OH que també produeix una potent resposta de tipus Th1 és el PyrC- $\alpha$ GalCer, que incorpora un grup carbamat en la posició 6''-OH que també genera noves interaccions, però en aquest cas amb el iTCR<sup>233</sup>.

### **1.13. Anàlegs aminociclitols de l' $\alpha$ GalCer**

En el nostre laboratori conjuntament amb el laboratori de Química Bioorganica del CSIC de Barcelona hem desenvolupat dos noves sèries d'anàlegs sintètics de l' $\alpha$ GalCer, la primera amb un cap polar anàleg a la glucosa, i la segona amb un cap polar anàleg a la galactosa. Tots aquests compostos presenten dos diferències bàsiques respecte a l'estructura de l' $\alpha$ GalCer, l'oxigen de l'enllaç O-glicosídic és substituït per un nitrogen i l'oxigen de l'anell del sucre per un carboni, motiu per el qual s'anomenen aminociclitols (Fig.7). Aquestes dos modificacions fan els anàlegs totalment resistents a l'acció de les

glucosidases, potencialment incrementant la vida mitja de la molècula en l'organisme i sobretot del complex CD1d-anàleg, permetent que actuïn durant més temps. La substitució del sucre per un anell carbociclitol hauria de mantenir les propietats d'interacció del compost amb el CD1d i el iTCR. A part de les modificacions comunes en tots els aminociclitols, cada un d'ells també posseeix modificacions específiques en el cap polar, en la direcció de l'enllaç entre el cap polar i la cua lipídica o en la longitud de la cua d'àcid gras.



En un estudi previ fet en el nostre laboratori es demostra que alguns d'aquests lligands activen a les iNKT en assajos *in vitro*<sup>234</sup>. En aquests assajos utilitzant esplenòcits de ratolí demostra que el lligand més actiu, l'HS44, és capaç d'induir l'expansió de les cèl·lules iNKT i la secreció de citocines, encara que molt més dèbilment que l' $\alpha$ GalCer. Tot i això l'administració del HS44 en ratolins indueix una alliberació d'IFN $\gamma$  similar a la de l' $\alpha$ GalCer<sup>224</sup>, però amb la diferència que la producció de citocines de tipus Th2 és molt menor, produït per tant una resposta de perfil Th1. Enfront el model de metàstasi pulmonar B16 el tractament amb HS44 és capaç de generar una resposta antitumoral similar a la de l' $\alpha$ GalCer. Els estudis biofísics dels complexos CD1d-antigen-iTCR mostren que l'afinitat del iTCR per el CD1d-HS44 és menor que per el CD1d- $\alpha$ GalCer, i l'estructura cristal·logràfica del complex revela que aquest fet és degut principalment a la pèrdua d'un pont d'hidrogen entre l'antigen i el iTCR. Tot i la menor capacitat d'estimulació *in vitro* i la menor afinitat del iTCR per el HS44, probablement la major resistència del HS44 a la degradació endògena degut a la seva estructura aminociclitòlica, li permet actuar *in vivo* durant més temps generant una resposta igual de potent que l' $\alpha$ GalCer. La menor

solubilitat de la molècula, fa que segurament el HS44 sigui més depenent de la via de presentació intracel·lular que l' $\alpha$ GalCer, fet que juntament amb l'alteració del sucre del cap polar pot contribuir a produir una resposta desviada cap a Th1.

En un altre estudi també realitzat per el nostre grup es demostra que l'AC11, un dels anàlegs aminociclitols de la segona sèrie que tenen un cap polar que mimetitza a la galactosa, genera una resposta de citocines *in vitro* i *in vivo* més potent que la de l'HS44<sup>235</sup>.

### 2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

La hipòtesi inicial, d'imprescindible comprovació per al posterior desenvolupament del treball, era que alguns dels anàlegs aminociclitols haurien de poder presentar-se a través de CD1d i ser reconeguts i estimular a les cèl·lules iNKT de ratolí. Conseqüentment, considerant la conservació estructural i funcional entre espècies de les iNKT i del reconeixement del complex CD1d-ligand, aquests anàlegs també haurien de poder ser reconeguts per les iNKT humanes, i per tant ser d'interès per a una possible translació clínica. Com a conseqüència de l'activitat funcional del lligand prototípic  $\alpha$ GalCer i d'altres agonistes coneguts, vam hipotetitzar que el reconeixement d'aquests nous anàlegs i l'activació de les iNKT haurien de tenir efectes rellevants en la resposta immune que permetessin la seva aplicació en models de tumor animals.

Per tant, ens vam a plantejar els següents objectius concrets:

- Determinar quins dels nous anàlegs aminociclitols són reconeguts per les cèl·lules iNKT de ratolí i la seva potència.
- Comprobar el reconeixement i resposta per part de les cèl·lules iNKT humanes dels anàlegs reconeguts en ratolí.
- Caracterització a nivell cel·lular i de citocines i quimiocines, de la resposta immune induïda *in vivo* per l'anàleg més potent en ratolí.
- Estudi de l'inducció d'una resposta antitumoral contra un model de tumor de ratolí, i caracterització de les poblacions efectores implicades.
- Estudi del possible ús del anàleg més potent com a adjuvant en la generació d'una resposta específica en la vacunació antitumoral.
- Estudi del possible efecte sinèrgic dels agonistes iNKT en l'acció depleccionat dels anticossos anti-CD20 contra un model de limfoma de ratolí.

## 2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

#### 3. ANIMALS, MOSTRES, MATERIALS Y MÈTODES

##### 3.1 $\alpha$ GalCer, anàlegs aminociclitols i manipulació

L' $\alpha$ GalCer que hem utilitzat és un anàleg sintètic del compost originalment aïllat, anomenat KRN7000 ( $C_{50}H_{99}NO_9$ ). L' $\alpha$ GalCer s'utilitza a partir d'un estoc a 200ng/ $\mu$ l (H<sub>2</sub>O MQ, 20%DMSO, 5% sucrosa).

Els anàlegs aminociclitols utilitzats han estat AC11 ( $C_{51}O_7N_2H_{102}$ ), AC16 ( $C_{50}O_6N_2H_{98}$ ), AC19 ( $C_{50}O_6N_2H_{100}$ ), AC18 ( $C_{51}O_8N_2H_{102}$ ) i HS44 ( $C_{50}O_7N_2H_{100}$ ). Han estat sintetitzats en el laboratori RUBAM del l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC). Tots s'han utilitzat a partir d'un estoc que es troba en solució a una concentració de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l en DMSO absolut.

Abans d'utilitzar tant l' $\alpha$ GalCer com els anàlegs sintètics s'ha escalfat l'estoc al bany a 37°C durant 15 min, i després s'ha realitzat un vòrtex durant 30 segons.

En els cultius *in vitro* els compostos s'han afegit en solució en el medi de cultiu. El medi de cultiu conté un 2% de metanol per augmentar la solubilitat dels compostos.

En els experiments *in vivo* els compostos s'han administrat utilitzant PBS 2,5%DMSO.

##### 3.2 Animals i manutenció

Els animals utilitzats han estat ratolins de la soca C57BL/6J, d'una edat compresa entre les sis i dotze setmanes. Han sigut utilitzats tan mascles com femelles. Els animals han estat criats i manipulats al servei d'estabulari de la UAB, seguint els protocols aprovats per el comitè d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana de la UAB. El sacrifici dels animals s'ha realitzat en la majoria de casos per asfixia amb CO<sub>2</sub>, i en alguns casos en funció del protocol també per dislocació cervical. En aquests animals l'administració de substàncies i cèl·lules per via intraperitoneal i intravenosa s'ha realitzat sempre en un volum total de 200 $\mu$ l, i en les administracions subcutànies el volum injectat ha sigut de 100 $\mu$ l.



#### **3.3 Mostres de sang perifèrica humana**

Les mostres de sang perifèrica humana utilitzades en els experiments s'han extret d'un donant voluntari al SAS (Servei Assistencial de Salut) de la UAB. L'extracció s'ha realitzat seguint els protocols aprovats per el comitè d'Ètica en l'experimentació Animal i Humana de la UAB.

#### **3.4 Processament dels teixits de ratolí i obtenció de leucòcits**

##### **3.4.1 Peritoneu**

En el ratolí prèviament sacrificat per asfíxia amb CO<sub>2</sub>, es realitza un tall a la pell de la panxa i es retira la pell circumdant al tall, deixant el peritoneu a la vista. Amb una xeringa amb agulla de 27G s'introdueixen 4ml de PBS a 4°C a la cavitat peritoneal. Després es realitza un massatge peritoneal per assegurar la correcta distribució del PBS per total la cavitat. Finalment amb una xeringa amb agulla de 21G recuperem 1-2ml del PBS mesclat amb les cèl·lules del Peritoneu.

##### **3.4.2 Melsa**

Amb el ratolí sacrificat i posicionat de panxa amunt i amb el cap en posició contrària a l'investigador s'obre la cavitat peritoneal, la melsa es localitzarà per sobre els intestins, al costat dret de l'estomac. Retirem la melsa i la posem en PBS a 4°C fins al moment abans de processar. Per a processar la melsa la retirarem del PBS i la dipositarem en una placa p24 de fons pla juntament amb un tros de malla de niló (1cm<sup>2</sup> i 100µm de porus). Hi afegirem 1ml de PBS. Amb l'ajuda d'un èmbol de xeringa de 5ml dissociarem completament la melsa.

##### **3.4.3 Medul·la Òssia**

Amb el ratolí mort es fa un tall a la pell del abdomen i es remou tota la pell de la part distal de l'animal (la contrària al cap) deixant les extremitats posteriors lliures de pell. Tallant amb les tisores es separen els músculs que envolten el fèmur. Amb molta cura es disloca el cap del fèmur del maluc. Després es tallen la tíbia i el peroné per la meitat,

quedant-nos amb el fèmur unit a la part alta de la tíbia per els lligaments del genoll. Amb les tisores es tallen els lligaments que uneixen la tíbia amb el fèmur i es diposita el fèmur en un eppendorf amb PBS a 4°C. Posteriorment es remouen les parts de múscul que encara es troben unides al fèmur amb un bisturí i unes pinces, deixant l'ós completament net. Després es tallen les dos epífisis. S'introdueix l'agulla (27G) d'una xeringa de 5ml omplerta amb 4 ml de PBS per un dels dos costats i es fan passar a pressió 2ml de PBS a través del moll de l'ós. El líquid resultant es recull en un tub de 5ml i es repeteix el procés per l'altre forat obtenint així les cèl·lules presents en la medulla òssia.

#### **3.4.4 Sang**

##### **- 3.4.4.1 Leucòcits**

La sang s'extreu del ratolí a través de la vena submandibular. Amb una agulla de 27 o 30G es realitza una petita punció a la vena i la sang es diposita en un eppendorf prèviament omplert amb 500µl de buffer de citrats (0,01 M de citrat de sodi amb 0.01 M d'àcid cítric a una proporció de 1:4 i pH a 5,6) que impedeix la coagulació de la sang. Es centrifuga l'eppendorf (5min, 168g), s'elimina el sobrenedant i es re-suspèn en 0,5 ml de buffer de lisi (*SIGMA Red Blood Cell Lysing Buffer*) durant 3min. S'atura la reacció afegint 0,5 ml de PBS. Es centrifuga (5min, 168g), s'elimina el sobrenedant i es re-suspèn en 1ml de PBS.

##### **- 3.4.4.1 Sèrum**

La sang extreta es diposita en un eppendorf i es deixa 30 min a T.A per a que coaguli. Després es centrifuga l'eppendorf amb la sang 5 min a 1000-2000g, i es recupera el sèrum que és la fracció corresponent al sobrenedant. La mostra de sèrum es conserva a -20°C.

#### **3.5 Processament de sang perifèrica humana**

Partint de 20ml de sang perifèrica amb heparina sòdica obtinguda en el SAS de la UAB, es dilueix la sang a la meitat amb PBS. Amb 20 ml de sang diluïda es realitza un gradient

de ficoll (*Lymphoprep Axis-Shield PoC AS*) 30 min a 600g a T.A. Es recupera la interfase on hi han les cèl·lules mononuclears i es renten dos vegades per centrifugació (5min, 168g) amb RPMI complet. Les cèl·lules resultants ja poden ser utilitzades per a experiments o be ser crio preservades.

#### **3.6 Línies cel·lulars i models tumorals utilitzats**

- *RMA*: Es una sublínia que deriva de la línia RBL-5, un limfoma T de la soca C57BL/6J induït per el virus de la leucèmia de ratolí de Rauscher. Cedida per: Dra. Pilar Lauzurica.
- *RMA-S*: Variant de la línia RMA que expressa molt baixos nivells de MHC-I en superfície. Porta una mutació en el gen TAP-2 que impedeix el transport de pèptids del citosol cap al reticle endoplasmàtic, generant molècules d'MHC-I buides i inestables. Cedida per: Dra. Pilar Lauzurica.
- *A20*: Línia derivada d'un limfoma de cèl·lules B provinent de la soca de ratolí BALB/C. Cedida per: Dr. Mitchel Kronenberg
- *A20-mCD1d*: Línia A20 transfectada amb un plasmidi que conté el cDNA del gen de CD1D1 de ratolí. Cedida per: Dr. Mitchel Kronenberg
- *B16-F10*: Línia de melanoma de C57BL/6J. Deriva de la línia MB-16. Cedida per: Dra. Pilar Lauzurica.
- *EL-4*: Línia cel·lular derivada d'un limfoma T de la soca C57BL/6. Cedida per: Dr. Ignacio Melero.
- *EG-7*: Prové de la línia EL-4 transfectada amb el plasmidi pAc-neo-OVA que porta una còpia del gen de l'ovoalbúmina (OVA) del pollastre. L'OVA és sintetitzada de forma constitutiva en el citosol. Cedida per: Dr. Ignacio Melero.
- *C1R*: Línia limfoblàstica de cèl·lules B humanes transformada amb el virus d'Epstein-Barr. Cedida per: Dr. Steve Porcelli.
- *C1RmCD1d*: Línia C1R transfectada amb un vector retroviral que conté el cDNA del gen humà de CD1D. Cedida per: Dr. Steve Porcelli.
- *BL3750*: No és una línia cel·lular. Són cèl·lules d'un limfoma extremitat d'un nòdul limfàtic adenopàtic del ratolí transgènic E $\mu$ -myc (*B6.Cg-Tg(IghMyc)22Bri/J*).

L'expansió d'aquestes cèl·lules es realitza extraient-les a un ratolí E $\mu$ -myc i inoculant-les a un ratolí C57BL/6 per via i.v. Cedides per: Dr. J.A. Villadangos.

- Hibridomes iNKT: p5c7, t9c1, p60c6, p33c8. Generats en el nostre laboratori.

#### **3.7 Cultiu de les línies cel·lulars**

Les línies cel·lulars utilitzades han estat cultivades en medi RPMI-1640 Glutamax 10% FBS y 50 $\mu$ M 2-mercaptoetanol (RMA, RMA-S, B16, EG-7, E $\mu$ -myc, C1R-hCD1d i els hibridomes de cèl·lules iNKT) o en DMEM suplementat amb L-glutamina 5%FBS i 50 $\mu$ M 2-mercaptoetanol (A20, A20-mCD1d, RMA-S, RMA-SmCD1d). Tots els cultius s'han mantingut a l'incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. En cap cas s'ha afegit antibiòtic en el medi de cultiu.

#### **3.8 Assajos *in vitro* de presentació amb hibridomes**

Les cèl·lules utilitzades com a APCs (RMA-S, RMA-SmCD1d, A20, A20mCD1d) i que es troben en fase exponencial de creixement, son plaquejades en p96 amb medi RPMI complet a una concentració de 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cel/ml i un volum total de 100 $\mu$ l. Seguidament s'afegeixen els anàlegs sintètics o l' $\alpha$ GalCer en 20 $\mu$ l de RPMI complet amb DMSO, arribant a una concentració final en cada pou del 2,5% DMSO i concentracions de compost que varien entre 1 i 1000ng/ml. Les cèl·lules amb els compostos es deixen a l'incubador (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) durant 2h. A continuació s'afegeixen a cada pou 5 $\times$ 10<sup>4</sup> hibridomes d'iNKT (p5c7, t9c1, p60c6, p33c8). Es posa la placa a l'incubador a 37°C i 5%CO<sub>2</sub>. A les 12 i/o 24h s'extreu el sobrenedant i es guarda al congelador a -20°C. Posteriorment els sobrenedants seran utilitzats per a mesurar la presència d'IL-2 per ELISA.

### 3.9 Citometria de fluxe

Les citometries s'han realitzat utilitzant plaques p96 de fons en V. Per a realitzar els rentats i dissoldre els anticossos s'ha utilitzat com a buffer PBS 2% FBS, 2mM EDTA. En les mostres de teixits que contenen sang (melsa i fetge), es realitza la lisi dels eritròcits després de posar les mostres en la placa utilitzant buffer de lisi (*Lysing Buffer*). S'han bloquejat els receptors Fc utilitzant Anti-CD16/CD32 (*Milteny biotech*). Les cèl·lules mortes s'han exclòs amb 7-AAD. S'han utilitzat els citòmetres *FACSCanto* (*BD Biosciences*) i *FACSCalibur* (*BD Biosciences*). L'anàlisi de les dades s'ha realitzat amb el programa FlowJo V10 (*TreeStar*).

#### 3.9.1. Anticossos utilitzats

Antígen	Clon	Espècie	Fluorocrom	Casa comercial
CD3	HIT3b	humà	FITC	<i>ImmunoTools</i>
CD4	GK1.5	Ratolí	FITC	<i>eBioscience</i>
CD4	H129.19	Ratolí	FITC	<i>eBioscience</i>
CD49b	DX5	Ratolí	FITC	<i>MiltenyBiotec</i>
CD49b	DX5	Ratolí	FITC	<i>eBioscience</i>
CD86	FM95	Ratolí	FITC	<i>MiltenyBiotec</i>
F480	BM8	Ratolí	FITC	<i>eBioscience</i>
TCRb	REA-318	Ratolí	FITC	<i>MiltenyBiotec</i>
TCRb	H5-597	Ratolí	FITC	<i>eBioscience</i>
TCRγδ	REA591	humà	FITC	<i>MiltenyBiotec</i>
CD11b	M1/70.15.11.5	Ratolí	PE	<i>MiltenyBiotec</i>
IAb	REA-525	Ratolí	PE	<i>MiltenyBiotec</i>
IL-4	11B11	Ratolí	PE	<i>BD Pharmigen</i>
NK1.1	PK136	Ratolí	PE	<i>MiltenyBiotec</i>
TCRb	H5-597	Ratolí	PE	<i>eBioscience</i>
CD11c	N418	Ratolí	PerCp	<i>eBioscience</i>
IFNγ	XMG1.2	Ratolí	PerCp	<i>BD Pharmigen</i>
CD3	HIT3b	humà	APC	<i>ImmunoTools</i>
CD19	6D5	Ratolí	APC	<i>MiltenyBiotec</i>
CD69	H1.2F3	Ratolí	APC	<i>MiltenyBiotec</i>
CD279/ PD1	HA2-7B1	Ratolí	APC	<i>MiltenyBiotec</i>
GR1	RB6-815	Ratolí	APC	<i>eBioscience</i>
CD11b	M1/70.15.11.5	Ratolí	PEVio770	<i>MiltenyBiotec</i>
CD49b	DX5	Ratolí	PEVio770	<i>MiltenyBiotec</i>
NK1.1	PK136	Ratolí	PEVio770	<i>MiltenyBiotec</i>
TCRb	REA-318	Ratolí	PEVio770	<i>MiltenyBiotec</i>
CD8	53-6.7	Ratolí	Biotina	<i>BD Pharmigen</i>

**3.9.2. Tetràmers utilitzats**

Composició	Nom comercial	Espècie	Fluorocrom	Casa comercial
Tetràmer d'MHCI	H-2K(b) SIINFEKL	Ratolí	A488	<i>NIH tetramer core facility</i>
Tetràmer de CD1d	CD1d-PBS57	Ratolí	PE	<i>NIH tetramer core facility</i>
Tetràmer de CD1d	CD1d-PBS57	Humà	PE	<i>NIH tetramer core facility</i>
Tetràmer de CD1d	CD1d-PBS57	Ratolí	A647	<i>NIH tetramer core facility</i>
Tetràmer de CD1d	CD1d-PBS57	Ratolí	APC	<i>NIH tetramer core facility</i>
Tetràmer d' MHCI	H-2K(b) SIINFEKL	Ratolí	APC	<i>NIH tetramer core facility</i>

**3.9.3. Protocol de citometria de fluxe:**

1. Posar una quantitat de cèl·lules a marcar d'entre  $5 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$  en plaques de 96 pouets de fons en V.
2. Fer arribar amb PBS el volum de tots els pouets a 200µl.
3. Centrifugar 5 min a 168g.
4. En cas de que la mostra contingui eritròcits resuspendre en 60µl de buffer de lisis i deixar actuar durant 3 min a 4°C.
5. Aturar la reacció afegint 120µl de PBS(2%FBS,2mM EDTA) per pouet.
6. Centrifugar 5 min a 168g.
7. Resuspendre en 20ul de PBS (2%FBS,2Mm EDTA) amb AntiCD16-CD32.
8. Deixar la placa 15 min a 4°C.
9. Afegir 160 ul de PBS (2%FBS, 2Mm EDTA) per pouet.
10. Centrifugar 5 min a 168g.
11. Afegir els anticossos o el tetràmer dil·luïts en 20ul de PBS (2%FBS, 2mmEDTA).
12. Deixar 15min a 4°C en cas que s'hagin afegit anticossos, 30min a T.A si s'ha afegit tetràmer de CD1d amb αGalCer o 30min a 4°C si s'ha afegit tetràmer d'MHCI amb SIINFEKL.
13. Afegir 160ul de PBS (2%FBS, 2Mm EDTA) per pouet.
14. Centrifugar 5min a 168g.
15. Resuspendre en 20ul PBS (2%FBS, 2mmEDTA) per pouet amb anticossos (si es cau).
16. Deixar 15 min a 4°C.
17. Afegir 160ul de PBS (2%FBS, 2 mmEDTA) per pouet.

18. Centrifugar 5 min a 168g.
19. Resuspendre en 180ul de FACS buffer.
20. Pasar las cèl·lules per el citòmetre.

#### **3.10. ELISA**

L'ELISA de les citocines IFN $\gamma$ , IL-4 i IL-2 s'ha realitzat utilitzant el kit *Mouse ELISA Ready-Set-Go (eBioscience)* específic per a cada una d'elles. En el cas de l'ELISA de la quimiocina CXCL9 s'ha utilitzat el kit *Mouse CXCL9/MIG DuoSet ELISA (R&D Systems)*. La lectura de les mostres s'ha realitzat amb l'aparell *VICTOR<sup>3</sup>V (PerkinElmer)*. L'anàlisi dels resultats s'ha portat a terme amb el *Microsoft Office Excel 2007* i el *GraphPadPrism 5*.

##### **3.10.1. Protocol d'ELISA (*eBiosciende Ready-SET-Go!* i *R&D Systems duoset MIG*):**

1. Posar 100 $\mu$ l/pouet d'anticòs de detecció diluït en tampó de recobriment (*Coating Buffer*) a la concentració indicada en el kit en plaques d'ELISA de 96 pouets.
2. Incubar la placa durant 12h a 4°C i protegida de la llum.
3. Realitzar tres rentats amb *Wash Buffer* (PBS 0,05% Tween20).
4. Bloquejar els pouets amb 200  $\mu$ l d'*Assay Diluent*  $\times$ 1.
5. Incubar durant 1h a T.A (temperatura ambient).
6. Realitzar tres rentats amb *Wash Buffer*.
7. Posar en la placa 100 $\mu$ l de les mostres dissoltes en *Assay Diluent*.
8. Deixar incubar la placa durant 12h a 4°C i protegida de la llum.
9. Realitzar tres rentats amb *Wash Buffer*.
10. Posar 100 $\mu$ l de l'anticòs de detecció dissolt en *Assay Diluent* a la concentració indicada en el kit i deixar incubar 1 hora a T.A.
11. Realitzar tres rentats amb *Wash Buffer*.
12. Posar 100 $\mu$ l d'*Avidin-Horse Radish Peroxidase* (HRP) a la concentració indicada en el kit.

13. Incubar durant 30 min a T.A protegida de la llum.
14. Realitzar cinc rentats amb *Wash Buffer*.
15. Afegir 100µl de *Substrate Solution*.
16. Deixar la placa a T.A durant aproximadament 15 min (parar abans la reacció si puja molt el color).
17. Afegir 50µl de *Stop Solution* (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N).
18. Realitzar la lectura de l'absorbància a 450 nm y 570 nm.

#### **3.11 Generació d'una línia RMA deficient en CD1d**

En el servei de *Tissue Engineering Unit* del *CRG* (Barcelona) partint del plasmidi comercial *pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)*, el qual incorpora tots els components del sistema CRISPR-CAS9, hi van introduir dos gRNA específics per a eliminar el gen CD1D1 de ratolí. Utilitzant aquest plasmidi vam transfectar per electroformació la línia RMA (*BTX<sup>TM</sup>-Herbert Aparatos ECM<sup>TM</sup> 630 Exponencial Decau Wade Electroporator*). A les 48h vam realitzar una selecció per sorting (*BD FACSJazz*) de les cèl·lules GFP+. Al cap de 7 dies vam realitzar un segon sorting en base a l'expressió negativa de CD1d.

##### **3.11.1. Protocol de transfecció i selecció de les cèl·lules RMA CD1d<sup>-/-</sup>**

1. Mantenir les cèl·lules que s'han de transfectar en fase exponencial de creixement.
2. Recuperar-ne un volum corresponent a 10<sup>7</sup> cèl·lules totals.
3. Realitzar dos rentats de les cèl·lules amb PBS.
4. Deixar les cèl·lules a una concentració final de 2×10<sup>7</sup> cel/ml en PBS en un volum total de 500µl.
5. Afegir a les cèl·lules 15µg de plasmidi.
6. Mesclar amb la pipeta.
7. Transferir les cèl·lules amb el plasmidi a una cuvetta d'electroporació de 4mm.
8. Deixar 10 min a 4°C.



9. Assecar la cuvetta amb paper.
10. Posar la cuvetta en l'aparell d'electroporació (*Exponential Decay Wave Generator - ECM<sup>®</sup> 630*).
11. Introduir les següents condicions en l'aparell: 250V, 960F,  $\infty\Omega$ .
12. Iniciar el programa.
13. Un cop finalitzat el programa deixar la cuvetta 10 min a T.A.
14. Eliminar el sobrenedant blanc (restes cel·lulars).
15. Recuperar la part líquida corresponent a les cèl·lules vives i transferir a una placa de cultiu de 10 ml amb medi de cultiu.
16. Posar la placa a l'incubador durant 48 hores.
17. Comptar les cèl·lules totals i congelar-ne una tercera part.
18. Recuperar-ne una altra tercera part per a realitzar una separació per citometria (*FACS sorting*).
19. Mantenir la tercera part restant de les cèl·lules en cultiu.
20. Realitzar la separació per citometria en base a l'expressió de GFP. Les cèl·lules que expressen GFP són les que han incorporat el plasmidi.
21. Mantenir en cultiu les cèl·lules que han incorporat el plasmidi durant 7 dies.
22. Comptar les cèl·lules totals i congelar-ne una tercera part.
23. Recuperar-ne una altra tercera part per a realitzar una separació per citometria.
24. Mantenir la tercera part restant de les cèl·lules en cultiu.
25. Realitzar la separació per citometria en base a l'expressió de CD1d. Les cèl·lules que no expressen CD1d són en les que ha actuat el sistema CRISPR-CAS9.

#### **3.12 Expansió *in vitro* de cèl·lules iNKT humanes**

La línia C1R-hCD1d en fase exponencial de creixement s'incuba (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) durant 12h en presència de diferents concentracions d'anàlegs sintètics o  $\alpha$ GalCer (0, 1, 10, 100 i 1000 ng/ml) en medi RPMI complet al 2,5% MeOH. Transcorregudes les 12h es sotmeten les cèl·lules a una dosi de radiació de 30Gys. Seguidament es transfereixen

### 3. ANIMALS, MOSTRES, MATERIALS I MÈTODES

$5 \times 10^4$  C1R-hCD1d carregades amb els diferents compostos a una p96 de fons en U, fent triplicats per a cada condició. De manera paral·lela s'aïllen les PBMCS a partir d'una mostra de sang perifèrica humana. En cada pou de la placa on ja hi han les C1R-hCD1d s'hi afegeixen  $5 \times 10^5$  PBMCS humanes. La placa amb les C1R-hCD1D i les PBMCS humanes es deixa a l'incubador (5%CO<sub>2</sub>, 37°C). Als 2 i 5 dies es renova el medi afegint RPMI complet amb 50 IU/ml d'IL-2 recombinant humana. Al cap de 9 dies s'analitzen les mostres per FACS.

#### **3.13 Quantificació de citocines i quimiocines *in vivo***

S'injecten diverses dosis d'1µg, 100ng i 10ng d'αGalCer i AC11, o bé 1µg, 200ng i 40ng d'AC16 i AC19 en vehicle (200µl PBS 2,5% DMSO) per via intraperitoneal en femelles de ratolins C57BL/6. A les 2 i 21 hores s'extreu sang als ratolins. S'aïlla el sèrum i es quantifica per ELISA la producció de citocines i quimosines (IFNγ, IL-4 i CXCL9).

#### **3.14 Activació i polarització *in vivo***

S'injecten 100ng d'αGalCer, AC11 o vehicle (PBS 5%DMSO) per via intraperitoneal en femelles de ratolins C57BL/6. A les 2, 5 i 12 hores es sacrifiquen els ratolins i s'extreu la melsa, el peritoneu i la medul·la òssia. Es processen els òrgans i es realitzen diversos marcatges per citometria. Els marcatges intracel·lulars es realitzen utilitzant el kit *Mouse FoxP3 Buffer set* de *BD Pharmigen*. Finalment es passen les mostres per el citòmetre.

#### **3.15. Mobilització i expansió cel·lular *in vivo***

S'injecten 100ng d'αGalCer, AC11 o vehicle per via intraperitoneal o intravenosa en femelles de ratolins C57BL/6. Al cap de 2 dies o bé als 2, 4 i 6 dies, segons el tipus d' experiments, es sacrifiquen els ratolins i s'extreuen els diversos òrgans d'interès (melsa,

peritoneu, medul·la òssia, nòduls limfàtics poplitis, fetge i/o tim). Els òrgans es processen i es realitzen diversos marcatges per citometria.

#### **3.16. Supervivència enfront la línia tumoral RMA i derivades**

En femelles de ratolins C57BL/6 s'injecten per via intraperitoneal  $1 \times 10^4$  RMA,  $2 \times 10^5$  RMA-S o  $1 \times 10^4$  RMA CD1d<sup>-/-</sup>, en un volum total de 200µl en medi RPMI sense suplementar. A dia -3 o +1 respecte el dia d'inoculació del tumor s'injecten 100ng d'αGalCer, AC11 o vehicle per via intraperitoneal. Un cop inoculat el tumor es pesen cada dia els ratolins i es fa un anàlisi visual de l'estat general de salut (el tumor quan es desenvolupa produeix una important ascitis). Quan el pes dels animals sobrepassa un 25% del pes inicial o mostren senyals d'afectació greu de la qualitat de vida, són sacrificats segons els protocols establerts .

#### **3.17. Citotoxicitat *in vivo* contra la línia tumoral RMA i derivades**

En femelles de ratolins C57BL/6 s'administren per via intraperitoneal o intravenosa 100ng d'αGalCer, AC11 o vehicle (Dia-3). A les 72h (Dia 0) s'injecten per via intraperitoneal  $0,7 \times 10^6$  RMA i  $3,5 \times 10^6$  RMA-S marcades amb 5 i 0,5 µM de CMFDA respectivament. 24h després (Dia+1) es sacrifiquen els ratolins i s'extreuen i es processen el peritoneu i la melsa. Es realitzen diversos marcatges per citometria. En el cas del estudis de citotoxicitat enfront la línia RMA *knock-out* de CD1d obtinguda per CRISPR, en comptes d'RMA-S s'injecten  $0,7 \times 10^6$  RMA CD1d<sup>-/-</sup> marcades amb 0,5 µM CMFDA.

##### **3.17.1. Protocol de marcatge amb CMFDA**

1. Transferir les cèl·lules a marcar en un tub de 15.
2. Centrifugar 5 min a 168g.

3. Resuspendre les cèl·lules en de 10ml de PBS.
4. Comptar les cèl·lules.
5. Dil·luir l'estoc de CMFDA en PBS a la concentració d'ús (de 0,1µM fins a 10µM). Preparar 1ml de dil·lució per cada  $5 \times 10^7$  cèl·lules a marcar.
6. Centrifugar les cèl·lules 5 min a 168g.
7. Resuspendre les cèl·lules en la dil·lució de CMFDA.
8. Incubar (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) durant 10 min.
9. Aturar la el marcatge afegint 1ml de FBS i 9 ml de RPMI complet a 4°C.
10. Centrifugar 5 min a 168g.
11. Resuspendre en RPMI complet.
12. Comprovar el marcatge per FACS.

#### 3.17.2. Depleció de cèl·lules efectores

La depleció de les poblacions cel·lulars efectores es realitza mitjançant l'administració el dia abans de la transferència de les cèl·lules tumorals (Dia-1) dels anticossos o reactius necessaris per via i.p.

- Cèl·lules NK: s'injecten per via i.p 500µg de l'anticòs PK136 ( $\alpha$ NK1.1, *BioXcell*).
- Macròfags: s'injecten per via i.p 200µl de liposomes amb Clodronat (*ClodronateLiosomes.com*).
- Limfòcits T CD8: s'injecten per via i.p 250µg de l'anticòs 2.43 ( $\alpha$ CD8, *BioXcell*).
- Neutròfils: s'injecten per via i.p 250µg de l'anticòs 1A8 ( $\alpha$ Ly6G, *BioXcell*).

#### 3.17.3. Citotoxicitat amb bloqueig de CD1d

En femelles de ratolins C57BL/6 s'administra per via intraperitoneal 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle (Dia-3). A les 72h s'incuben cèl·lules RMA que prèviament han estat marcades amb 5µM de CMFDA, amb 100µg/ml de l'anticòs K235 o 3C11 (anti-CD1d) en funció de l'experiment, o amb un anticòs isotip control. S'injecten en ratolins C57BL/6 per via i.p  $0,7 \times 10^6$  RMA tractades amb K235 o 3C11 o amb l'anticòs isotip control, juntament amb 88'8 µg de K235 o 3C11 o anticòs isotip control. 24h després (Dia+1) es sacrifiquen els ratolins i s'extreuen i es processen el peritoneu i la melsa. Es realitzen diversos marcatges per citometria.

#### **3.18. Vacunació terapèutica enfront el model tumoral EG-7**

En ratolins mascles de C57BL/6 s'injecten per via s.c a la part baixa de l'esquena en el cantó dret  $1 \times 10^6$  cèl·lules EG-7. Al cap de 72h (D+3) s'administren per via i.p 250ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle juntament amb 500  $\mu$ g de la proteïna OVA. A partir del dia d'inoculació de les cèl·lules EG-7 es fa un seguiment diari de l'estat general dels ratolins i del creixement del tumor. El tumor es mesura amb un peu de rei. Una vegada el tumor ha assolit un volum de  $4000\text{mm}^3$  es sacrifica el ratolí i s'extreu una part del tumor i la melsa. La melsa es processa i es realitza un marcatge per citometria.

#### **3.19. Vacunació terapèutica amb cèl·lules necròtiques contra el model tumoral RMA**

En femelles de ratolins C57BL/6 s'injecten per via i.p  $10^4$  cèl·lules RMA. A dia 3 o 6 després de la inoculació de les cèl·lules tumorals s'injecten per via i.p  $10^6$  cèl·lules RMA necròtiques juntament amb 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle. La necrosi de les cèl·lules s'aconsegueix realitzant tres congelacions i descongelacions successives amb nitrogen líquid. A partir del dia d'inoculació de les cèl·lules tumorals es fa un seguiment diari de l'estat general i del pes dels ratolins. Quan el pes dels animals sobrepassa un 30% del pes inicial o no compleixen clarament els criteris de benestar establerts són sacrificats.

#### **3.20. Eliminació de cèl·lules B endògenes amb activació d'iNKTs**

En femelles de ratolins de la soca C57BL/6 s'injecten per via intraperitoneal 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle. A les 24h se'ls hi administra per via i.v diverses dosis d'anti-CD20 (*5D2 de Genentech*). A les 24 o 72h s'extreu sang als animals i després son sacrificats, moment en que s'obtenen també la melsa i la medul·la òssia. Es processa la melsa i la medul·la ossia i amb les cèl·lules obtingudes es realitzen diversos marcatges per citometria.

#### **3.21. Supervivència enfront el model tumoral E $\mu$ -myc amb anti-CD20 i activació iNKT**

En aquest model s'utilitzen cèl·lules BL370 provinents de la soca de ratolí E $\mu$ -myc (*B6.Cg-Tg(IghMyc)22Bri/J*). Aquesta és una soca transgènica creada a partir de C57BL/6 que porta una còpia del gen c-myc sota el control de l'*enhancer* de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgH), fet que provoca l'aparició espontània de limfomes pre-B i B en el 90% dels animals durant els 5 primers mesos de vida. L'expansió d'aquestes cèl·lules, donades per el Dr. J. A. Villadangos de la Universitat de Melbourne, es realitza inoculant-les a un ratolí C57BL/6 per via i.v. Quan els ratolins desenvolupen adenopaties es sacrifiquen, s'aïllen les cèl·lules tumorals i es congelen per el seu ús posterior. Per fer els experiments d'activitat terapèutica en femelles de ratolins de la soca C57BL/6 s'injecten per via i.v  $10^5$  cèl·lules BL3750 . Al cap de 24h s'injecten per via i.p 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle. 24 hores després s'injecten per via i.v 5 $\mu$ g de l'anticòs 5D2 (anti-CD20). Alternativament també s'ha administrat un tractament únic 5 dies després de la inoculació de les cèl·lules tumorals, consistent en 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle i 5 $\mu$ g de 5D2 per via i.p. A partir del dia d'inoculació de les cèl·lules tumorals es fa un seguiment visual de l'estat de salut dels animals. Els animals són sacrificats quan comencen a mostrar adenopaties o símptomes evidents de mala salut.

### 3. ANIMALS, MOSTRES, MATERIALS I MÈTODES

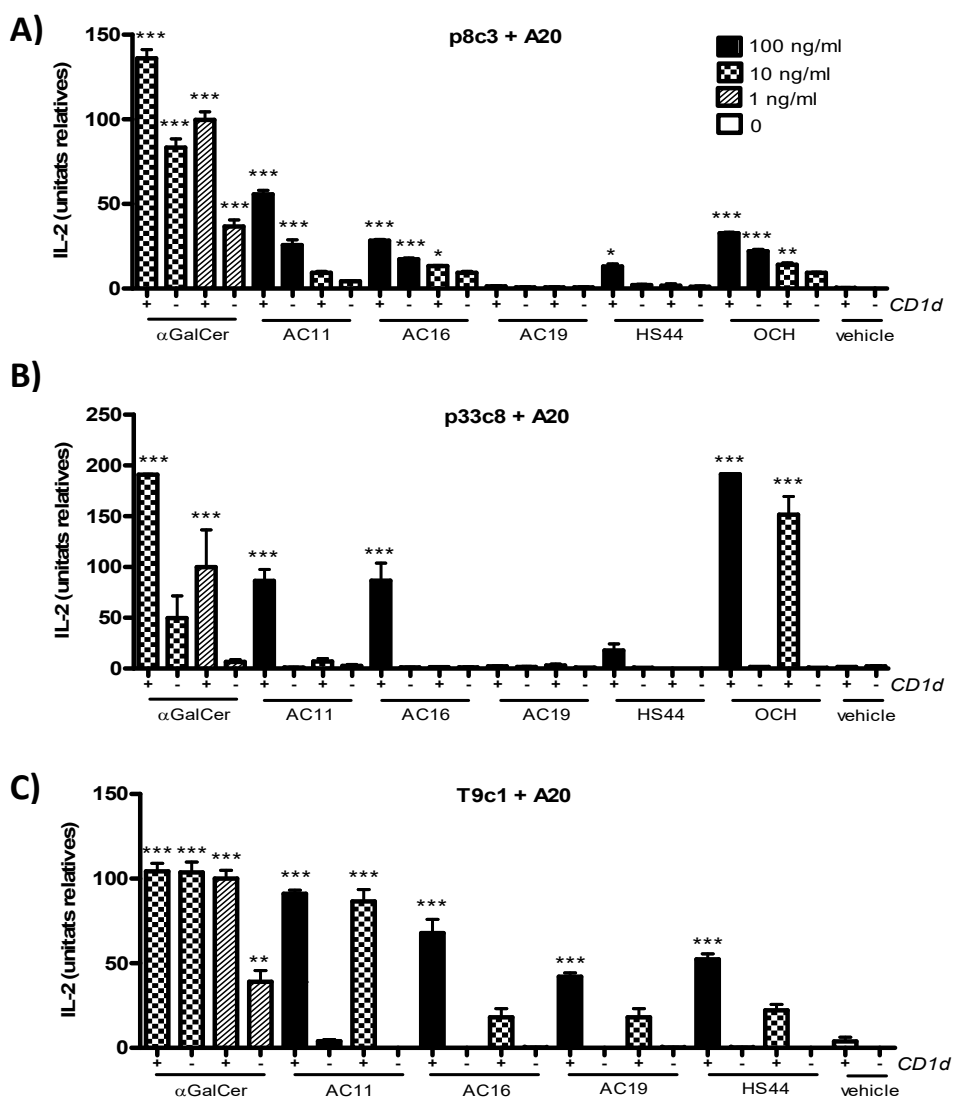
### 3. ANIMALS, MOSTRES, MATERIALS I MÈTODES



## 4. RESULTATS

### 4.1. Els anàlegs sintètics són reconeguts i activen hibridomes iNKT

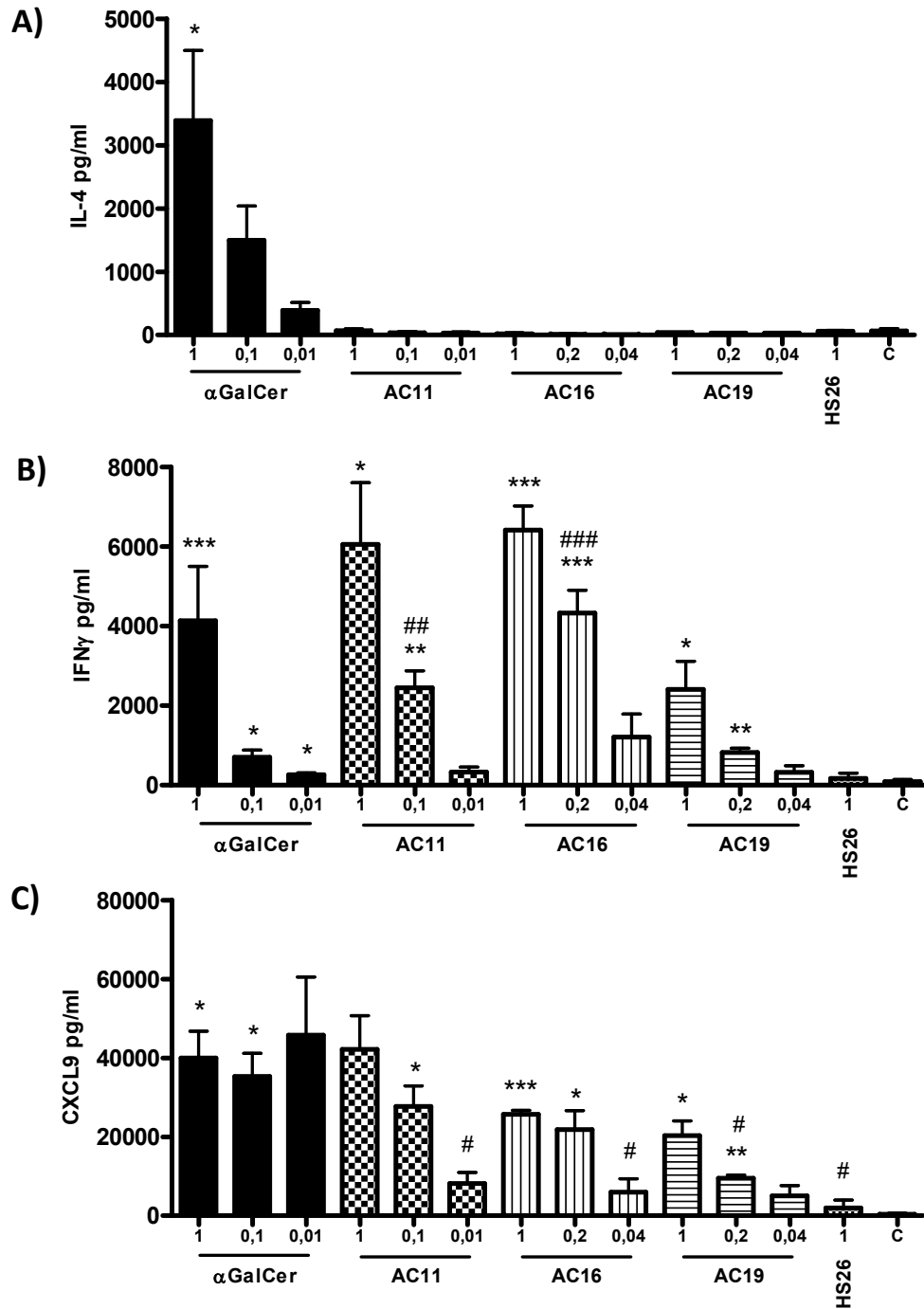
Primerament vam voler comprovar la capacitat d'activació i potència d'alguns dels anàlegs aminociclitols sobre les iNKT. D'entre tots els anàlegs disponibles vam escollir els que en estudis previs publicats<sup>224,234,235</sup> i altres de no publicats (dades del grup) havien mostrat una major capacitat per expandir les iNKT de ratolí. Tot i que en aquests estudis ja havíem vist que els compostos seleccionats eren capaços de generar una resposta *in vitro* d'expansió de les iNKT presents en els esplencòcits de ratolí, en aquest cas vam voler comprovar de manera més específica el reconeixement directe per les iNKT. Per això vam posar a punt un assaig *in vitro* de presentació dels anàlegs a hibridomes iNKT, en el qual les úniques cèl·lules presents en el cultiu eren les presentadores i les efectores (hibridomes iNKT). Els hibridomes utilitzats havien estat obtinguts i seleccionats prèviament al nostre laboratori a partir de cèl·lules iNKT de Tim (dades no publicades). L'assaig consisteix en realitzar un co-cultiu entre una línia cel·lular que expressa CD1d i que actua com a presentadora i un hibridoma iNKT que respon a la presentació alliberant IL-2. Per a la presentació dels anàlegs es van utilitzar les línies A20 i RMA-S transfectades amb CD1d i com a controls les mateixes cèl·lules sense transfectar. La valoració de la resposta es realitza en funció de la producció d'IL-2 per part dels hibridomes al cap de 24h d'establir el cultiu. Aquests experiments permeten discernir entre compostos actius i inactius, així com quantificar la potència i capacitat de reconeixement dels anàlegs per diferents iNKTs. La relació dosi-resposta es correlaciona directament amb l'afinitat del iTCR per el complex CD1d-antigen<sup>236</sup> tot i que la quantitat d'IL-2 absoluta depèn tant del reconeixement del complex CD1d-antigen com d'altres característiques intrínseques dels hibridomes. Els compostos utilitzats en els experiments van ser l'AC11, AC16, AC19, HS44 i l' $\alpha$ GalCer. Els hibridomes iNKT el p8c3, p33c8 i T9c1 (Fig.8), i també el p5c7 (dades no mostrades).



**Figura 8.** Activació d'hibridomes iNKT en resposta a la presentació dels diferents anàlegs sintètics. Valoració per ELISA de la de la concentració d'IL-2 en el medi de cultiu 24h després d'establir el cultiu. **A)** Cultiu de línia tumoral A20 juntament amb el hibridoma p8c3. **B)** Cultiu de la línia tumoral A20 juntament amb el hibridoma p33c8. **C)** Cultiu de la línia tumoral A20 juntament amb el hibridoma T9c1. Resultats corresponents a tres experiments independents. Els tractaments amb els diversos compostos han estat comparats amb el vehicle amb: One-way ANOVA amb test de Bonferroni: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,005$ ; \*\*\* $P < 0,0005$ .

Els anàlegs AC11 i AC16 són capaços d'activar tots els hibridomes utilitzats en major o menor mesura, però menys del que ho fa l' $\alpha$ GalCer (Fig.8). Per altra banda el HS44 no és capaç d'activar el p33c8, que és el hibridoma amb una reactivitat més baixa, i el l'AC19 tan sols activa l'hibridoma amb més reactivitat el T9c1. Els quatre anàlegs sintètics utilitzats en els experiments mostren una potència d'activació molt menor que

l' $\alpha$ GalCer; la producció d'IL-2 utilitzant una concentració de 100ng/ml d'AC11 o AC16, que són els anàlegs més potents, és similar a la que s'obté utilitzant una concentració cent vegades més baixa d' $\alpha$ GalCer, d'1ng/ml. El fet que es produeixi l'activació dels hibridomes iNKT per cèl·lules A20 no transfectades amb CD1d és degut a que les cèl·lules A20 són un limfoma de cèl·lules B que ja de per si expressa certs nivells de CD1d, i per tant quan s'utilitzen les concentracions més baixes dels agonistes més potents són reconegudes per els hibridomes. Els cultius realitzats utilitzant la línia RMA-S com a cèl·lula presentadora generen uns resultats qualitativament molt similars als obtinguts amb les A20, encara que en aquest cas la producció d'IL-2 és molt menor (dades no mostrades). La menor potència d'activació de tots els anàlegs enfront l' $\alpha$ GalCer, independentment de la cèl·lula presentadora o del hibridoma que s'utilitzi, segurament s'explica per una menor afinitat del iTCR per el complex CD1d-anàleg, com s'ha comprovat en el cas del HS44<sup>224</sup>.

4.2. Els anàlegs sintètics indueixen la producció de citocines i quimiocines *in vivo*

**Figura 9.** Concentració en sèrum de citocines i quimiocines en resposta a l'administració i.p d' $\alpha$ GalCer o anàlegs sintètics en ratolins de la soca C57BL/6. A) ELISA de l'IL-4 en sèrum a les 2 hores de l'administració i.p d' $\alpha$ GalCer o anàlegs. B) ELISA d'IFN $\gamma$  en sèrum a les 23 hores de l'administració i.p d' $\alpha$ GalCer o anàlegs. C) ELISA de CXCL9 en sèrum a les 23h de l'administració i.p d' $\alpha$ GalCer o anàlegs. Resultats de tres experiments independents. Els resultats han estat comparats amb: Unpaired t-test \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 (el símbol \* indica comparació amb el control, el símbol # indica comparació dels anàlegs amb una dosi equivalent d' $\alpha$ GalCer).

Una de les conseqüències de l'activació *in vivo* de les iNKT amb l' $\alpha$ GalCer és una gran producció sistèmica de molts tipus de citocines i quimocines. Amb l'objectiu de comprovar si els nous anàlegs sintètics també són capaços d'activar a les cèl·lules iNKT *in vivo* i induir la producció de citocines a nivell sistèmic, hem injectat per via i.p diverses dosis dels compostos en ratolins C57BL/6. A les 2 i 24h coincidint amb els pics de producció d'IL-4 i IFN $\gamma$  respectivament, hem extret sang dels animals. Tal i com està descrit en la bibliografia<sup>225</sup> a les 2h després de l'administració d' $\alpha$ GalCer es detecten nivells significatius d'IL-4 en sang (Fig.9A). Per el contrari cap dels anàlegs sintètics no produeix un augment en els nivells d'IL-4. A les 24h no es detecta IL-4 ni amb  $\alpha$ GalCer ni amb els anàlegs (dades no mostrades).

D'altra banda a les 24h hi ha un augment significatiu en els nivells d'IFN $\gamma$  amb tots els anàlegs excepte amb el HS26 (Fig.9B), que tal i com era d'esperar degut a la seva estructura amb una cadena d'esfingosina escurçada de només 7 carbonis no és capaç d'induir la producció d'IFN $\gamma$ . Els anàlegs més potents són el AC11 i el AC16, que amb una dosi de 100 i 200ng respectivament indueixen uns nivells d'IFN $\gamma$  significativament majors que amb 100ng d' $\alpha$ GalCer. En el cas dels compostos AC16 i AC19 les dosis de 100ng i 10ng es van substituir per dosis de 200 i 40ng, ja que en els estudis previs amb AC11<sup>235</sup> la dosi més baixa, de 10ng no generava gairebé resposta, i per tant es va optar per substituir aquesta dosi i la de 100ng amb l'objectiu de poder observar un efecte dosi-resposta. La producció d'IFN $\gamma$  tant amb l' $\alpha$ GalCer com amb l'AC11, l'AC16 i l'AC19 segueix un patró dosi-resposta. Aquesta resposta és dependent de CD1d, ja que quan realitzem l'experiment amb ratolins deficients per el gen del CD1D1 els nivells d'IFN $\gamma$  no augmenten (dades no mostrades).

També vam estudiar els nivells de la quimocina CXCL9. L'alliberació d'aquesta quimocina es produeix sobretot en resposta a l'IFN $\gamma$ , i juga un paper important en les respostes de tipus Th1 intervenint en el *homing* de les cèl·lules TCD8+ i NK, i per tant en la resposta antitumoral i anti-infecciosa<sup>237</sup>. En aquest cas veiem com s'indueix una gran alliberació sistèmica de CXCL9 amb els anàlegs AC11, AC16 i AC19 que segueix un patró dosi-resposta que es correlaciona amb els nivells d'IFN $\gamma$  (Fig.9B i 9C). Aquest fet no passa amb l' $\alpha$ GalCer, ja que tot i haver-hi uns nivells relativament baixos d'IFN $\gamma$  amb les dosis

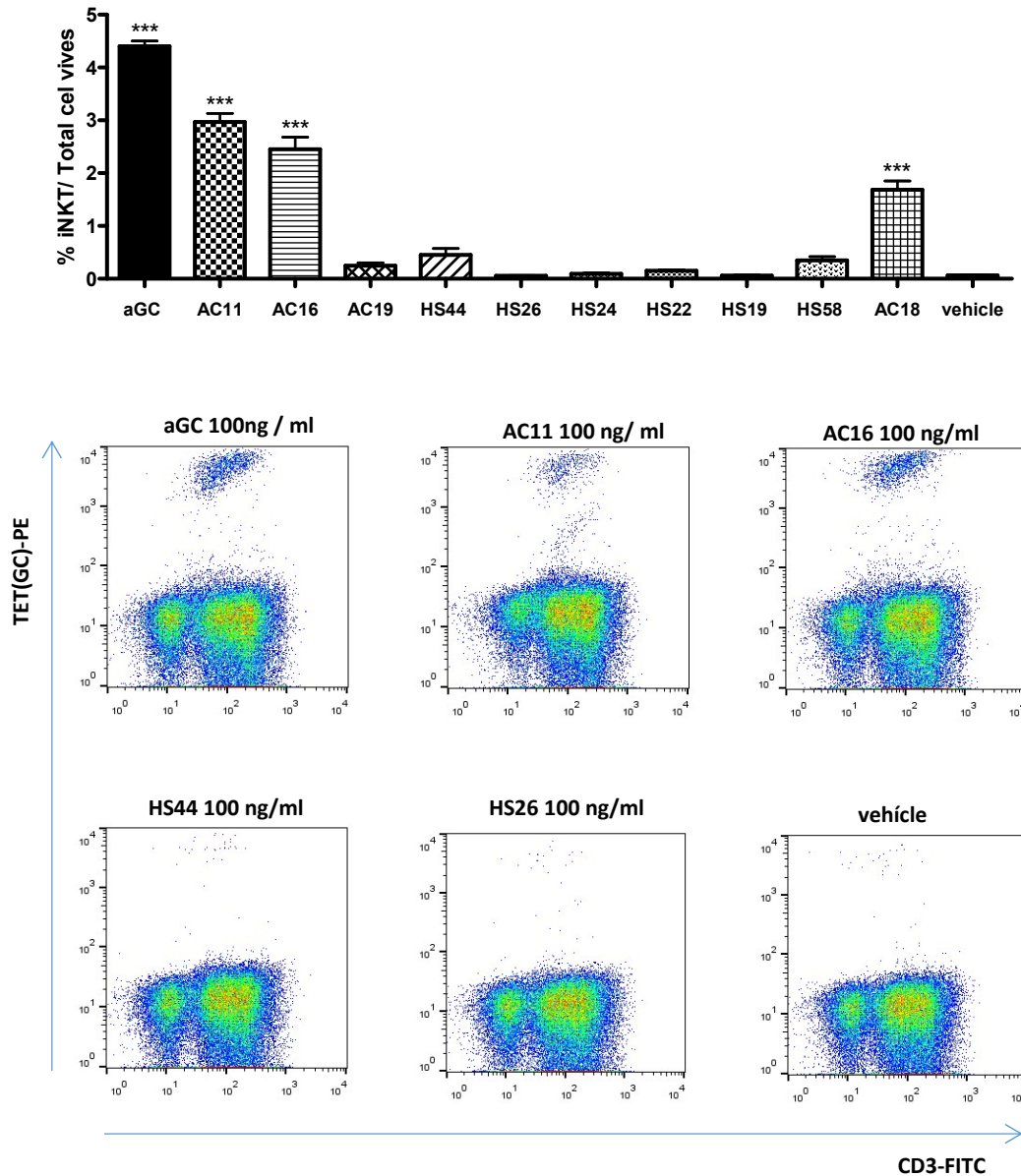
de 0,1 i 0,01 $\mu$ g, hi ha una massiva producció de CXCL9 que es manté constant independentment de la dosi. En conjunt totes aquestes dades posen de manifest una diferència qualitativa fonamental entre la resposta a l' $\alpha$ GalCer i als anàlegs sintètics; els anàlegs indueixen una resposta exclusivament de tipus Th1 molt potent, per el contrari en el cas de l' $\alpha$ GalCer la resposta és de tipus mixt Th1/Th2, també anomenada Th0.

### **4.3. Els anàlegs sintètics indueixen l'expansió de les cèl·lules iNKT humanes**

Amb l'objectiu d'avaluar si els anàlegs aminociclitolos poden ser reconeguts i estimular les cèl·lules iNKT humanes, vam posar a punt un assaig d'expansió *ex vivo* amb iNKT humanes. En l'experiment utilitzem PBMCs humanes aïllades d'un donant voluntari sa com a font de cèl·lules iNKT. L'experiment consisteix en realitzar un co-cultiu entre les PBMCs i una línia cel·lular transfectada amb CD1d humà que actua com a cèl·lula presentadora (C1R-hCD1d). Abans de posar el co-cultiu la línia presentadora ha estat incubada en presència d'antigen. El cultiu es deixa durant 9 dies en presència d'IL-2 humana. Finalment s'analitza l'expansió de les iNKT per citometria mitjançant el tetràmer CD1d- $\alpha$ GalCer. Tal i com es troba descrit en la bibliografia<sup>238</sup> l' $\alpha$ GalCer posseeix una gran capacitat per expandir les iNKT humanes (Fig.10). En el cas dels anàlegs sintètics veiem que els compostos AC11, AC16, AC19, HS58 i AC18 també poden expandir les iNKT humanes. De la mateixa manera que passa amb els estudis de amb hibridomes i de producció de citocines *in vivo*, en aquest cas l'AC11 i l'AC16 també són els anàlegs més potents, encara que l'expansió que generen és menor que amb  $\alpha$ GalCer. De manera inesperada el compost AC18, que no és actiu en ratolí, en aquest cas indueix una forta expansió de les iNKT encara que no tan potent com la de l'AC11 i l'AC16. Per el contrari els compostos AC19 i HS44 que són actius en ratolí<sup>224</sup>, no son reconeguts per les iNKT humanes. La resposta d'expansió de les iNKT enfront els compostos segueix una dinàmica dosi-resposta (Fig.11A).

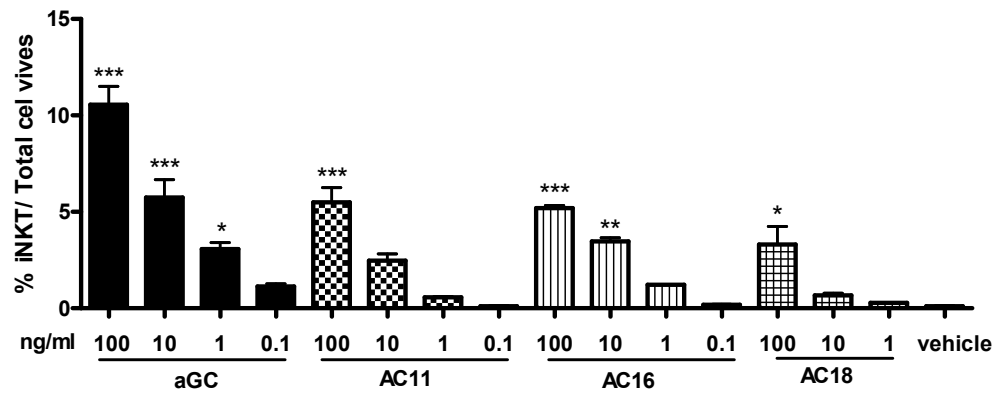
Recentment s'ha descrit que l' $\alpha$ GalCer també és reconeguda per una petita població de cèl·lules T $\gamma\delta$  amb un TCR que conté el segment V $\delta$ 1<sup>239</sup>. Per determinar si els anàlegs sintètics estudiats també són reconeguts per aquests limfòcits T $\gamma\delta$  V $\delta$ 1+, hem analitzat

per citometria utilitzant un anticòs anti-V $\delta$ 1 la seva presència en els cultius. Els resultats mostren que únicament la concentració més alta d' $\alpha$ GalCer és capaç de generar l'expansió d'aquesta població de limfòcits, per el contrari cap dels anàlegs utilitzats és reconegut (Fig.11B).

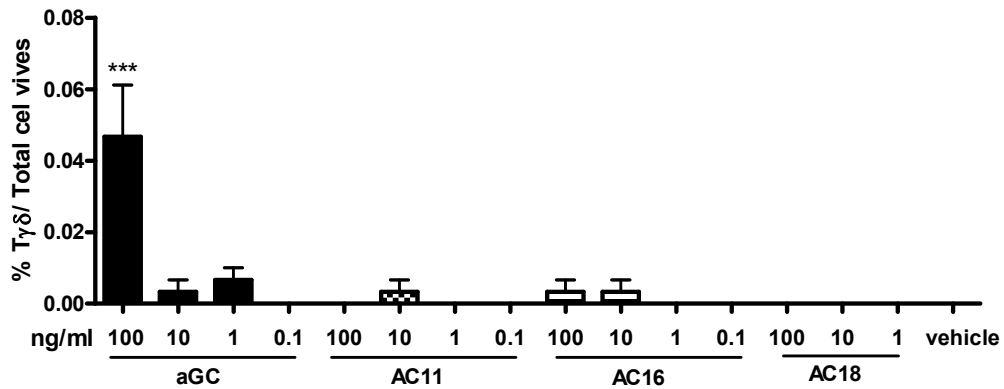


**Figura 10.** Expansió *ex vivo* d'iNKT humanes en cultiu. Cultiu de PBMCs humanes i cèl·lules C1R-hCD1d prèviament incubades amb 100ng/ml dels diferents compostos. Percentatge de cèl·lules iNKT respecte al total de cèl·lules vives 9 dies després d'establir el cultiu. Tractaments comparats amb One-way ANOVA amb test de Bonferroni (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001. El símbol \* indica comparació dels tractaments amb el vehicle).

A)



B)



**Figura 11.** A) Expansió de les cèl·lules iNKT humanes amb diferents concentracions de  $\alpha$ -GalCer o aminocyclitols. B) Expansió d'una població de cèl·lules T $\gamma\delta$  positives per tetràmer d' $\alpha$ -GalCer amb diferents concentracions d' $\alpha$ -GalCer o aminocyclitols. Anàlisi estadístic realitzat amb One-way ANOVA amb test de Bonferroni: \*P<0,05; \*\*P<0,005; \*\*\*P<0,0005 (El símbol \* indica comparació dels tractaments amb el vehicle).

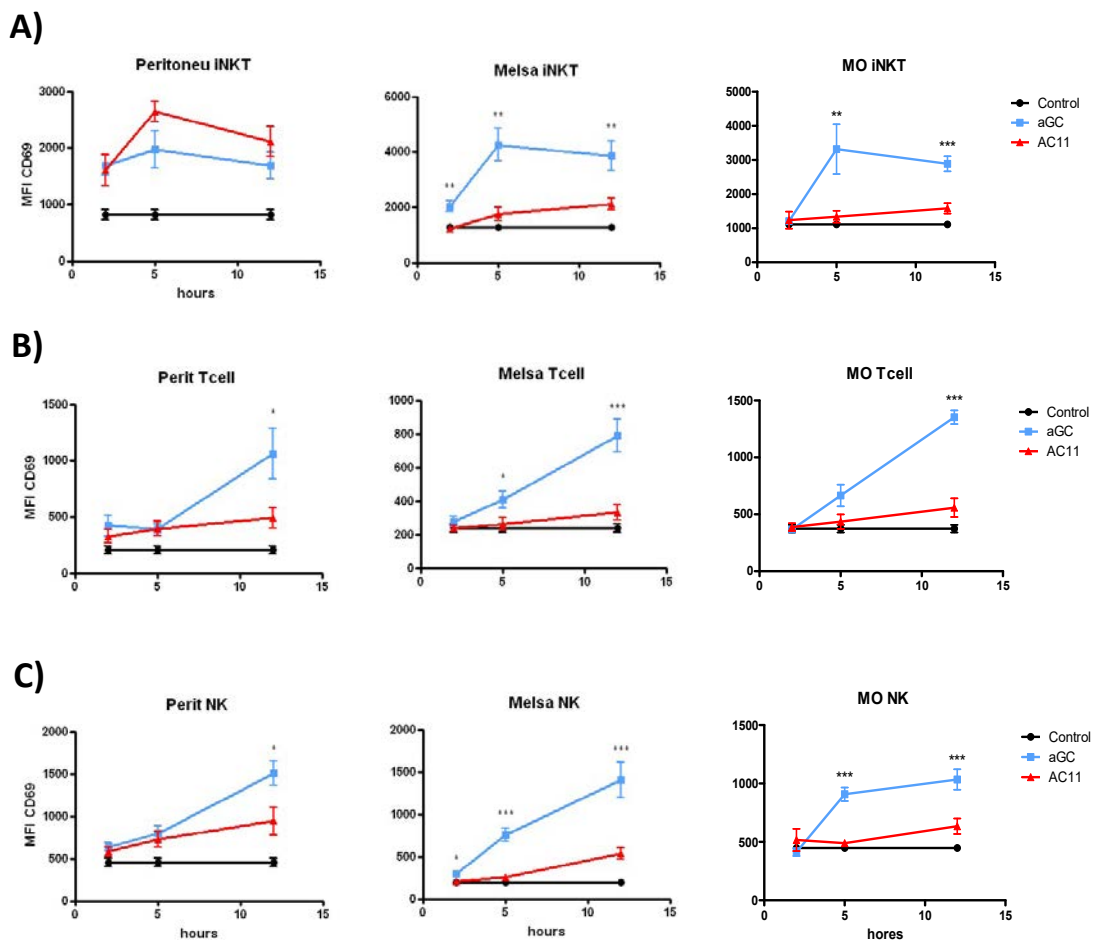


#### **4.4. Activació cel·lular en resposta a l'AC11: l'αGalCer i l'AC11 produeixen cinètiques d'activació *in vivo* diferents**

Els estudis anteriors han demostrat que l'AC11 és reconegut per les iNKT de ratolí i d'humà, i que indueix una potent resposta sistèmica exclusivament de tipus Th1. Per tant vam decidir analitzar en profunditat aquest agonista i la seva possible capacitat per a induir respostes immunes d'utilitat terapèutica. En primer lloc vam estudiar l'activació d'algunes de les principals poblacions limfocitàries efectores en resposta a l'AC11 comparant-la amb l'αGalCer, amb l'objectiu d'observar possibles diferències entre els mecanismes d'acció dels dos agonistes. La mesura de l'activació es va realitzar a través de l'expressió de CD69 en la superfície dels limfòcits a les poques hores d'administrar els compostos. El CD69 és una proteïna transmembranal que s'expressa de manera constitutiva en tots els leucòcits, i degut al fet que és una de les primeres molècules de superfície de les quals n'augmenta l'expressió durant l'activació d'un limfòcit s'utilitza àmpliament com a marcador d'activació inicial<sup>240</sup>. Les cèl·lules iNKT mostren un fenotip pre-activat i en estat basal ja expressen nivells molt més alts de CD69 que altres poblacions limfocitàries<sup>241</sup>, uns nivells que encara augmenten molt més a les poques hores d'activar-se. Vam estudiar específicament els limfòcits d'un òrgan limfoide primari (MO), un de secundari (melsa) i l'òrgan diana (peritoneu). A les 2, 5 i 12h després d'administrar els compostos es van mesurar els nivells de CD69 en els limfòcits iNKT, T i NK. Els punts de mesura no van més enllà en el temps de les 12h, ja que a partir d'aquest moment el iTCR de les iNKT activades pateix un procés de *downregulació* transitori i no es recupera fins al cap d'unes 24-48 hores, i per tant durant aquest període de temps les iNKT són indetectables per citometria<sup>242</sup>.

L'administració i.p de l'αGalCer i AC11 augmenta l'expressió de CD69 tant en les cèl·lules iNKT com en les NK i T (Fig.12). A les 2h de l'administració ja s'observa un augment en l'expressió de CD69 en les iNKT de l'òrgan diana, tant amb l'αGalCer com amb l'AC11, i també en les iNKT de la melsa però únicament amb αGalCer (Fig.12A). Al cap de 5h l'activació de les iNKT en tots els òrgans dels ratolins tractats amb αGalCer és màxima, en canvi amb el AC11 únicament s'observa activació en les iNKT del peritoneu. A les 12h els nivells d'activació en les cèl·lules iNKT dels ratolins tractats amb αGalCer decauen

lleugerament, però en els animals tractats amb AC11 l'activació només decau en el peritoneu, però en les iNKT de la melsa i la MO continua augmentant lleugerament. En el cas dels limfòcits T (Fig.12B) i les NK (Fig.12C) l'activació segueix una cinètica similar en els dos tipus cel·lulars i amb els dos compostos, encara que a nivells més baixos amb l'AC11. A les 5 hores amb l'αGalCer l'activació és evident en els tres òrgans, en canvi amb l'AC11 només ho és en l'òrgan diana, el peritoneu. A les 12 hores l'activació amb l'αGalCer en els tres òrgans ha incrementat molt notablement, i amb l'AC11 també s'observa un cert augment en l'activació en la melsa i la MO, tot i que molt menor que amb l'αGalCer.



**Figura 12.** Expressió en superfície de CD69 en diferents poblacions de limfòcits a les 2, 5 i 12h després d'administrar 100ng i.p d'αGalCer, AC11 o vehicle. A) MFI de CD69 en cèl·lules iNKT. B) Limfòcits T. C) cèl·lules NK de peritoneu, melsa i MO. Resultats analitzats amb: One-way ANOVA amb test de Bonferroni (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001). En les gràfiques únicament s'indiquen les diferències entre l'αGalCer i l'AC11.

Com era d'esperar amb els dos compostos l'activació de les iNKT es produeix de manera prèvia a la de les cèl·lules T i NK, degut al reconeixement immediat (innat) de l'agonista presentat per CD1d. Per altra banda els dos agonistes indueixen cinètiques d'activació diferents, produint-se en el cas de l' $\alpha$ GalCer una activació molt més ràpida i potent en aquestes primeres 12 hores, especialment en els òrgans limfoides allunyats.

#### **4.5. L'AC11 indueix l'expansió i activació in vivo de diverses poblacions de cèl·lules del sistema immune**

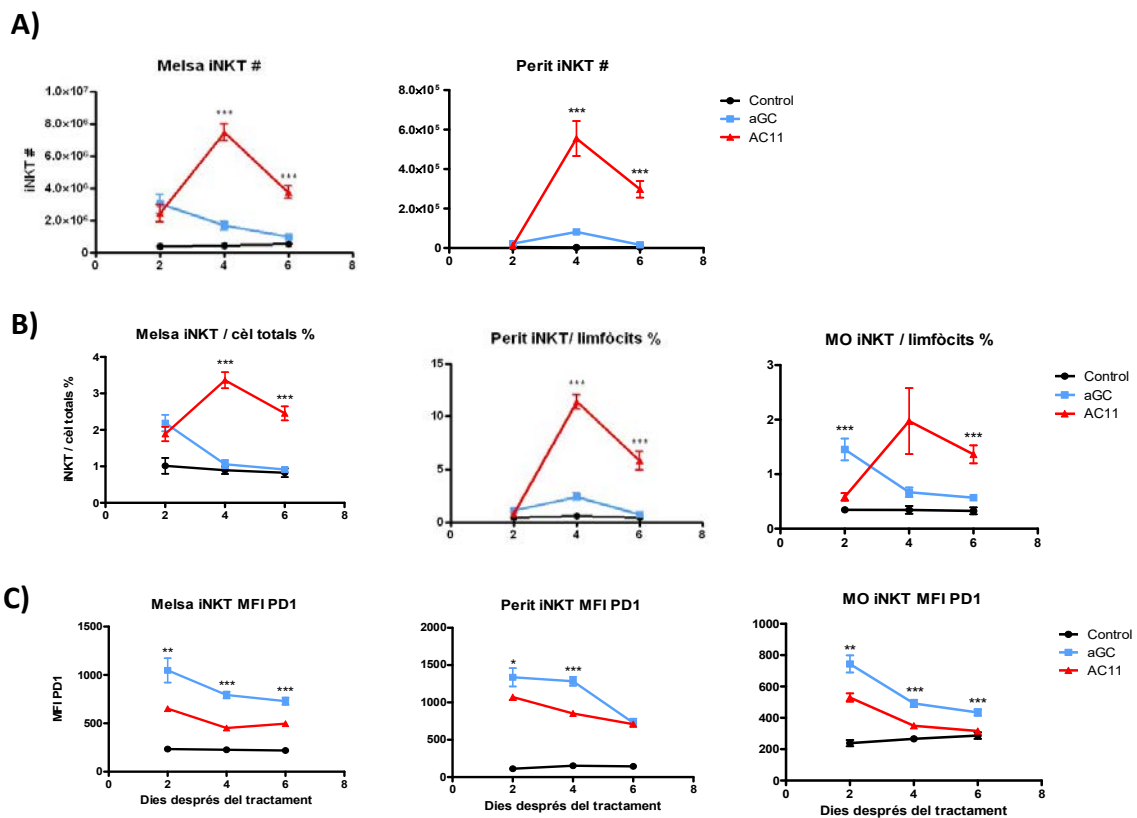
L'administració *in vivo* d' $\alpha$ GalCer indueix una ràpida expansió de les cèl·lules iNKT en molts òrgans<sup>243</sup>. Aquesta expansió assoleix el seu punt màxim a les 72h després de l'administració, per seguidament retornar al punt inicial al cap de 7 a 14 dies<sup>212,242</sup>. A part de l'expansió de les iNKT, com ja hem comentat abans l'administració *in vivo* d' $\alpha$ GalCer genera l'alliberació de grans quantitats de citocines i quimiocines, i l'augment de contactes directes entre cèl·lules a través de molècules de co-estimulació. Aquestes dos fenòmens produeixen l'activació, expansió i mobilització de molts tipus cel·lulars. Amb l'objectiu d'estudiar i comparar l'efecte de l' $\alpha$ GalCer i el AC11 en l'activació i expansió de diverses poblacions del sistema immune, vam administrar en ratolins de la soca C57BL/6 una dosi i.p de 100ng de cada agonista. Posteriorment vam sacrificar els animals 2, 4 o 6 dies després per tal d'estudiar la cinètica d'expansió i activació *in vivo* de diverses poblacions cel·lulars del sistema immune, analitzant-ne per citometria el nombre total, els percentatges i l'activació en la melsa, el peritoneu i la medul·la òssia.

##### **4.5.1. L'AC11 genera una major expansió de les cèl·lules iNKT que l' $\alpha$ GalCer.**

En primer lloc ens vam fixar en l'efecte dels agonistes sobre les seves cèl·lules diana, les iNKT. L'administració i.p d'AC11 produeix una expansió màxima en el nombre de cèl·lules iNKT en la melsa i el peritoneu, significativament major i durant més temps que amb l' $\alpha$ GalCer (Fig.13A). En la melsa l'expansió a dia 2 és igual amb els dos compostos, a dia 4 amb l' $\alpha$ GalCer ha baixat i en canvi amb l'AC11 assoleix el màxim, a dia 6 amb l' $\alpha$ GalCer retorna als nivells inicials però amb l'AC11 tot i que ha disminuït encara es manté molt elevada. En el peritoneu a dia 2 no hi ha expansió amb cap dels dos compostos, a dia 4 es detecta una expansió màxima amb els dos compostos, tot i que amb el AC11 és gairebé 10 vegades major que amb l' $\alpha$ GalCer. Finalment a dia 6 amb l' $\alpha$ GalCer retorna als nivells inicials, però amb l'AC11 encara es manté molt elevada. En la medul·la òssia possiblement aquest augment en el nombre total d'iNKTs també es produeix, tot i que per motius tècnics la quantificació no ha estat possible. Aquests

resultats es repeteixen quan ens fixem en el percentatge d'iNKT respecte del total (Fig.13B).

L'AC11 indueix una expansió major i més sostinguda en el temps de les iNKT, reflectint una més prolongada activació tant en l'òrgan diana com en els òrgans limfoides. Per conèixer més en profunditat el mecanisme d'aquesta activació vam quantificar els nivells d'expressió de PD1, un marcador implicat amb l'esgotament de la resposta immune. Sorprenentment tot i la major expansió induïda per l'AC11, l'expressió de PD1 en les iNKT és significativament menor en els tres òrgans estudiats que amb l' $\alpha$ GalCer (Fig.13C), suggerint un menor agotament de la capacitat funcional de les iNKT estimulades amb AC11<sup>244</sup>, que podria explicar la seva capacitat de proliferació més alta i durant més temps.

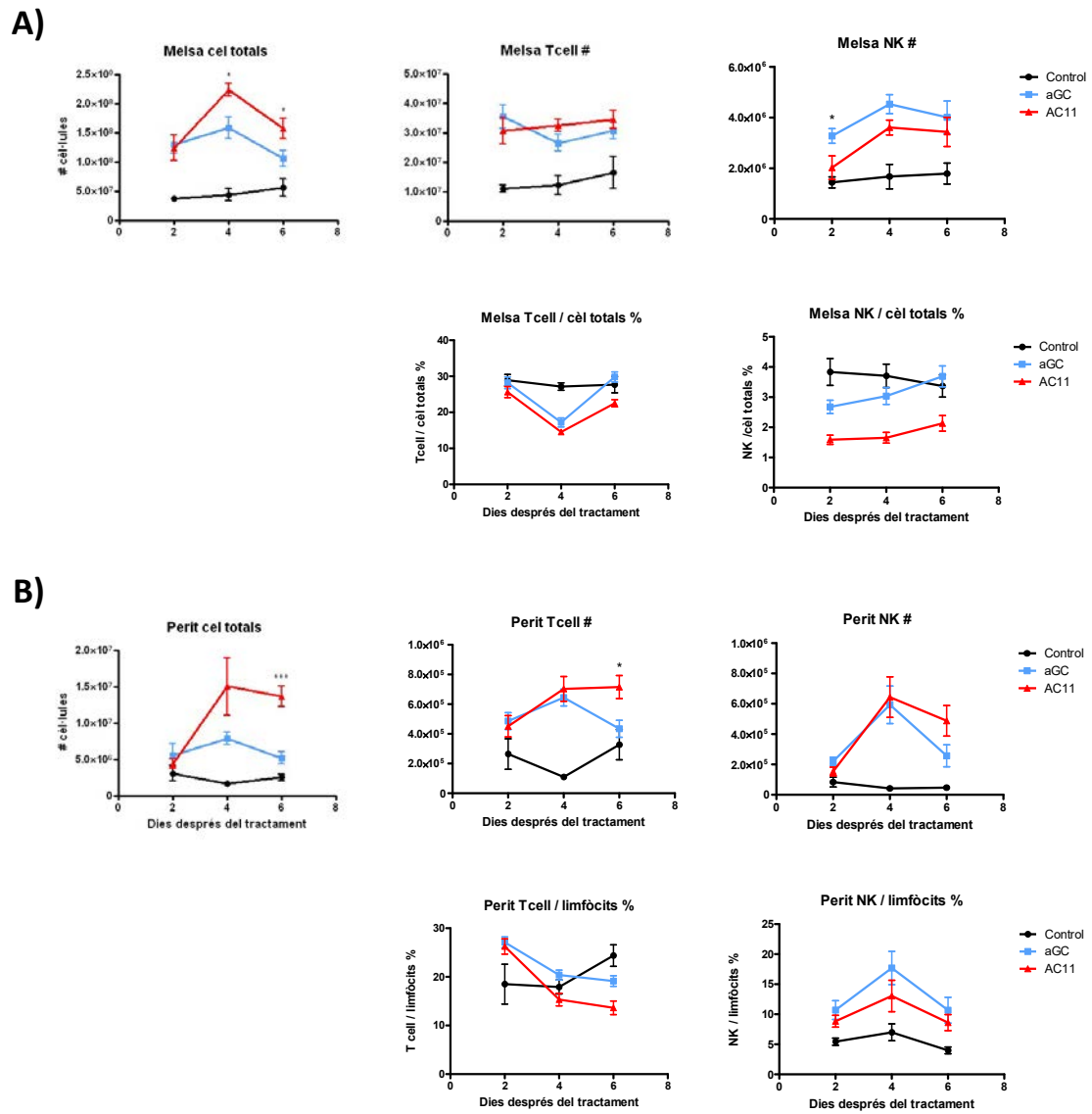


**Figura 13.** Variacions en la població d'iNKTs en la melsa, el peritoneu i la MO 2, 4 i 6 dies després d' administrar 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o Vehicle. A) Nombre total de cèl·lules iNKT en la melsa i el peritoneu. B) Percentatge de cèl·lules iNKT respecte al total de cèl·lules en la melsa, i percentatge de cèl·lules iNKT respecte del nombre de limfòcits en el peritoneu i la MO. C) MFI de PD1 en les cèl·lules iNKT. Resultats corresponents a dos experiments independents. Anàlisi estadístic realitzat amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001). En la melsa els percentatges de cèl·lules iNKT estan calculats respecte del nombre total de cèl·lules vives, en el peritoneu respecte del nombre de limfòcits

### 4.5.2. L'AC11 genera un augment en el nombre total de cèl·lules de la melsa i el peritoneu.

L'administració i.p d' $\alpha$ GalCer i AC11 genera un important augment en el nombre total de cèl·lules en la melsa i el peritoneu, significativament major amb l'AC11, tot i que en aquest cas la diferència no és tan gran com en el cas de les cèl·lules iNKT. Amb els dos compostos l'augment en la cel·lularitat es manté a dia 6 tot i que ja ha començat a disminuir. El número de cèl·lules T a dia 2 és similar amb l' $\alpha$ GalCer i el AC11 en els dos òrgans, mantenint-se també a dia 4. A dia 6 l'augment en el nombre de cèl·lules T en la melsa també es manté d'una manera similar amb l' $\alpha$ GalCer i l'AC11, però en el peritoneu per el contrari el nombre de limfòcits T amb l' $\alpha$ GalCer decreix significativament i amb l'AC11 es manté igual d'elevat que a dia 4. En la melsa tot i l'augment en el nombre total de limfòcits T amb els dos compostos, en termes relatius es produeix una disminució en el percentatge, fet que implica pot implicar o una major expansió d'altres tipus de cèl·lules o bé una sortida de cèl·lules T i NK de la melsa. A dia 6 es recuperen els percentatges normals de limfòcits T en la melsa. En el peritoneu per contra hi ha una expansió relativa a dia 2 més important que en altres poblacions limfoïdes, però a dia 4 retorna a la normalitat.

En el cas de les cèl·lules NK l'expansió i/o reclutament també segueix una cinètica semblant en els dos òrgans amb l' $\alpha$ GalCer i l'AC11, assolint un punt màxim a dia 4 que en la melsa es manté a dia 6, però que disminueix en el peritoneu, tot i que la disminució sembla ser menor en el cas de l'AC11. L'increment en el nombre total de cèl·lules NK en la melsa tampoc es correspon a un increment en el nombre relatiu, indicant una expansió menor que altres tipus cel·lulars o més probablement una major sortida o mobilització cap a la perifèria. En conjunt aquestes dades posen de manifest un increment més sostingut en el nombre de cèl·lules T i NK en el peritoneu amb l'AC11, i que per tant possiblement implicarà una resposta de major utilitat terapèutica.

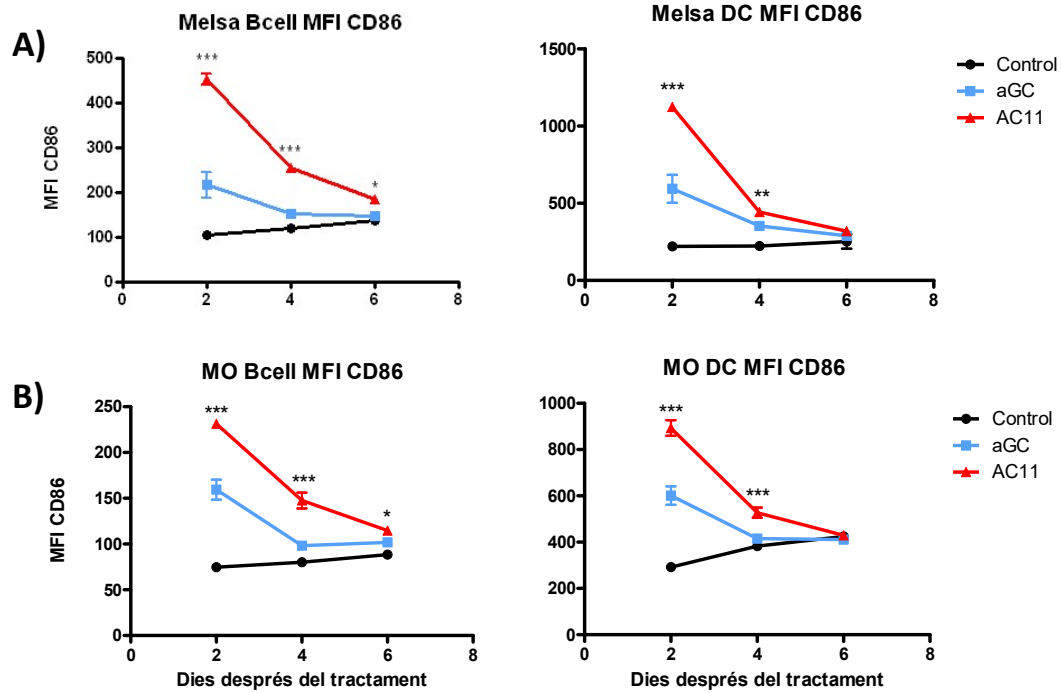


**Figura 14.** Variacions en el nombre i percentatge de cèl·lules de la melsa i el peritoneu en resposta a l'administració i.p de 100ng d'αGalCer, AC11 o vehicle. A) Melsa. B) Peritoneu. Resultats corresponents a dos experiments independents. Anàlisi estadístic realitzat amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001). Només es mostra la comparació estadística del tractament d'αGalCer amb el d'AC11. En la melsa els percentatges de cèl·lules estan calculats respecte del nombre total de cèl·lules vives, en el peritoneu respecte del nombre de limfòcits.

#### 4.5.3. L'AC11 induïx una major activació de les cèl·lules B i de les dendrítiques en la melsa i la MO.

Donada l'important expansió i activació de limfòcits efectors que produeix l'administració d' $\alpha$ GalCer i AC11 vam decidir analitzar l'activació de les APC, que són les cèl·lules encarregades de presentar els compostos a les iNKT<sup>1</sup>. Amb aquest objectiu vam analitzar l'expressió de CD86, que és una molècula co-estimuladora que s'expressa en les APC activades, i per tant s'utilitza com a marcador d'activació en aquestes cèl·lules<sup>245</sup>. L'expressió de CD86 es relaciona positivament amb les capacitats de presentació d'una APC, ja que pot proveir la segona senyal requerida per a l'activació d'un limfòcit T a través de la interacció amb CD28. Recentment també s'ha hipotetitzat que uns alts nivells d'expressió d'aquesta molècula en les cèl·lules dendrítiques poden ser indicatius d'una resposta de tipus Th1<sup>158</sup>. Veiem que tant l' $\alpha$ GalCer com l'AC11 induïxen un augment de l'expressió de CD86 en les DC i les cèl·lules B de la melsa i la MO (Fig.15). L'augment és màxim al cap de dos dies de l'administració, reduint-se progressivament amb els dos compostos, fins que a dia 6 gairebé ha retornat al nivell inicial. Tot i que l' $\alpha$ GalCer i l'AC11 mostren una cinètica d'expressió de CD86 similar, els nivells de CD86 induïts per l'AC11 són significativament molt més elevats que amb l' $\alpha$ GalCer, indicant que les APC dels animals tractats amb AC11 poden generar una activació més potent de la resposta T, i especialment de la resposta Th1.



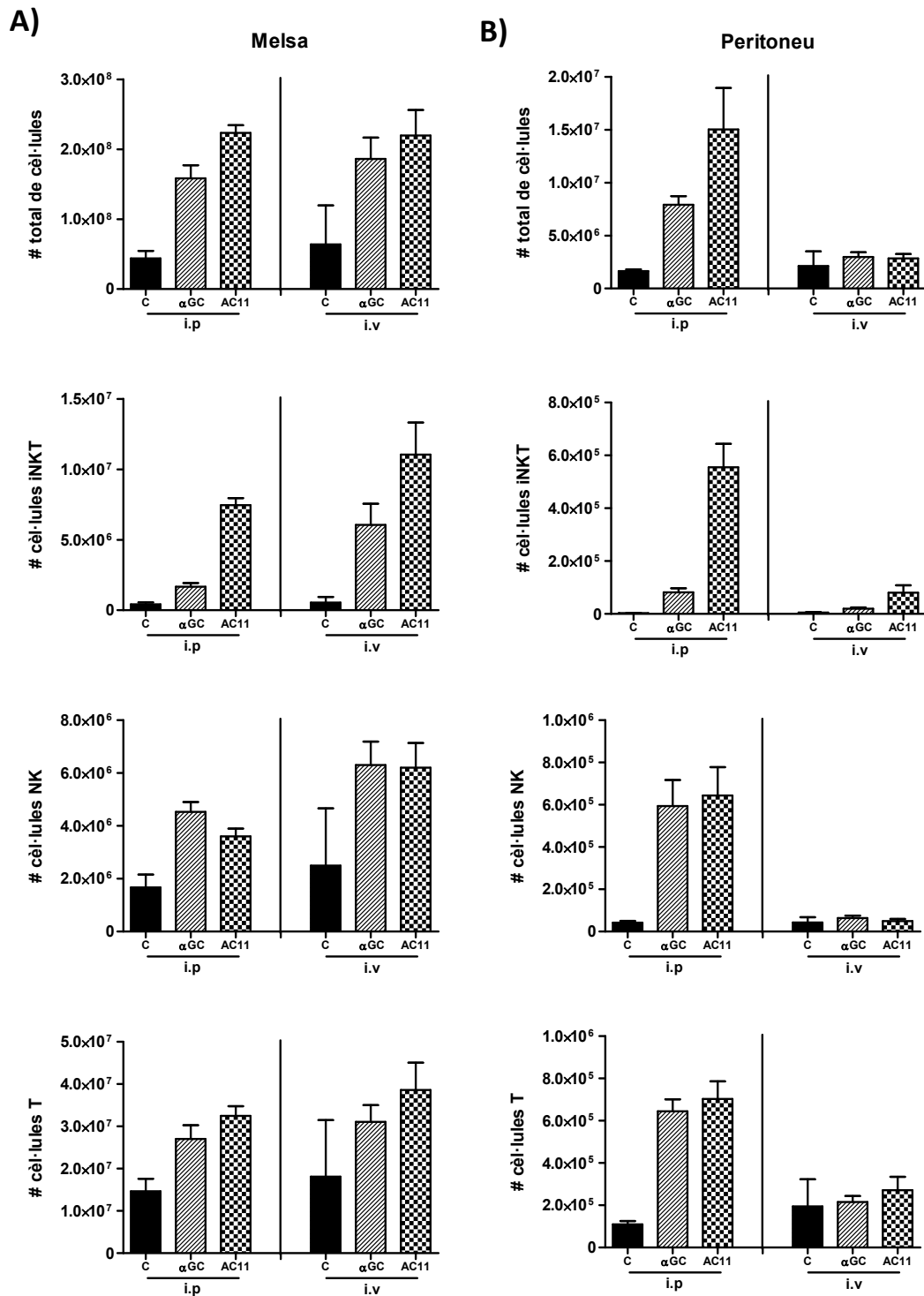


**Figura 15.** Increment en l'expressió de CD86 en cèl·lules B i DC en resposta a l'administració i.p de 100ng d'αGalCer, AC11 o vehicle. A) Melsa. B) Medul·la òssia (MO). Resultats corresponents a dos experiments independents. Tractaments d'αGalCer i AC11 comparats entre ells amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001). Només es mostra la comparació estadística del tractament d'αGalCer amb el d'AC11.

#### **4.6. La via d'administració modifica la resposta de l' $\alpha$ GalCer i de l'AC11 en el peritoneu**

Degut a les diferents cinètiques d'activació amb CD69 que veiem entre l' $\alpha$ GalCer i l'AC11, i al fet que alguns autors hagin descrit importants diferències en la resposta de l' $\alpha$ GalCer segons la ruta d'administració<sup>199</sup>, hem analitzat l'efecte de la via d'administració en la resposta a l' $\alpha$ GalCer i l'AC11. En la majoria d'experiments administrem els agonistes per via i.p i hem volgut comprovar si la injecció per la via i.v, que és la ruta més utilitzada per a l'administració de fàrmacs, modifica la resposta. Per això hem injectat en ratolins C57BL/6 una dosi de 100ng per via i.v de cada compost i al cap de 4 dies els hem sacrificat per analitzar-ne l'expansió de diverses poblacions cel·lulars en la melsa i el peritoneu. Les dades obtingudes les hem comparat amb les d'expansió a 4 dies amb els agonistes administrats per via i.p. Hem escollit el dia 4 ja que en el cas de l'administració i.p és el punt on veiem la màxima expansió de tots els tipus cel·lulars.

En la melsa l'expansió de les poblacions de cèl·lules T i NK, així com del nombre total de cèl·lules és similar a través de les dos vies (Fig.16A), i les diferències entre l' $\alpha$ GalCer i l'AC11 també es mantenen constants. Únicament sembla haver-hi diferències entre compostos en el nombre total de cèl·lules iNKT, essent major en el cas de l'administració i.v, fet que es pot explicar per la connexió directe de la via i.v amb la melsa a través de la sang. En el peritoneu per el contrari la resposta és molt diferent entre les dos rutes d'injecció, produint-se una resposta molt més potent amb els dos compostos quan aquests s'administren i.p (Fig.16B). Quan els compostos s'administren per via i.v la resposta en el peritoneu és molt limitada, i únicament sembla haver-hi un petit augment en el nombre de cèl·lules iNKT amb l'AC11.



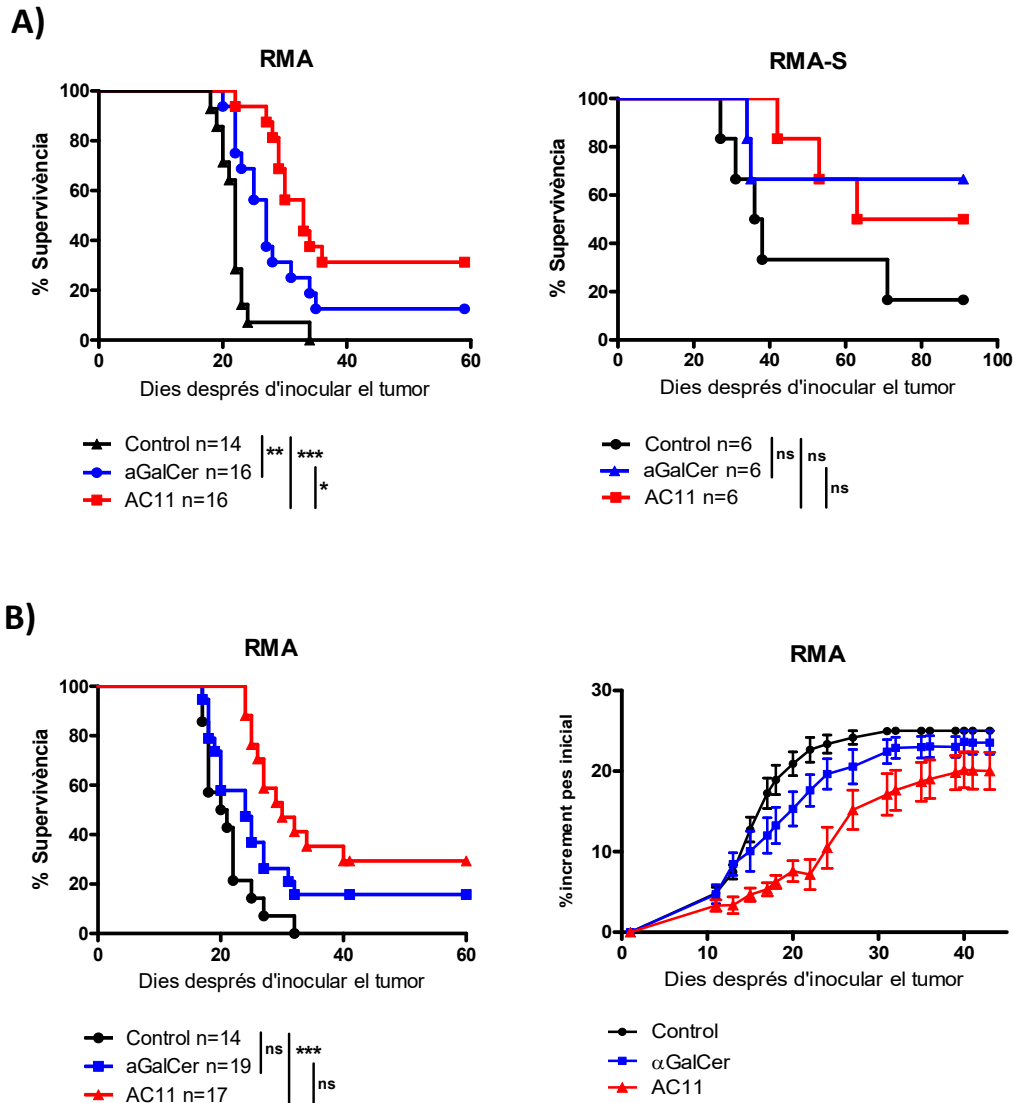
**Figura 16.** La via d'administració dels agonistes influeix en la intensitat de la resposta. Administració de 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle per via i.p. o i.v. Al cap de 4 dies sacrifici dels animals i anàlisi per citometria de la melsa i el peritoneu. L'administració i.p. o i.v. no s'ha fet en paral·lel, sinó que les dades corresponen a experiments fets en diferents dies. Resultats de l'administració i.p. corresponents a dos experiments independents, resultats de l'administració i.v. corresponents a tres experiments independents. A) Melsa. B) Peritoneu.

#### **4.7. Resposta antitumoral: l'AC11 incrementa la supervivència enfront la línia tumoral RMA**

Les dades anteriors indiquen que l'AC11 genera una activació més potent i sostinguda que l' $\alpha$ GalCer de les cèl·lules iNKT, de les APCs i de cèl·lules efectores innates (NK) i també d'específiques (limfòcits T). No únicament la resposta és més potent, sinó que és el tipus de resposta més apropiada per a l'eliminació dels tumors, la resposta Th1. Per aquest motiu vam estudiar l'efecte d'aquesta resposta en un model tumoral de ratolí, la supervivència enfront la línia RMA. Vam escollir aquesta línia degut a l'existència d'una línia derivada mutant, la línia RMA-S que per una mutació que afecta al transport de pèptids des del citosol al RE expressa nivells molt baixos d'MHC I<sup>246</sup>, i per tant poden ser fàcilment eliminades per les cèl·lules NK<sup>247</sup>. Aquestes dos línies representen models clàssics per estudiar les diferències entre la resposta específica i la innata. Així doncs vam inocular una dosi i.p de  $10^4$  cèl·lules RMA en ratolins de la soca C57BL/6, que proliferen en el peritoneu i esdevenen letals en gairebé el 100% dels casos a les 3-4 setmanes. La inoculació de la mateixa dosi de la línia RMA-S no és letal en la gran majoria de casos perquè les cèl·lules NK són capaces d'eliminar les cèl·lules tumorals. L'administració d'una dosi 20 vegades més gran de cèl·lules RMA-S produeix la mort del 50% dels animals a les 3-4 setmanes.

Amb aquest sistema hem estudiat l'efectivitat d'un tractament preventiu consistent en l'administració de 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11 tres dies abans d'inocular les cèl·lules RMA. Els resultats mostren que el temps de supervivència dels animals augmenta significativament amb els dos tractaments, essent el més efectiu el d'AC11 (Fig.17A). En el cas de la línia RMA-S els dos tractaments també augmenten la supervivència, encara que en aquest cas no de manera estadísticament significativa, probablement degut al menor nombre d'animals utilitzats en els experiments. Vam estudiar també quin seria l'efecte d'una aplicació terapèutica dels agonistes iNKT. Per això els vam administrar un dia després d'inocular les cèl·lules RMA. En aquest cas únicament l'AC11 aconsegueix retardar la expansió del tumor i per tant l'increment de pes i augmentar el temps de supervivència, permetent la supervivència final d'un 30 per cent dels animals (Fig.17B).

Aquestes dades demostren que l'AC11 indueix una resposta antitumoral protectora envers les RMA superior a la de l' $\alpha$ GalCer.

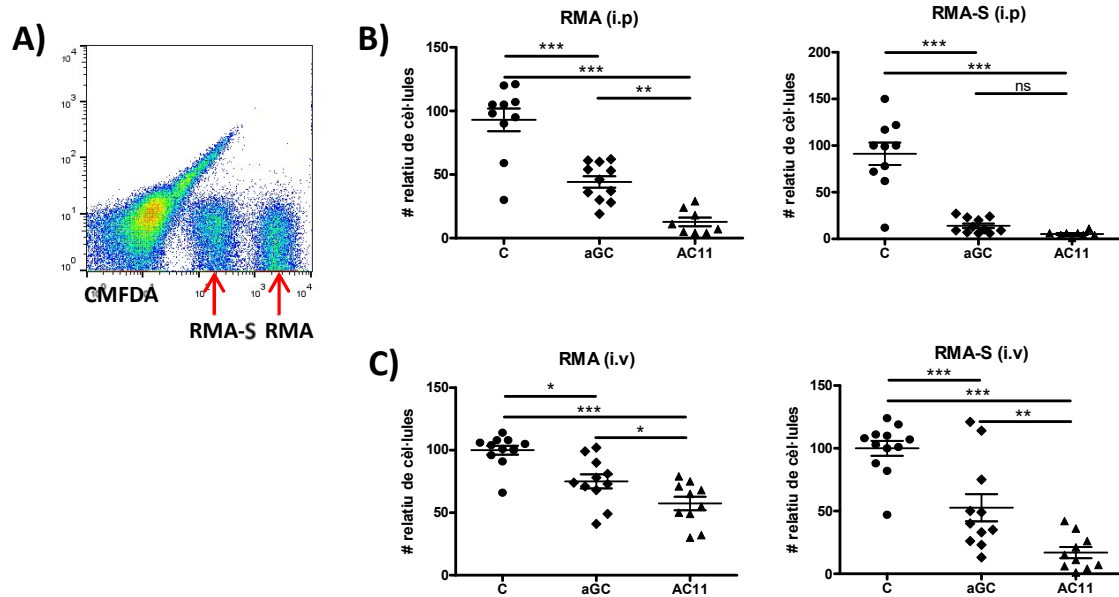


**Figura 17.** El tractament amb AC11 augmenta la supervivència dels ratolins inoculats amb cèl·lules RMA. S'injecta per via i.p una dosi de  $10^4$  cèl·lules RMA. En uns altres animals s'injecten per via i.p una dosi de  $2 \times 10^5$  cèl·lules RMA-S. Es segueix diàriament el pes dels animals i es sacrifiquen quan sobrepassa el 25% del pes inicial. A) Supervivència enfront les línies tumorals RMA i RMA-S utilitzant un tractament preventiu de 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle i.p tres dies abans de la inoculació de les cèl·lules tumorals. B) Supervivència i augment de pes enfront la línia tumoral RMA utilitzant un tractament terapèutic de 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle i.p un dia després de la inoculació de les cèl·lules tumorals. Amb les RMA els resultats corresponen a tres experiments independents. Amb les RMA-S els resultats corresponents a un únic experiment. Resultats de supervivència comparats utilitzant: Mantel-Cox Test (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

#### **4.8. Citotoxicitat *in vivo* enfront la línia tumoral RMA**

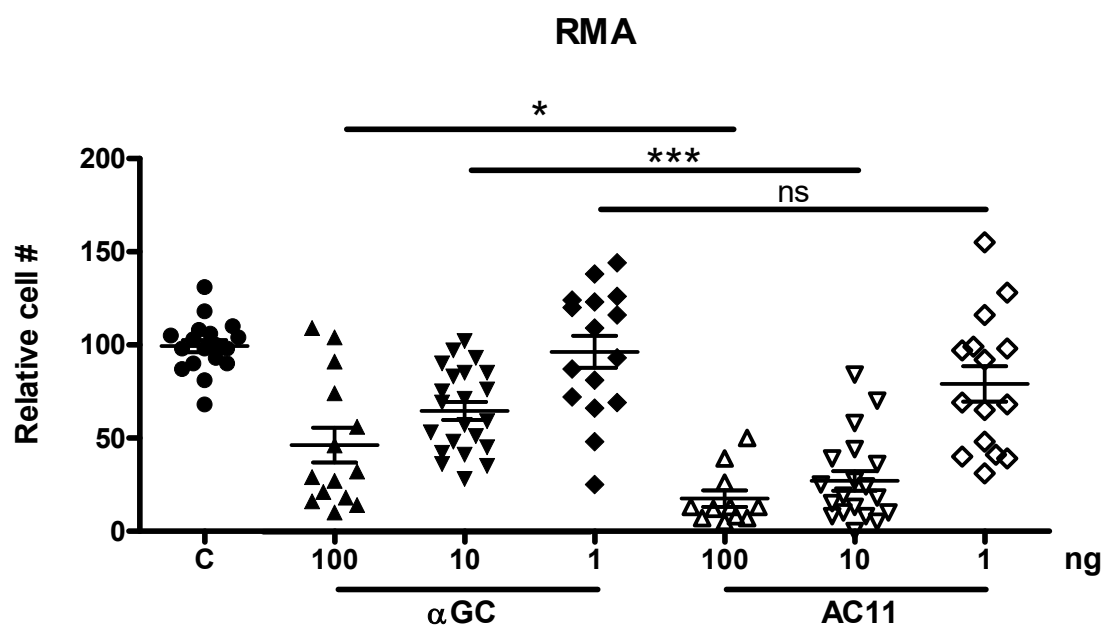
Per a poder estudiar més directament l'acció efectora antitumoral del AC11 vam posar a punt un experiment de citotoxicitat en el peritoneu. La inoculació de cèl·lules tumorals marcades amb CMFDA en el peritoneu permet, un cop sacrificats els animals, l'extracció del líquid peritoneal i l'anàlisi per citometria de les cèl·lules tumorals presents. Utilitzant aquesta estratègia experimental vam inocular per via i.p en ratolins de la soca C57BL/6 una quantitat total de  $0,7 \times 10^6$  cèl·lules RMA i  $3,5 \times 10^6$  RMA-S marcades amb diferents concentracions de CMFDA (Fig.18A). La dosi de cèl·lules RMA-S que administrem és cinc vegades més gran que la de cèl·lules RMA degut a la gran susceptibilitat de les RMA-S a l'atac de les NK, que fa que si administrem la mateixa quantitat que de RMA, les RMA-S siguin eliminades totalment i per tant no es puguin detectar. Aquesta relació 5 a 1 permet que en els animals control es recuperi la mateixa quantitat de les dos línies cel·lulars. A les 24h d'injectar les cèl·lules tumorals sacrificuem els animals, extraiem el líquid del peritoneu i quantifiquem per citometria les cèl·lules tumorals restants. Prèviament, de la mateixa manera que en els experiments preventius de supervivència, els ratolins han estat tractats amb una dosi i.p o i.v de 100ng de  $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle.

L'administració i.p d'AC11 indueix una resposta citotòxica enfront la línia cel·lular RMA significativament superior a la de l' $\alpha$ GalCer (Fig.18B), aconseguint eliminar aproximadament el 90 per cent de les RMA en el cas de l'AC11 i poc més del 50 per cent en el cas de l' $\alpha$ GalCer. L'eliminació de les cèl·lules RMA-S quan els compostos s'administren per via i.p és gairebé total amb els dos compostos (Fig.18B). Quan els compostos s'administren per via i.v són menys efectius, encara que novament l'AC11 és més eficaç que l' $\alpha$ GalCer tant en l'eliminació de les RMA com de les RMA-S (Fig.18C).



**Figura 18.** El tractament amb AC11 genera una major resposta citotòxica al peritoneu enfront les RMA i les RMA-S que l'αGalCer. A) Dot plot d'un peritoneu de ratolí sense tractar on s'observen les RMA-S i les RMA marcades amb 0,5 i 5μM de CMFDA respectivament. B) Administració i.p de 100ng de αGalCer, AC11 o vehicle. Al cap de 3 dies inoculació i.p de 3,5×10<sup>6</sup> RMA-S i 0,7×10<sup>6</sup> RMA. A les 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del peritoneu . C) Administració i.v de 100ng de αGalCer, AC11 o vehicle. Al cap de 3 dies inoculació i.p de 3,5×10<sup>6</sup> RMA-S i 0,7×10<sup>6</sup> RMA. A les 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del peritoneu. Resultats de tres experiments diferents. Resultats comparats amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

Degut a les diferències d'activitat antitumoral entre l'αGalCer i el AC11, hem volgut comprovar com afecta la modificació de la dosi del compost en aquestes diferències, utilitzant dosis d'1ng, 10ng i 100ng administrades per via i.p (Fig.19). Aquest experiment de dosis-resposta confirma la major potència de la resposta antitumoral induïda per l'AC11. Veiem que una dosi deu vegades més baixa que la utilitzada habitualment, de 10ng, tot i que fa disminuir l'activitat antitumoral dels dos compostos, maximitza les diferències ja que la disminució de la resposta és major en el cas de l'αGalCer. Una dosi cent vegades més baixa, d'1ng no és activa amb cap dels dos compostos.

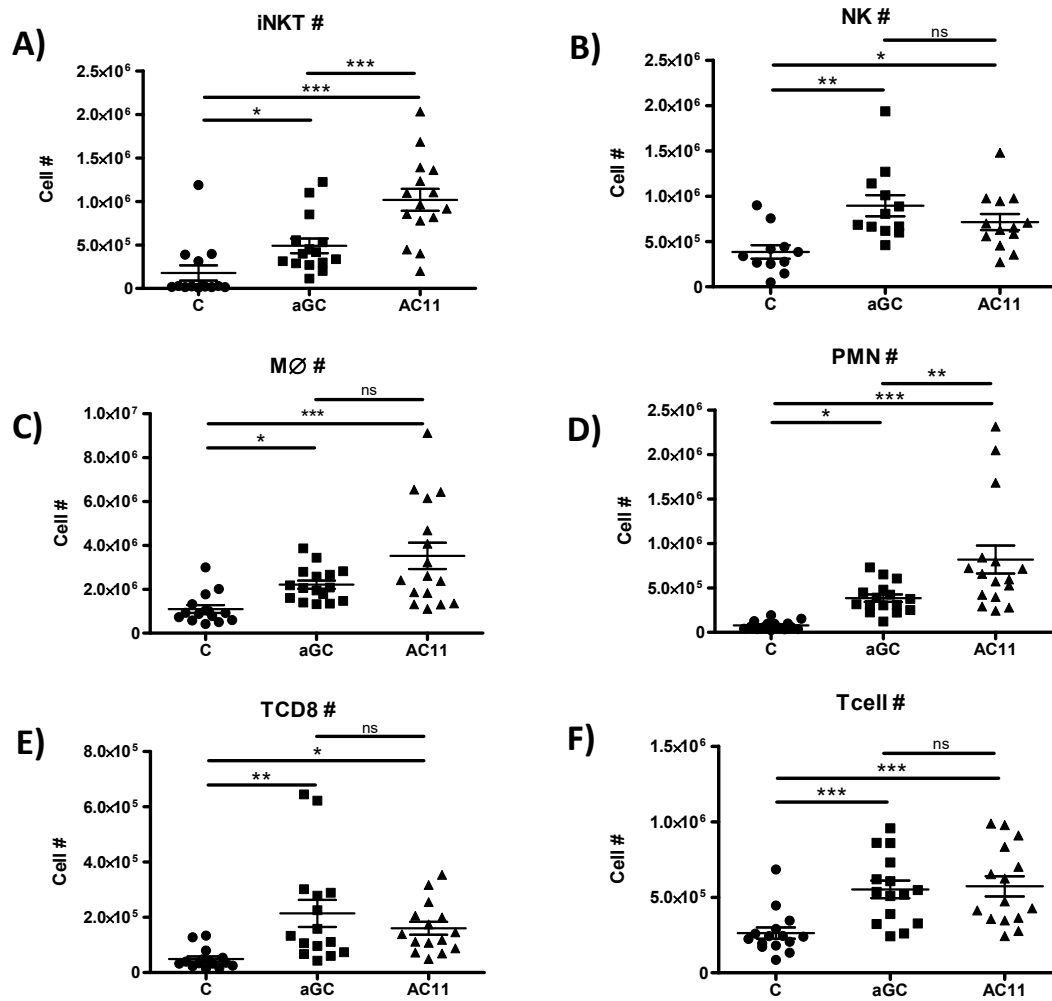


**Figura 19.** Les diferències en l'eliminació de les RMA entre l'AC11 i l'αGalCer són màximes quan s'administra una dosi de 10ng. Administració i.p de 100, 10 o 1ng d'αGalCer, AC11 o vehicle. Al cap de 3 dies inoculació i.p de  $3,5 \times 10^6$  RMA-S i  $0,7 \times 10^6$  RMA. A les 24 hores sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria de les cèl·lules del Peritoneu. Resultats corresponents a tres experiments independents. Resultats comparats amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

#### 4.8.1. La resposta citotòxica de l'AC11 i l'αGalCer implica un increment en el nombre total de diverses poblacions de cèl·lules efectores

Amb l'objectiu de trobar quines cèl·lules són les responsables de l'activitat antitumoral contra les RMA, vam analitzar per citometria de flux les diverses poblacions de cèl·lules efectores amb capacitat citotòxica que es troben en el peritoneu després de la resposta contra el tumor. Amb aquest objectiu les cèl·lules extreptes del líquid peritoneal es van marcar amb diferents conjunts d'anticossos per tal d'analitzar-ne les diverses poblacions cel·lulars.





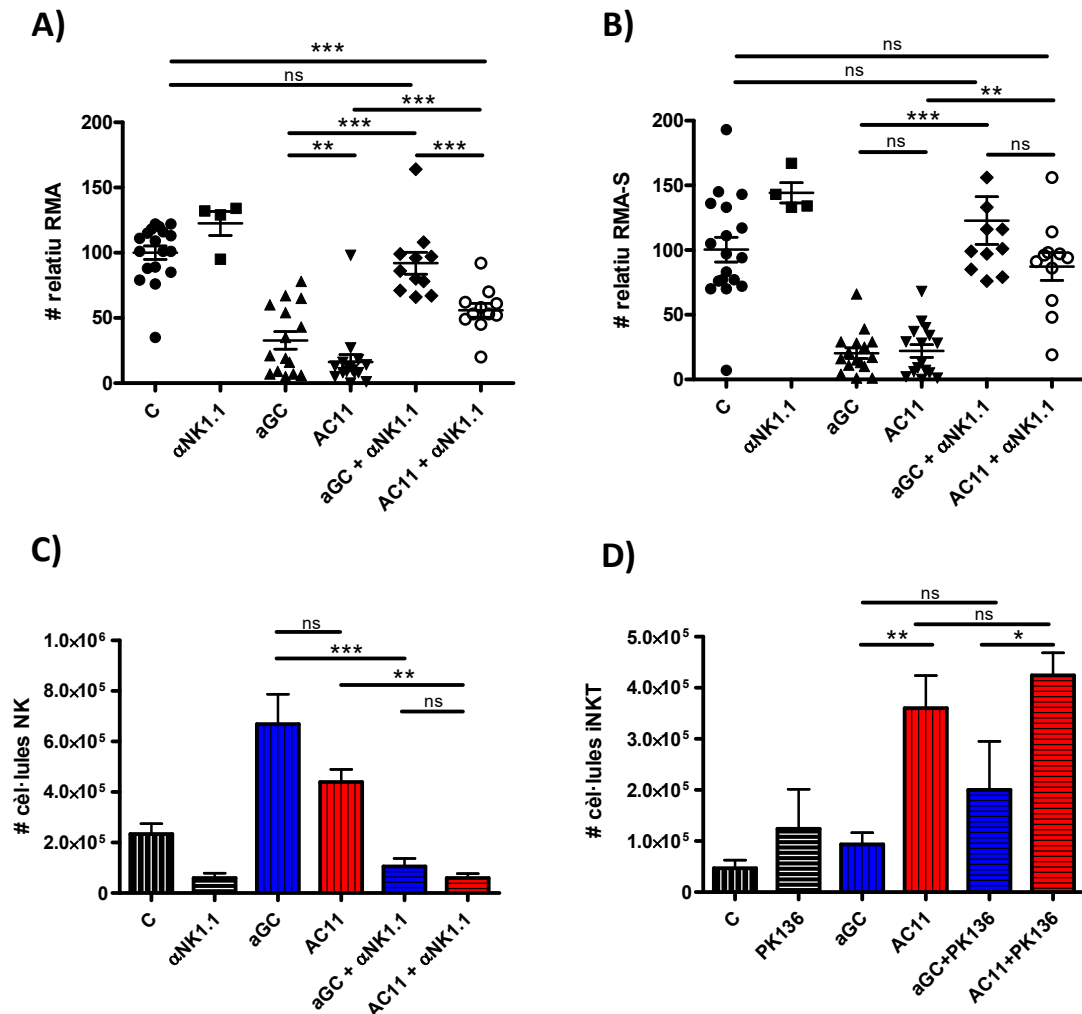
**Figura 20.** El tractament amb 100ng d'αGalCer o AC11 genera un important augment en el nombre total de cèl·lules efectores del peritoneu. Administració i.p de 100ng d'αGalCer, AC11 o vehicle. Al cap de 3 dies inoculació i.p de  $3,5 \times 10^6$  RMA-S i  $0,7 \times 10^6$  RMA. A les 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria de les cèl·lules del peritoneu. A) Nombre total de cèl·lules iNKT. B) Nombre total de cèl·lules NK. C) Nombre total de macròfags (MØ). D) Nombre total de neutròfils (PMN). E) Nombre total de cèl·lules T-CD8 F) Nombre total de cèl·lules T (s'inclouen totes les TCR positives excepte les iNKT). Resultats comparats amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,005; \*\*\*P<0,0005).

En els peritoneus dels animals injectats amb les línies tumorals RMA i RMA-S i que també han estat tractats amb 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11 s'hi produeix un gran augment en el nombre total de cèl·lules efectores, tant d'innates com d'específiques. En primer lloc vam confirmar el gran increment de cèl·lules iNKT observat en experiments anteriors que produeix l'AC11 respecte l' $\alpha$ GalCer (Fig.20A). Per el contrari l'increment en el nombre de cèl·lules NK, M $\emptyset$ , T-CD8 i cèl·lules T és similar amb els dos compostos (Fig.20B, 20C, 20E i 20F). En el cas dels neutròfils (PMN) tot i que els dos agonistes en generen un augment, amb l'AC11 és molt superior (Fig.20D). Així mateix, els macròfags també mostren una tendència a un increment superior amb l'AC11 encara que degut a la dispersió de les mostres els resultats no mostren significació estadística. En conjunt aquestes dades mostren un gran increment en el nombre total de diversos tipus de cèl·lules efectores en el peritoneu amb els dos compostos, havent-hi diferències importants entre l' $\alpha$ GalCer i l'AC11 en el nombre de cèl·lules iNKT i PMN.

### **4.8.2. Paper de les cèl·lules efectores en la resposta antitumoral: diferències qualitatives entre els dos agonistes**

Amb l'objectiu d'estudiar la contribució real de les diferents poblacions de cèl·lules efectores en la resposta citotòxica, vam realitzar experiments d'eliminació selectiva de les cèl·lules NK, M $\emptyset$ , TCD8 i PMN. L'eliminació de les poblacions de cèl·lules NK, TCD8 i PMN es va realitzar utilitzant anticossos depleccionants de provada eficàcia i especificat contra les poblacions d'interès<sup>248-250</sup>. L'eliminació dels M $\emptyset$  es va fer utilitzant liposomes amb clodronat<sup>251,252</sup>. L'administració dels anticossos o el clodronat es realitza dos dies després de l'administració dels compostos (un dia abans de l'administració del tumor) per tal que l'eliminació de la població d'interès tingui el menor efecte possible en la resposta immune global, podent detectar un efecte més directe en l'eliminació del tumor.

## 4.8.2.1. Eliminació de les cèl·lules natural killer (NK):



**Figura 21.** L'eliminació de les cèl·lules NK suprimeix totalment la resposta antitumoral de l'αGalCer contra les RMA, i fa disminuir la del AC11 però no l'elimina. Administració i.p de 100ng de αGalCer, AC11 o vehicle. A les 48h administració i.p de 500 μg de PK136 (Anti-NK1.1). Passades 24h inoculació i.p de 3,5x10<sup>6</sup> RMA-S i 0,7x10<sup>6</sup> RMA. Al cap de 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del peritoneu . A) Nombre relatiu de cèl·lules RMA. B) Nombre relatiu de cèl·lules RMA-S. C) Nombre de cèl·lules NK i iNKT. Les gràfiques A, B i C corresponen a quatre experiments independents, la gràfica D a dos experiments independents. Anàlisi estadístic realitzat amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

L'eliminació de les cèl·lules NK en els animals administrats amb αGalCer suprimeix totalment l'activitat antitumoral contra les RMA, però per el contrari els animals tractats amb AC11 conserven una part significativa de la resposta (Fig.21A). Aquestes diferències no són degudes a una eliminació parcial de les cèl·lules NK, ja que en els dos casos la depleció és igual d'eficient tant en el peritoneu (Fig.21C) com en la melsa (dades no

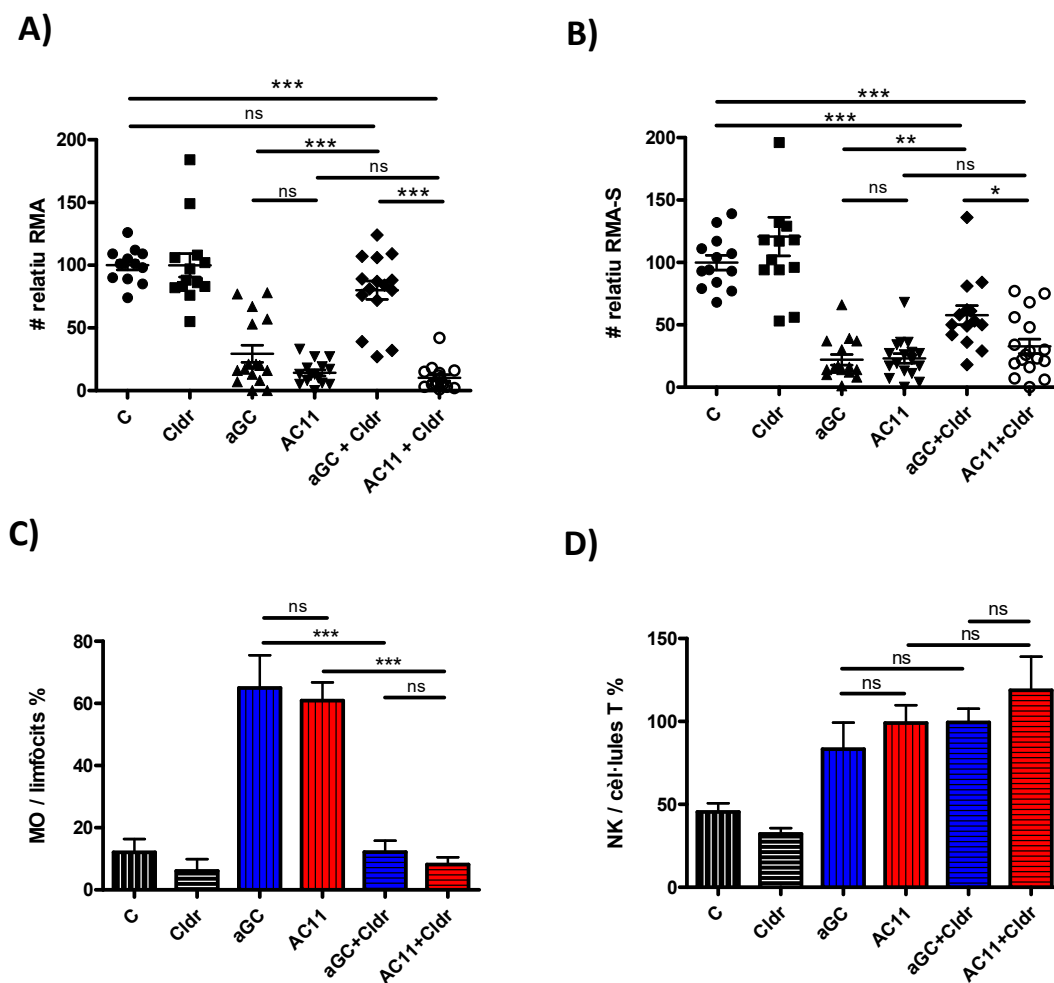
mostrades). En el cas de la resposta contra les RMA-S l'eliminació de les cèl·lules NK suprimeix tant l'activitat antitumoral de l' $\alpha$ GalCer com la del AC11 (Fig.21B) fins a uns nivells iguals als dels animals no tractats amb cap agonista. Així mateix la depleció de les cèl·lules NK en els animals control incrementa lleugerament el nombre de cèl·lules RMA i RMA-S presents en el peritoneu respecte dels animals control. Aquests resultats no són deguts a una alteració de les iNKT per efecte de l'anticòs, ja que encara que moltes d'elles expressen NK1.1 constitutivament, quan són activades al cap de 24 hores es produeix una *downregulació* d'aquest receptor i no es recupera fins al cap d'un mes aproximadament<sup>243</sup>, de manera que no s'eliminen amb l'anticòs (Fig.21D). Per tant podem dir que la resposta antitumoral de l' $\alpha$ GalCer contra les RMA és totalment dependent de les cèl·lules NK, però en canvi la resposta amb l'AC11 només ho és parcialment. La resposta contra les RMA-S en els dos casos és totalment dependent de les cèl·lules NK.

### 4.8.2.2. Eliminació dels macròfags (M $\emptyset$ ):

Els M $\emptyset$  són unes altres cèl·lules efectores amb capacitat citotòxica antitumoral. Per aquest motiu vam estudiar l'efecte de la seva eliminació en aquest model de citotoxicitat *in vivo*. La depleció es va efectuar mitjançant l'administració i.p de liposomes amb clodronat un dia abans de la transferència de les cèl·lules tumorals. El tractament amb clodronat també elimina les DC fagocítiques, però el fet d'administrar el clodronat 3 dies després que els agonistes minimitza els possibles efectes en la presentació.

L'eliminació dels M $\emptyset$  (Fig.22C) en els animals administrats amb  $\alpha$ GalCer suprimeix totalment l'activitat antitumoral contra les RMA (Fig.22A); per el contrari en els animals tractats amb AC11 no produeix cap efecte. En el cas de les RMA-S l'eliminació dels M $\emptyset$  en els animals tractats amb  $\alpha$ GalCer fa que disminueixi la resposta antitumoral però no l'elimina (Fig.22B), i en els tractats amb AC11 tan sols produeix una lleu inhibició no significativa de la resposta. Tal i com es podria arribar a pensar la inhibició de l'activitat antitumoral que produeix el clodronat no és deguda a una disminució en el nombre de cèl·lules NK del peritoneu (Fig.22D), ja que tot i que en aquest cas no hem pogut arribar

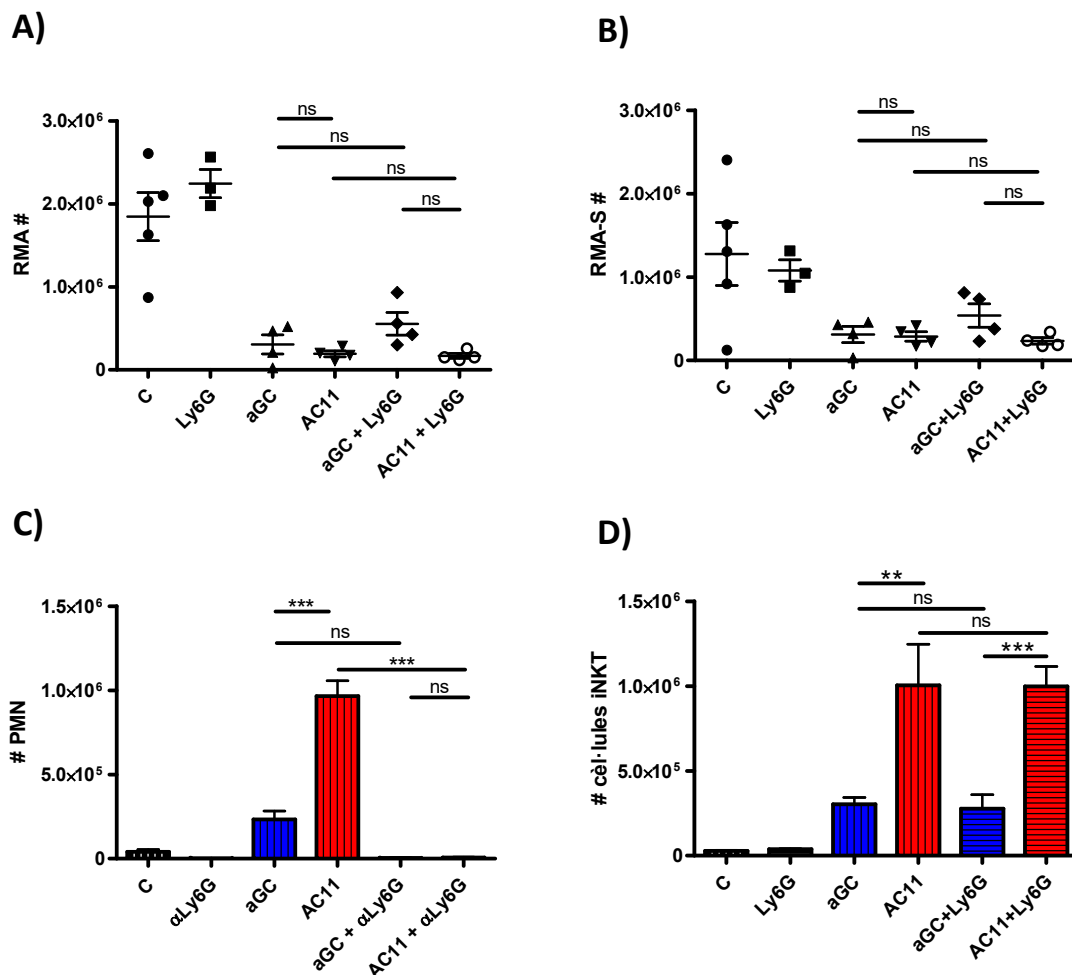
a quantificar amb precisió el nombre total de cèl·lules NK, degut a la interferència que produeix el clodronat amb les *beads* que utilitzem per fer el recompte, podem veure que la relació NK-T no s'altera. Aquestes dades posen de manifest una important diferència funcional entre les respostes antitumorals de l' $\alpha$ GalCer i l'AC11, sobretot en el cas de les RMA on l'activitat antitumoral de l' $\alpha$ GalCer és totalment dependent de la presència dels M $\emptyset$ , mentre que amb l'AC11 és totalment independent de la presència d'aquestes cèl·lules.



**Figura 22.** L'eliminació dels M $\emptyset$  suprimeix totalment la resposta antitumoral de l' $\alpha$ GalCer contra les RMA, però no afecta a la resposta de l'AC11. Administració i.p de 100ng de  $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle. A les 48h administració i.p de 200 $\mu$ l de liposomes amb clodronat. Passades 24h inoculació i.p de 3,5 $\times$ 10<sup>6</sup> RMA-S i 0,7 $\times$ 10<sup>6</sup> RMA. Al cap de 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del Peritoneu . A) Nombre relatiu de cèl·lules RMA. B) Nombre relatiu de cèl·lules RMA-S. C) Percentatge de M $\emptyset$  respecte dels limfòcits. D) Percentatge de cèl·lules NK respecte dels limfòcits T. Les gràfiques A i B corresponen a quatre experiments independents, les gràfica C a dos experiments i la D a tres experiments independents. Anàlisi estadístic realitzat amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

#### 4.8.2.3. Eliminació dels neutròfils (PMN):

Els neutròfils són cèl·lules de la immunitat innata que en alguns casos també poden exercir una activitat antitumoral. Per aquest motiu també vam voler comprovar quin paper tenen en aquest model de citotoxicitat antitumoral a través de la seva eliminació. Per a realitzar l'eliminació vam utilitzar l'anticòs 1A8, un anti-Ly6G que elimina específicament els neutròfils. Segons la bibliografia una única dosi i.p d'anticòs 1A8 és suficient per eliminar més del 90% dels neutròfils en la sang i un 80% en la melsa <sup>253</sup>.



**Figura 23.** L'administració d'anti-Ly6G no afecta la resposta antitumoral de l'αGalCer i el AC11 envers les RMA i les RMA-S. Administració i.p de 100ng de αGalCer, AC11 o vehicle. A les 48h administració i.p de 250 μg de 1A8 (Anti-Ly6G). Passades 24h inoculació i.p de 3,5×10<sup>6</sup> RMA-S i 0,7×10<sup>6</sup> RMA. Al cap de 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del Peritoneu. A) Nombre total de cèl·lules RMA. B) Nombre total de cèl·lules RMA-S. C) Nombre total de PMN en el peritoneu. D) Nombre total de cèl·lules iNKT en el peritoneu. Resultats corresponents a un únic experiment. Anàlisi estadístic realitzat amb One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,005; \*\*\*P<0,0005).

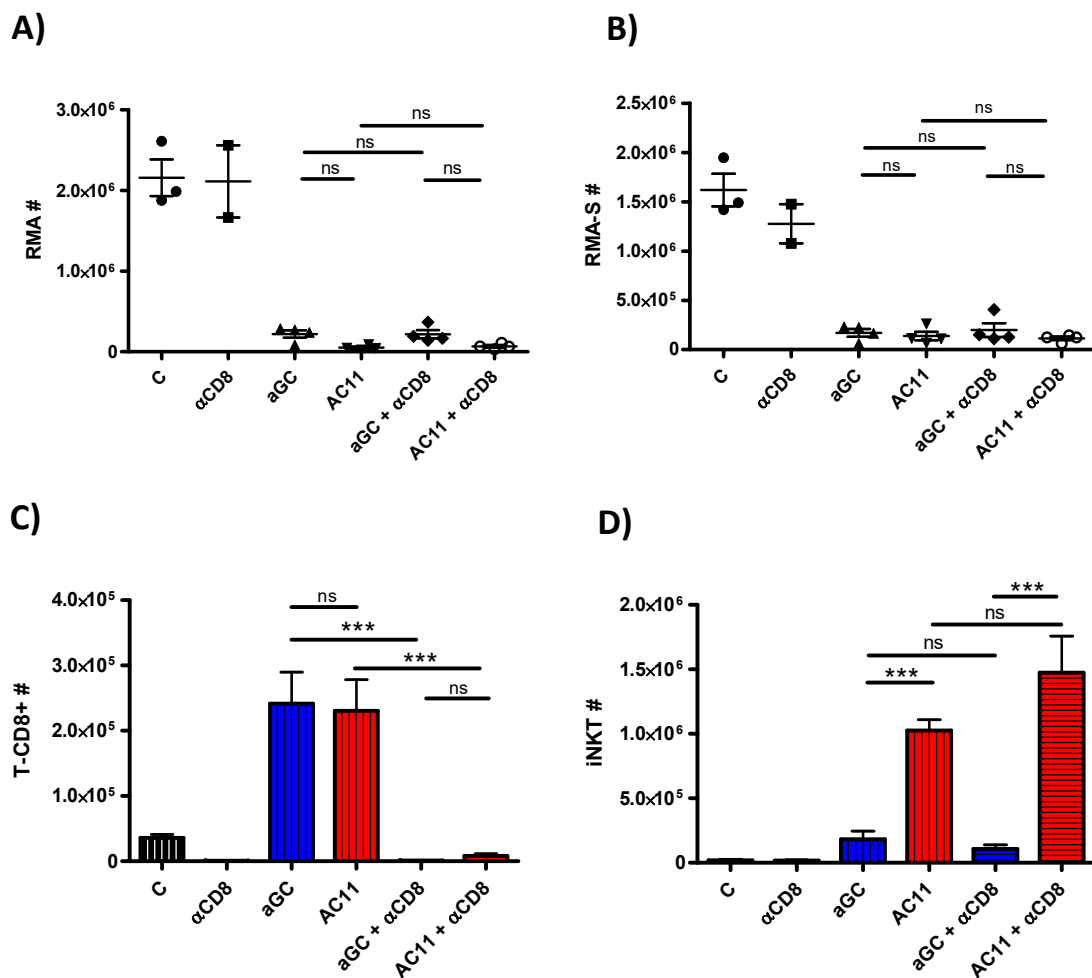
Veiem que en el peritoneu dels animals control que no han estat administrats amb agonista el nombre de neutròfils és molt baix (Fig.23C), però quan s'administren els agonistes es produeix un augment molt important d'aquestes cèl·lules, sobretot amb l'AC11. L'administració d'anti-Ly6G elimina completament els neutròfils tant en els animals no tractats amb agonista com en els animals tractats. El fet d'eliminar els neutròfils però no modifica la resposta antitumoral ni de l' $\alpha$ GalCer ni del AC11 contra cap de les dos línies tumorals (Fig.23A i 23B), tot i que en el cas de la resposta de l' $\alpha$ GalCer contra les RMA-S sembla haver-hi una petita disminució no significativa de la citotoxicitat. L'eliminació dels neutròfils tampoc produeix cap efecte en el nombre de cèl·lules iNKT (Fig.23D). Aquestes dades descarten per tant qualsevol efecte important dels neutròfils en aquest model de citotoxicitat *in vivo*.

#### 4.8.2.4. Eliminació dels limfòcits T-CD8:

Els limfòcits T-CD8 citotòxics són les principals cèl·lules efectores de la immunitat adaptativa. En el nostre model de citotoxicitat *in vivo* teòricament els limfòcits T-CD8 específics no hi haurien d'intervenir, ja que el temps transcorregut des de la inoculació del tumor fins a l'anàlisi de la resposta (24 hores) no és suficient per a generar una resposta específica. Tot i això també s'ha descrit l'existència de limfòcits T-CD8 no específics que actuen de manera innata<sup>254</sup>. Per tal d'analitzar l'efecte de qualsevol tipus de limfòcit T-CD8 en el model de citotoxicitat *in vivo* estudiat, hem utilitzat un anticòs anti-CD8 per eliminar les cèl·lules T-CD8. L'anticòs utilitzat és el 2.43, un anticòs anti-CD8 amb una comprovada eficàcia depleccionant<sup>255</sup>. L'administració de l'anticòs també elimina les DC CD8+ que són cèl·lules capaces de presentar els agonistes<sup>158</sup>, però el fet d'administrar l'anti-CD8 dos dies després de la injecció dels compostos hauria d'atorgar un temps suficient perquè les DC CD8+ ja els hagin pogut presentar, i per tant la resposta antitumoral estigui mínimament afectada.

Veiem que l'eliminació de les cèl·lules T-CD8 en el peritoneu quan s'administra l'anti-CD8 (2.43) és gairebé total (Fig.24C), tant en els animals administrats amb vehicle com en els animals administrats amb agonista iNKT. Tot i la gran expansió en el nombre total

de limfòcits T-CD8 que produeixen l'αGalCer i l'AC11, com era d'esperar l'eliminació d'aquestes cèl·lules no afecta a la resposta antitumoral amb cap dels dos compostos (Fig.24A i 24B). Tampoc la probable eliminació de les DC CD8+ té cap efecte en la resposta, segurament per els motius esmentats anteriorment. En aquest cas a diferència dels altres experiments de depleció, degut a uns resultats tan evidents com esperables i també per motius econòmics només hem realitzat un únic experiment.



**Figura 24.** L'eliminació de les cèl·lules T-CD8 no afecta la resposta antitumoral de l'αGalCer i el AC11 envers les RMA i les RMA-S. Administració i.p de 100ng de αGalCer, AC11 o vehicle. A les 48h administració i.p de 250 μg de 2.43 (Anti-CD8). Passades 24h inoculació i.p de 3,5×10<sup>6</sup> RMA-S i 0,7×10<sup>6</sup> RMA. Al cap de 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del peritoneu. A) Nombre relatiu de cèl·lules RMA. B) Nombre relatiu de cèl·lules RMA-S. C) Nombre total de cèl·lules T-CD8 en el peritoneu. Resultats corresponents a un únic experiment. Resultats comparats amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

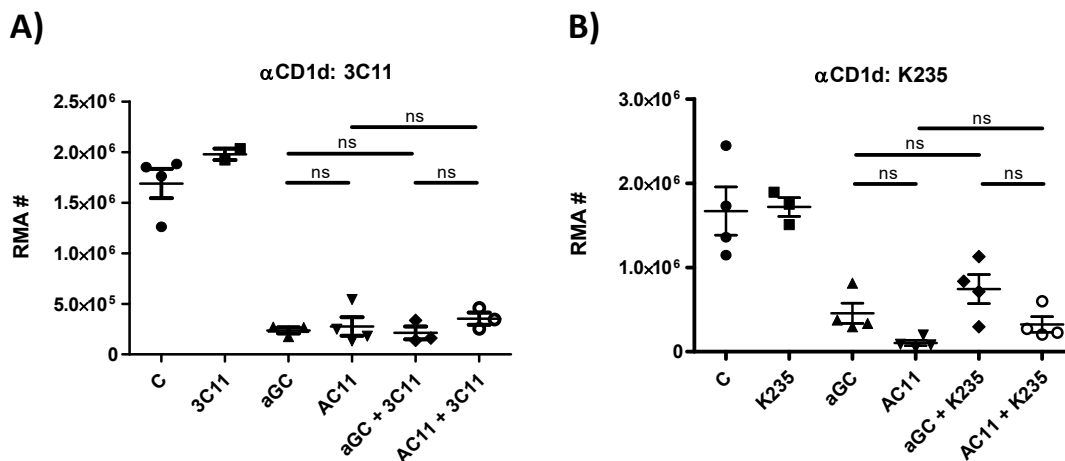


#### 4.8.2.5. Citotoxicitat *in vivo* amb bloqueig/eliminació del CD1d en les cèl·lules tumorals

El fet que amb cap de les eliminacions selectives de cèl·lules citotòxiques clàssiques (NK, MØ, PMN i T-CD8) en els animals tractats amb AC11 s'aconsegueixi una inhibició total de la resposta antitumoral contra les RMA, ens va fer hipotetitzar que les cèl·lules iNKT també podien estar exercint una activitat citotòxica contra les RMA. El gran augment en el nombre de cèl·lules iNKT que es produeix en el peritoneu amb l'administració d'AC11 (Fig.13A) i l'existència d'alguns estudis on es demostra la capacitat de les cèl·lules iNKT per exercir una activitat citotòxica depenent de CD1d sobre diversos tipus de cèl·lules tumorals<sup>183,256</sup> *in vitro* així ens ho van fer pensar.

Per estudiar si les iNKT exerceixen activitat citotòxica enfront les RMA vam repetir els experiments de citotoxicitat realitzant un bloqueig amb anticossos del CD1d de les cèl·lules RMA. L'esquema de l'experiment és molt similar al dels experiments de citotoxicitat anteriors, realitzant l'administració dels compostos tres dies abans que la de les cèl·lules tumorals. Abans d'injectar les cèl·lules RMA les vam incubar amb anti-CD1d. Juntament amb les RMA també vam injectar en el peritoneu anti-CD1d soluble per tal de bloquejar el CD1d produït *de novo* durant les 24 hores que les cèl·lules estarien en el peritoneu, mantenint així el bloqueig. El fet d'haver administrat l' $\alpha$ GalCer i l'AC11 tres dies abans, tenint en compte la cinètica de presentació i activació de la resposta immune per part d'aquests compostos, hauria de reduir els possibles efectes en la resposta antitumoral derivats del bloqueig del CD1d en les APC per part de l'anticòs soluble. A diferència dels altres experiments de citotoxicitat *in vivo*, en aquest cas no hem injectat cèl·lules RMA-S, ja que d'aquesta manera augmentem la disponibilitat d'anti-CD1d perquè es pugui bloquejar més eficientment el CD1d de les RMA. Aquests experiments de bloqueig els hem realitzat utilitzant dos anticossos anti-CD1d diferents; el 3C11 que és un anticòs de rata contra CD1d de ratolí i que s'ha comprovat que no s'uneix als receptors d'Fc de ratolí i per tant no activa l'ADCC<sup>183</sup> i el K235 que és un anticòs de ratolí contra CD1d de ratolí però que no sabem si indueix citotoxicitat per si mateix.

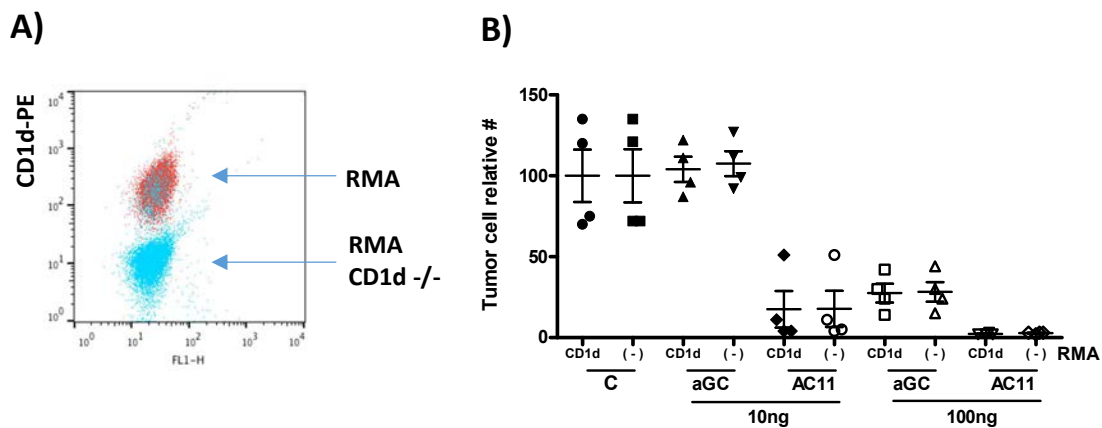
Els resultats mostren que cap dels dos anticossos no té un efecte significatiu en la resposta antitumoral envers les RMA (Fig.25A i 25B). També veiem que en els grups de ratolins sense injectar amb compost, que ni el 3C11 ni el K235 incrementen de manera inespecífica la resposta citotòxica enfront les RMA. De totes maneres aquesta aproximació no garanteix el bloqueig absolut de tot el CD1d expressat en la cèl·lula tumoral, i per tant existeix la possibilitat que la no inhibició de la resposta citotòxica podria sigui deguda al reconeixement d'una petita proporció de CD1d de membrana no unit per l'anticòs. També es podria argumentar que en els animals tractats amb agonista, en els quals les cèl·lules del sistema immune estan fortament activades, l'anti-CD1d provoqués la depleció de les cèl·lules tumorals (ADCC) emmascarant la possible pèrdua d'activitat antitumoral de les iNKT.



**Figura 25.** El bloqueig del CD1d en les RMA no disminueix la resposta citotòxica. Bloqueig del CD1d en les RMA amb anticossos anti-CD1d. Administració i.p de 100ng de  $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle. A les 72h inoculació i.p de  $0,7 \times 10^6$  RMA, o  $0,7 \times 10^6$  RMA prèviament incubades amb  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  d'anticòs anti-CD1d i injectades conjuntament amb  $50 \mu\text{g}$  d'anticòs anti-CD1d. Al cap de 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del peritoneu. A) Experiment realitzat amb l'anticòs 3C11. Nombre total de cèl·lules RMA. B) Experiment realitzat amb l'anticòs K235. Nombre total de cèl·lules RMA. Resultats de la gràfica A corresponents a un únic experiment, resultats de la gràfica B corresponents també a un únic experiment. Anàlisi estadístic realitzat amb: One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

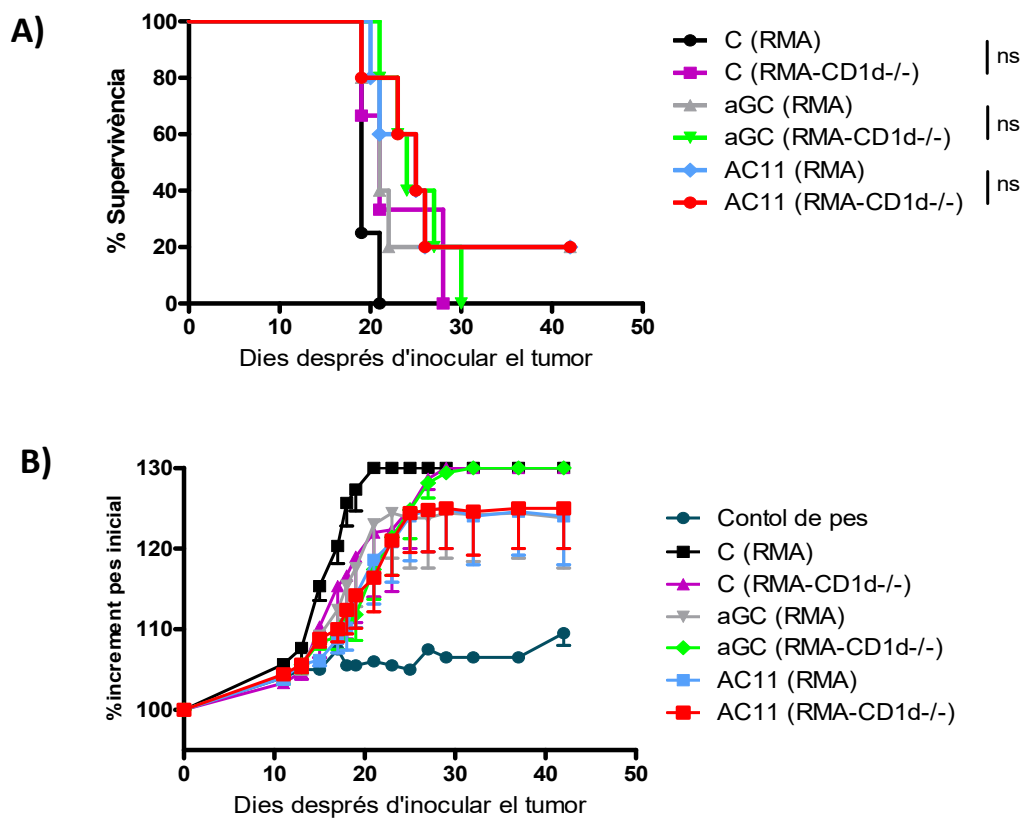
Per tal d'estudiar l'efecte de l'absència de CD1d en la línia RMA i de comprovar amb certesa la validesa dels resultats anteriors vam generar una línia RMA deficient en CD1d utilitzant la tècnica CRISPR-CAS9 (Fig.26A). Aquesta aproximació ens permet eliminar completament qualsevol tipus d'efecte citotòxic que es pogués produir a través de CD1d, sobretot en el cas de l'AC11 amb el qual es produeix una gran expansió de les

cèl·lules iNKT en el peritoneu. Hem realitzat els experiments de citotoxicitat i supervivència *in vivo* amb aquesta nova línia RMA-CD1d<sup>-/-</sup>. Per a realitzar els experiments de citotoxicitat *in vivo* hem seguit el protocol utilitzat habitualment, en el que administrem 100ng d'agonista iNKT tres dies abans d'inocular les cèl·lules tumorals. En aquest cas hem injectat una quantitat igual de cèl·lules RMA i RMA-CD1d<sup>-/-</sup> en els animals, i al cap de 24 hores els hem sacrificat i analitzat el peritoneu. Els resultats no mostren diferències en l'eliminació d'una o altre línia cel·lular, ni amb l'αGalCer ni amb l'AC11 (Fig.26B). Tampoc apareixen diferències quan s'utilitza una dosi més baixa de l'habitual, de 10ng (Fig.26B). Per altre part aquest experiment confirma els resultats dels experiments de dosi-resposta (Fig.19) en els que hem vist que la dosi de 10ng maximitza les diferències en la resposta de l'AC11 i l'αGalCer, i demostra la major potència antitumoral de l'AC11.



**Figura 26.** L'absència de CD1d en les RMA no genera cap efecte en la resposta citotòxica. Administració i.p de 100ng de αGalCer, AC11 o vehicle. A les 72h inoculació i.p de  $0,7 \times 10^6$  RMA i  $0,7 \times 10^6$  RMA-CD1d<sup>-/-</sup>. Al cap de 24h sacrifici dels animals i extracció i anàlisi per citometria del peritoneu. A) Expressió de CD1d en la línia RMA i en la línia mutant RMA-CD1d<sup>-/-</sup>. B) Nombre relatiu de cèl·lules RMA i RMA CD1d<sup>-/-</sup> en el peritoneu. Resultats de la gràfica B representatius de dos experiments.

En els experiments de supervivència també hem seguit el mateix protocol utilitzat anteriorment. Hem injectat una dosi de  $10^4$  cèl·lules RMA o RMA-CD1d<sup>-/-</sup> en el peritoneu dels ratolins, i a les 24 hores hem administrat una dosi i.p de 100ng d'agonista iNKT o vehicle. Després hem seguit periòdicament el pes i l'estat de salut dels animals. Podem veure que el creixement del tumor en el peritoneu és igual amb les RMA que amb les RMA-CD1d<sup>-/-</sup>, i que els tractaments terapèutics afecten de manera anàloga als dos tumors (Fig.27A i 27B). Aquestes dades juntament amb les de citotoxicitat descarten per tant qualsevol efecte important de citotoxicitat a través de CD1d per part de les iNKT en el conjunt de la resposta antitumoral.

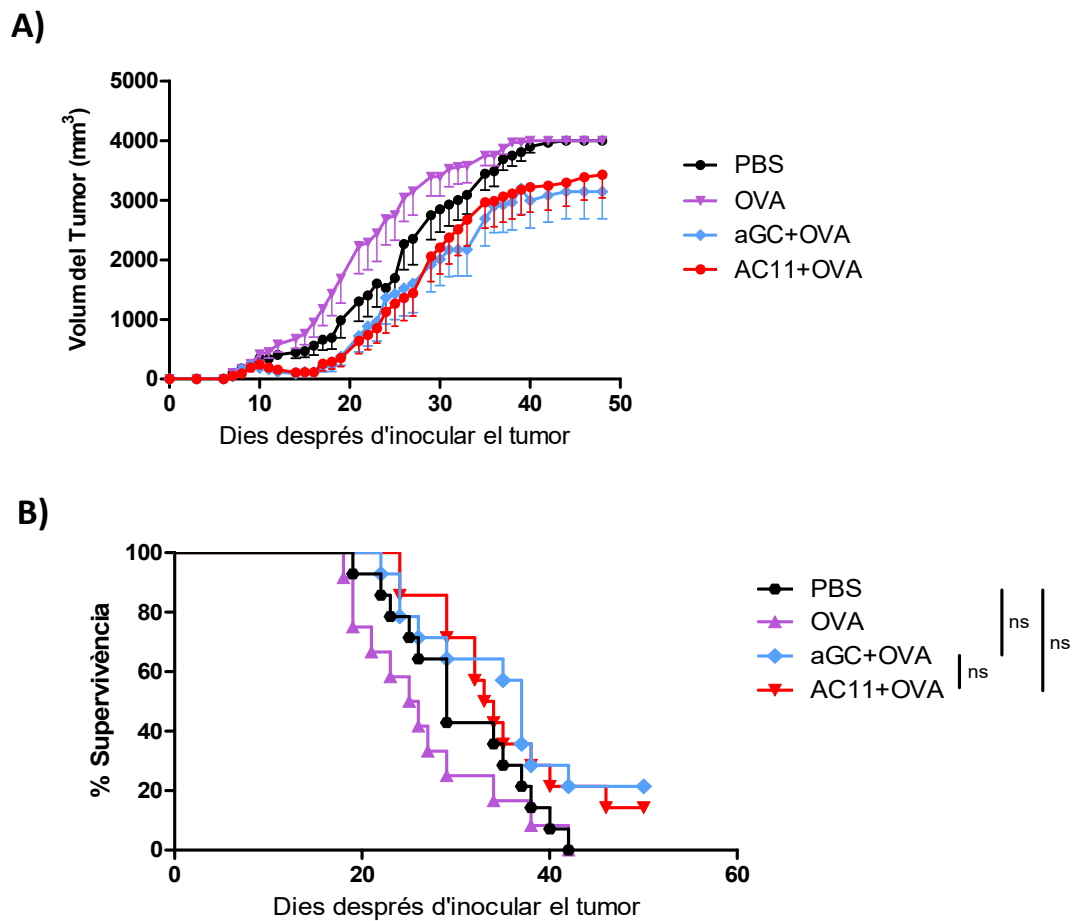


**Figura 27.** Les cèl·lules RMA i les RMA-CD1d<sup>-/-</sup> són igual d'agressives quan són inoculades en el peritoneu dels ratolins C57BL/6. S'injecta per via i.p una dosi de  $10^4$  cèl·lules RMA o RMA-CD1d<sup>-/-</sup>. Al cap de 24 hores s'administra per via i.p una dosi de 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle. Es segueix periòdicament el pes dels animals i es sacrifiquen quan sobrepassa el 25% del pes inicial. A) Supervivència. B) Increment de pes. Resultats de supervivència comparats utilitzant: Mantel-Cox test (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).

#### **4.9. Inducció d'una resposta adaptativa: acció adjuvant de l'AC11**

Des del moment en que es van descobrir les potents capacitats activadores de l' $\alpha$ GalCer sobre el sistema immune s'ha estat utilitzant aquest compost com a adjuvant per a potenciar respostes específiques en una gran varietat de vacunes experimentals antitumorals<sup>198,204,257,258</sup>. Amb l'objectiu d'estudiar si la resposta immune provocada per l'AC11 també és capaç de potenciar una resposta específica, hem posat a punt un experiment de vacunació antitumoral envers el model tumoral EG-7. La línia EG-7, que deriva d'un limfoma T, quan és injectada per via s.c en la part baixa de l'esquena dels ratolins C57BL/6 genera un tumor sòlid. Al cap d'una setmana d'inocular les cèl·lules tumorals el tumor és clarament visible, i a les 6 setmanes assoleix el volum màxim establert per els comitès d'ètica animal. El fet que la línia EG-7 expressi de manera constitutiva la proteïna OVA permet disposar d'un antigen tumoral conegut enfront el qual poder vacunar i estudiar la resposta immune específica. Es van inocular ratolins de la soca C57BL/6 amb  $1 \times 10^6$  cèl·lules EG-7 per via s.c. Al cap de 3 dies se'ls hi va administrar una única dosi de vacuna terapèutica (OVA i  $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle). Un cop inoculades les cèl·lules tumorals es va seguir periòdicament el creixement del tumor.

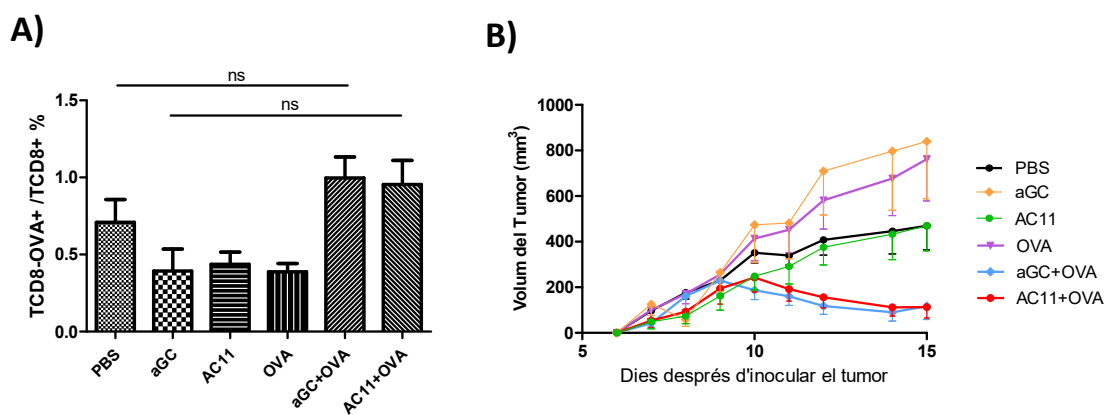
Podem veure que cap tractament no és capaç de produir un increment significatiu en la supervivència dels ratolins respecte dels animals administrats només amb vehicle (Fig.28B). Tot i això en el cas dels tractaments combinats d' $\alpha$ GalCer o AC11 i OVA si que es produeix un petit retard en el creixement del tumor i un increment no estadísticament significatiu en el temps de supervivència. Si la comparació dels tractaments combinats es fa amb el grup d'animals administrats només amb OVA l'increment de la supervivència és molt més evident.



**Figura 28.** Vacunació terapèutica enfront la línia EG-7. Ratolins C57BL/6 inoculats a l'esquena amb  $1 \times 10^6$  cèl·lules EG-7 per via s.c. Animals tractats a D+3 amb  $500 \mu\text{g}$  OVA i/o  $250 \text{ng}$  d' $\alpha\text{GalCer}$ , AC11 o vehicle. A) Creixement del tumor. Els animals han estat sacrificats quan el volum del tumor ha assolit  $4000 \text{mm}^3$  B) Supervivència amb els diferents tractaments. Resultats corresponents a dos experiments independents. Anàlisi estadístic realitzat amb Mantel-Cox Test : \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ .

Els tractaments combinats d' $\alpha\text{GalCer}$  o AC11 conjuntament amb la proteïna OVA produeixen un augment no significatiu en els percentatges de cèl·lules T-CD8 específiques d'OVA en la melsa respecte dels animals tractats únicament amb vehicle o proteïna OVA (Fig.29A). Quan els compostos s'administren sense OVA l'augment en el percentatge de cèl·lules TCD8 específiques d'OVA no es produeix, fet que indica que l'increment de les cèl·lules TCD8 específiques d'OVA es degut a l'efecte adjuvant dels agonistes. En la gràfica de creixement del tumor si ens fixem únicament en les etapes inicials del creixement del tumor (Fig.29B), durant els primers 15 dies, veiem que els tractaments combinats d'agonista iNKT i OVA produeixen una clara regressió en el creixement del tumor, un efecte que no passa quan administrem els compostos sense OVA. En els animals que únicament han estat tractats amb OVA o  $\alpha\text{GalCer}$  el creixement

del tumor és fins i tot més ràpid que en els animals control sense tractar. Encara que els tractaments combinats en aquestes condicions experimentals no aconseguen augmentar de manera significativa el temps de supervivència dels animals, està clar que tant l' $\alpha$ GalCer com l'AC11 quan s'administren conjuntament amb OVA són capaços d'actuar d'adjuvants en la generació d'una resposta específica contra el tumor, encara que no siguin capaços de controlar de manera efectiva el creixement del tumor a llarg termini.



**Figura 29.** Vacunació terapèutica enfront la línia EG-7. A) Percentatge de cèl·lules TCD8-OVA específiques respecte al total de cèl·lules TCD8+ en la Melsa. B) Creixement del tumor durant els 15 dies posteriors a la inoculació. Resultats corresponents a dos experiments independents. Anàlisi estadístic realitzat amb One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

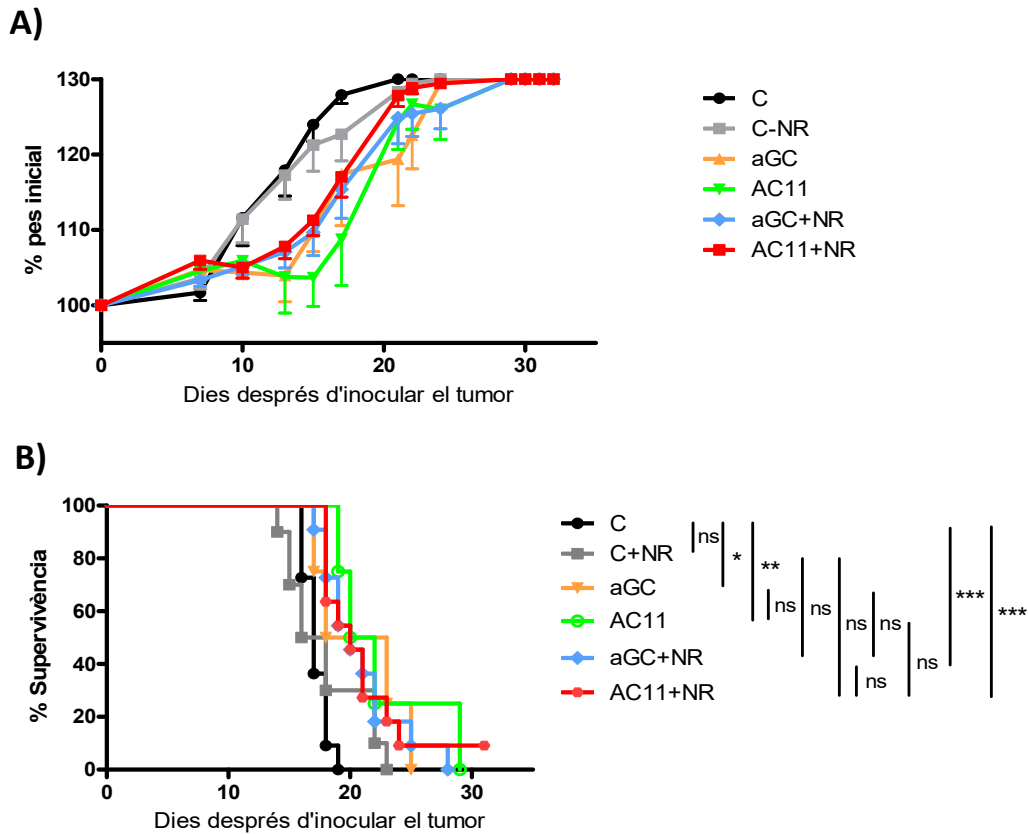
#### **4.10. Vacunació amb cèl·lules necròtiques i agonistes iNKT**

Com hem comentat abans, la inoculació de cèl·lules RMA en el peritoneu dels ratolins C57BL/6 esdevé letal al cap de 3-4 setmanes. Amb l'objectiu d'induir una resposta immune específica capaç de limitar l'expansió de les cèl·lules RMA en el peritoneu, hem assajat la possible eficàcia d'una vacuna terapèutica composta per cèl·lules RMA necròtiques i  $\alpha$ GalCer o AC11. Les cèl·lules tumorals intactes són poc immunogèniques, entre d'altres motius per una falta de senyals estimuladores del sistema immune innat que incrementin la resposta específica. Les cèl·lules necròtiques han sofert un dany estructural irreparable per acció d'un estrès fisico-químic extrem que ha destruït la integritat de la cèl·lula i exposat el seu contingut al medi extern. Aquest procés permet l'alliberació de DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) que al ser reconeguts per les DC indueixen la seva maduració<sup>259</sup> i l'activació d'una resposta inflamatoria<sup>260</sup>. Les DC madures poden capturar i presentar antígens tumorals donant lloc a l'expansió de les cèl·lules T-CD8 específiques dels antígens tumorals<sup>261</sup>. Amb aquesta estratègia es pot generar una resposta contra diversos antígens tumorals, que haurien de ser utilitzats per el sistema immune per a desenvolupar una resposta antitumoral més efectiva que en els experiments de vacunació amb OVA com a únic antigen, tot i que en aquest cas el fet de no conèixer la identitat dels antígens ens impedeix analitzar la formació de cèl·lules específiques de tumor. Per a comprovar la possible eficàcia d'aquesta vacuna hem inoculat ratolins C57BL/6 per via i.p amb una dosi de  $10^4$  cèl·lules RMA. Tres dies després els hi hem administrat una única dosi de vacuna terapèutica consistent en l'administració per via i.p de  $1 \times 10^6$  cèl·lules RMA necròtiques i/o 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11. Hem seguit periòdicament el pes dels animals i els hem sacrificat quan el pes inicial s'ha incrementat en un trenta per cent.

Els tractaments únicament amb 100ng d' $\alpha$ GalCer o d'AC11 són capaços d'augmentar significativament el temps de supervivència dels animals (Fig.30). La incorporació de les cèl·lules necròtiques als tractaments amb  $\alpha$ GalCer o AC11 no produeixen un augment estadísticament significatiu de l'eficàcia dels tractaments. L'administració d'únicament cèl·lules necròtiques tampoc genera cap benefici terapèutic respecte dels animals que només han estat injectats amb vehicle. Aquestes dades posen de relleu la poca



efectivitat de les cèl·lules necròtiques per a generar una resposta específica amb aquesta pauta terapèutica.



**Figura 30.** Vacunació terapèutica enfront la línia RMA. Ratolins C57BL/6 inoculats i.p amb  $1 \times 10^4$  cèl·lules RMA. Animals tractats a D+3 amb  $1 \times 10^6$  cèl·lules RMA necròtiques i/o 100ng d' $\alpha$ GalCer, AC11 o vehicle. A) Pes dels animals. Els animals han estat sacrificats quan el pes s'ha incrementat un trenta per cent respecte el pes inicial. B) Supervivència dels animals amb els diferents tractaments. Resultats corresponents a dos experiments independents. Anàlisi estadístic realitzat amb test de Mantel-Cox (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). NR: cèl·lules necròtiques.

#### **4.11. Aplicació terapèutica de les iNKT en el tractament de limfoma B amb anti-CD20**

En l'última dècada la teràpia amb anticossos Anti-CD20 s'ha mostrat eficaç en el tractament del limfoma no-Hodgkin i d'algunes malalties autoimmunitàries <sup>262</sup>. Els limfomes no-Hodgkin són un grup heterogeni de malalties de tipus cancerós que es desenvolupen a partir de la divisió incontrolada d'un limfòcit. Aquests limfomes es poden desenvolupar tant a partir d'un limfòcit B com d'un limfòcit T, encara que els més freqüents són els que ho fan a partir d'un limfòcit B que representen aproximadament el 95 per cent del total dels limfomes no-Hodgkin. Dins el grup dels limfomes no-Hodgkin de cèl·lules B gairebé un 98 per cent són positius per CD20. Aquest darrer fet explica en part els bons resultats obtinguts amb el tractament amb Rituximab, un anticòs Anti-CD20 que va ser el primer anticòs monoclonal aprovat per a tractament en humans. Els resultats de la teràpia amb Rituximab han estat tan bons que en alguns casos ja s'utilitza com a tractament de primera línia per davant de la quimioteràpia. Tot i això, encara es segueixen produint moltes morts per aquest tipus de malalties, sobretot en els casos on el limfoma es detecta en un estadi avançat i els tractaments no són prou efectius. Per aquest motiu es requereixen nous tractaments o estratègies capaces d'augmentar l'efectivitat dels que ja estan disponibles.

Un factor clau per a poder millorar els tractaments és conèixer amb precisió els mecanismes d'actuació. En el cas del Rituximab s'han proposat diversos mecanismes per a explicar el seu efecte antitumoral; inducció directe de l'apoptosi en les cèl·lules on s'uneix l'anticòs, citotoxicitat depenent del complement i ADCC. També s'ha hipotetitzat que el tractament amb Rituximab després de l'efecte citotòxic inicial, pot ser capaç d'induir una resposta adaptativa enfront el tumor d'una manera similar a com ho fa una vacuna<sup>263</sup>. D'entre tots els mecanismes esmentats l'ADCC és el que sembla jugar un paper més destacat, com a mínim en la resposta antitumoral inicial<sup>264,265</sup>. En estudis clínics s'ha pogut comprovar com en alguns pacients amb determinats polimorfismes en el receptor FcγRIIIA que fan augmentar l'afinitat del receptor per el Rituximab, el benefici terapèutic és major, posant de manifest el paper de l'ADCC com un mecanisme antitumoral important en l'acció terapèutica de l'anticòs<sup>206,266</sup>. En estudis *in vivo* utilitzant ratolins s'ha comprovat que l'acció antitumoral de diversos anticossos anti-

CD20 és exclusivament dependent dels macròfags i dels receptors FcγRI, FcγRIII i FcγRIV<sup>251</sup>. Més recentment s'ha vist que l'eliminació tant de les cèl·lules B normals com dels limfomes per efecte dels anticossos anti-CD20 es porta a terme majoritàriament en el fetge per acció de les cèl·lules de Kupffer<sup>267</sup>. Aquest mecanisme també ha demostrat ser vàlid amb anticossos de diferents especificitats i amb altres cèl·lules tumorals<sup>268</sup>.

Amb aquests antecedents hem hipotetitzat que l'activitat immunoestimuladora dels agonistes iNKT i en particular de l'AC11 podria tenir un efecte sinèrgic capaç d'incrementar l'acció depleccionant dels anticossos anti-CD20. L'IFNγ és una citocina que activa potentment les activitats efectoras dels macròfags com l'ADCC<sup>269</sup>. La gran producció d'IFNγ que genera l'administració d'AC11 hauria d'activar les cèl·lules de Kupffer per a que siguin més eficients en l'eliminació de les cèl·lules B unides amb l'anticòs. A més en un estudi de microscòpia intravital demostren que les cèl·lules de Kupffer interactuen directament amb les cèl·lules iNKT a través de CD1d, i que poden presentar αGalCer generant un bucle de retroalimentació capaç de limitar l'expansió en l'organisme de patògens infecciosos com la bactèria *Borrelia burgdorferi*<sup>113</sup>.

### **4.11.1. Sinèrgia dels activadors iNKT en l'efecte depleccionant de l'anti-CD20 sobre els limfòcits B**

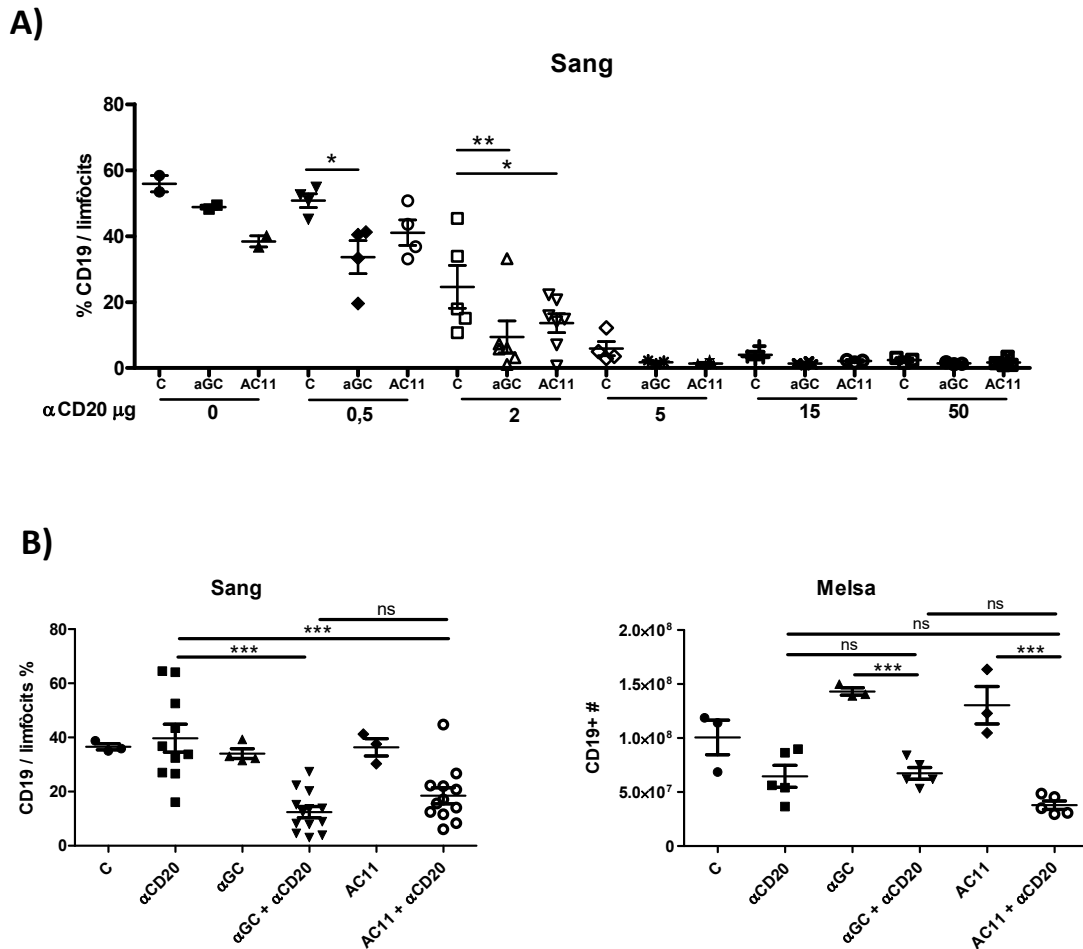
Amb l'objectiu de comprovar si l'activació de les cèl·lules iNKT és capaç d'augmentar l'acció depleccionant del tractament amb anticòs anti-CD20, hem estudiat la viabilitat d'un tractament combinat entre un lligand activador d'iNKT i un anticòs anti-CD20 en l'eliminació de cèl·lules B endògenes. Hem administrat en ratolins C57BL/6 una única dosi i.p de 100ng d'agonista iNKT i/o a les 24 hores l'anti-CD20 a diverses dosis de 0.5, 2, 5, 15 o 50μg. Al cap de 24 o 72 hores, que és quan l'anticòs assoleix el màxim efecte, hem sacrificat els animals i analitzat per citometria l'eliminació de cèl·lules B en la sang, la melsa i la medul·la òssia. L'idea és que amb aquesta pauta d'administració fem coincidir el moment d'injectar l'anti-CD20 amb el pic de producció d'IFNγ, potenciant així el possible efecte sinèrgic. L'anticòs anti-CD20 utilitzat ha estat el 5D2, una IgG2a amb una demostrada capacitat per a eliminar *in vivo* les cèl·lules B normals i tumorals

<sup>267</sup>. En ratolins sans una única dosi de 50µg i.v de 5D2 al cap de 16 hores elimina el 80 per cent del total de cèl·lules B en la sang i gairebé un 50 per cent en la Melsa.

Veiem que a les 24 hores d'administrar les dosis de 50, 15 o 5µg d'anti-CD20 desapareixen pràcticament totes les cèl·lules B de la sang, i per tant no es pot observar cap possible efecte sinèrgic de l'αGalCer o l'AC11 (Fig.31A). Per el contrari quan injectem dosis menors, de 2µg o 0,5µg l'eliminació no és total, i en aquest cas l'administració prèvia d'αGalCer o AC11 fa disminuir els percentatges de cèl·lules B circulants. Tot i això aquest efecte pot ser degut al fet que tant l'αGalCer com l'AC11 per si mateixos ja fan disminuir el percentatge de cèl·lules B en la sang, havent-hi una major disminució no per un augment en l'eliminació sinó per un efecte de mobilització. Degut a aquest efecte dels agonistes iNKT en els limfòcits B de la sang a les 48 hores, hem estudiat també l'efecte al cap de 96 hores. Aquesta vegada només hem utilitzat 2µg d'anticòs deplecionant i 100ng d'activador iNKT. Al cap de 72 hores (96 hores després dels agonistes iNKT) d'haver administrat l'anticòs el percentatge de cèl·lules B circulants disminueix de manera significativa amb els dos tractaments combinats d'agonista iNKT i anticòs deplecionant (Fig.31B), però ni els agonistes ni l'anti-CD20 per si mateixos provoquen en aquest cas una disminució dels limfòcits B circulants. Així doncs es produeix un efecte sinèrgic entre els agonistes iNKT i l'anti-CD20 en l'eliminació de les cèl·lules B en sang.

En la melsa l'administració només de l'anticòs fa disminuir el nombre total de cèl·lules B al cap de 72 hores (Fig.31B). L'administració únicament d'αGalCer o AC11 sense anticòs incrementa el nombre de cèl·lules B respecte dels animals control com a conseqüència de l'activitat immunoestimuladora que hem descrit, però quan els agonistes també s'administren amb anti-CD20 el nombre de cèl·lules B disminueix fins a uns nivells similars als dels animals només tractats amb anti-CD20. Amb el tractament combinat d'AC11 la depleció sembla ser major que amb el tractament combinat d'αGalCer o amb el anti-CD20, encara que la diferència no és estadísticament significativa. Aquestes dades indiquen que els tractaments combinats produeixen en la melsa un efecte sinèrgic en la depleció de les cèl·lules B, però degut a l'augment en el

nombre total de cèl·lules B produït per els agonistes la disminució neta de cèl·lules B no és significativament major que quan només s'administra anti-CD20.



**Figura 31.** Eliminació de cèl·lules B amb anti-CD20 i  $\alpha$ GalCer o AC11. A) Administració i.p de 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11. Al cap de 24 hores administració i.v de diferents dosis d'anti-CD20, i 24 hores després sacrifici dels animals i anàlisi per citometria dels limfòcits en la sang. B) Administració i.p de 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11. Al cap de 24 hores administració i.v de 2 $\mu$ g d'anti-CD20, i 72 hores després sacrifici dels animals i anàlisi per citometria dels limfòcits de la sang i la melsa. Resultats representatius de dos experiments. Anàlisi estadístic realitzat amb One-way ANOVA amb test de Newman-Keuls (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

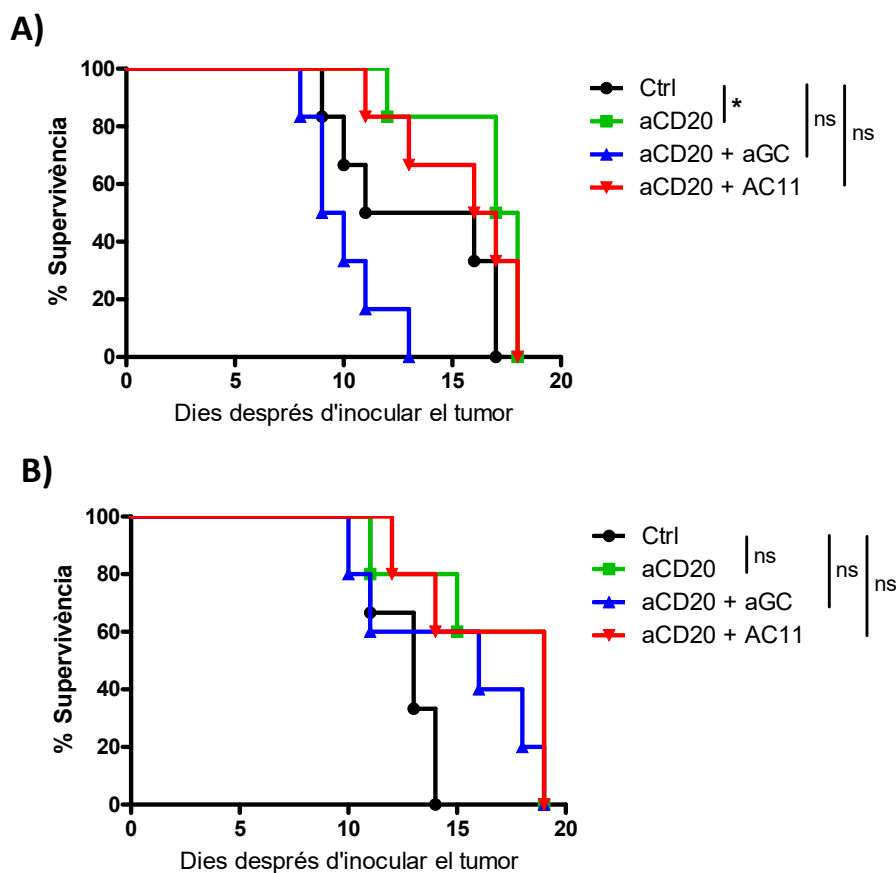
#### 4.11.2. Tractament combinat amb agonistes iNKT i anticòs anti-CD20 en un model de limfoma no-Hodgkin

Hem volgut comprovar si l'augment en l'eliminació de les cèl·lules B endògenes observat amb el tractament combinat entre lligand activador de les cèl·lules iNKT i anticòs anti-CD20 és capaç de generar algun benefici terapèutic enfront d'un limfoma no-Hodgkin. Per a generar el limfoma hem utilitzat cèl·lules tumorals extretes directament d'un ratolí E $\mu$ -myc, tal i com es descriu en l'apartat 3.22 de materials i mètodes. Aquest és un ratolí transgènic produït a partir de la soca C57BL/6 que expressa de manera constitutiva el gen c-myc, fent que ràpidament desenvolupi un limfoma no-Hodgkin de tipus limfoma de Burkitt. Les cèl·lules tumorals primàries extretes dels tumors del ratolí E $\mu$ -myc s'anomenen BL3750, expressen CD20 i són àmpliament utilitzades en estudis d'aquest tipus<sup>270</sup>. Hem injectat en ratolins C57BL/6 una quantitat de 10<sup>5</sup> cèl·lules BL3750 per via i.v. A les 24 hores hem administrat 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11 i.p i 24 hores després (a les 48 hores respecte de la inoculació del tumor) hem administrat l'Anti-CD20. En aquest cas la dosi d'anticòs que hem injectat ha estat de 5 $\mu$ g i.v. Els animals han estat controlats diàriament i s'han sacrificats quan han començat a mostrar símptomes evidents de malaltia (adenopaties, pèrdua de mobilitat, tremolors).

El tractament amb una dosi de només 5 $\mu$ g d'anticòs és capaç d'augmentar la supervivència respecte dels animals control (Fig.32A). Sorprenentment el tractament combinat amb  $\alpha$ GalCer no tan sols no millora la supervivència respecte dels animals control, sinó que l'empitjora. Per el contrari el tractament conjunt amb AC11 tot i que no augmenta la supervivència respecte dels animals únicament tractats amb anti-CD20, no l'empitjora. És evident per tant que els agonistes produeixen alguns efectes contradictoris als de l'anticòs, com pot ser la inducció de la proliferació i/o mobilització dels limfòcits B que possiblement també afecta al limfoma, contrarestant el possible efecte beneficiós de la teràpia.

A conseqüència d'aquests resultats vam decidir modificar la pauta d'administració del tractament, injectant l'anticòs i els agonistes el mateix dia, 5 dies després de la inoculació de les cèl·lules tumorals. L'idea per aplicar aquesta modificació en el tractament era que una administració massa aviat dels agonistes, sobretot de l' $\alpha$ GalCer,

pot inhibir l'inici de la resposta immune endògena contra el tumor degut a l'alliberació de citocines immunoreguladores com IL-10 o TGF $\beta$ . En aquest cas veiem que cap dels tres tractaments no és capaç d'augmentar significativament el temps de supervivència dels animals (Fig.32B), tot i que introduint aquesta modificació en la pauta d'administració el tractament combinat amb  $\alpha$ GalCer no augmenta l'agressivitat del tumor.



**Figura 32.** Supervivència enfront el tumor BL3750. Tractament terapèutic amb anti-CD20 i  $\alpha$ GalCer o AC11. A) Injecció per via i.v d'una dosi de  $10^5$  cèl·lules BL3750. Al cap de 24 hores administració i.p de 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11, i 24 hores després administració per via i.v de  $2\mu$ g d'anti-CD20 (5D2). B) Injecció per via i.v d'una dosi de  $5 \times 10^4$  cèl·lules BL3750. Al cap de 24 hores administració i.p de 100ng d' $\alpha$ GalCer o AC11, i després administració per via i.v de  $2\mu$ g d'anti-CD20 (5D2). Anàlisi estadístic realitzat amb test Mantel-Cox (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001).







## 5. DISCUSSIÓ

Els potents efectes moduladors de les cèl·lules iNKT sobre el sistema immune, juntament amb la seva capacitat per a poder ser manipulades específicament mitjançant l'ús de compostos de naturalesa lipídica, ha centrat l'atenció de molts grups d'investigació en els darrers vint anys que han dirigit la seva recerca cap a l'obtenció de nous reactius que permetin activar i manipular les cèl·lules iNKT amb finalitats terapèutiques.

El present treball ha consistit en descriure l'activitat biològica i possibles aplicacions terapèutiques d'uns nous compostos sintètics anàlegs de l' $\alpha$ GalCer. Aquests compostos s'han anomenat aminociclitols, ja que respecte l'estructura de l' $\alpha$ GalCer presenten una substitució del sucre del cap polar per un anell ciclitol (substitució de l'oxigen de l'anell per un carboni), i de l'enllaç O-glicosídic per un enllaç amino (substitució de l'oxigen de l'enllaç per un nitrogen). L'estudi principalment s'ha centrat en un d'aquests anàlegs, l'AC11, que en estudis previs amb animals<sup>235</sup> i en els primers anàlisis d'aquesta tesi d'entre tots els aminociclitols era el que mostrava una major capacitat per a induir una resposta de citocines de tipus Th1. En aquest treball hem intentat aplicar aquesta resposta per estudiar la seva utilitat en l'inducció d'una resposta antitumoral efectiva de possible translació clínica.

### **5.1. Anàlegs aminociclitols: activitat *in vitro***

Tot i que en cultius *in vitro* d'esplenòcits ja havíem observat quins dels anàlegs aminociclitols eren més actius, en aquest cas vam voler comprovar la resposta que provocaven únicament sobre les cèl·lules iNKT de manera més sistemàtica i exhaustiva. Utilitzant hibridomes iNKT vam veure que diversos dels anàlegs, AC11, AC16, AC19 i HS44, són capaços d'estimular les cèl·lules iNKT de ratolí (Fig.7). Tots ells tenen una potència d'activació *in vitro* inferior a la de l' $\alpha$ GalCer. L'activació dels hibridomes que s'aconsegueix utilitzant una concentració d'1ng/ml d' $\alpha$ GalCer és similar a la que s'obté amb una concentració cent vegades més gran d'AC11 i AC16, que són els anàlegs amb més capacitat d'estimulació. La potència amb que responen els hibridomes en aquest tipus d'experiments es relaciona directament amb l'afinitat del iTCR per el complex

CD1d-antígen<sup>218</sup>, essent els compostos que generen una resposta més potent també els que són reconeguts amb més afinitat per el iTCR. Un estudi publicat per el nostre grup<sup>224</sup> recolza part d'aquests resultats, demostrant-se que l'HS44 degut a la pèrdua d'un pont d'hidrogen interacciona amb el iTCR amb una afinitat unes deu vegades inferior amb la que ho fa l' $\alpha$ GalCer. Tot i això en el mateix estudi també es demostra que tot i l'escassa potència d'activació *in vitro* de l'HS44 en comparació amb l' $\alpha$ GalCer, la capacitat per a generar una resposta funcional *in vivo* és comparable, induint una alliberació d'IFN $\gamma$  similar a la de l' $\alpha$ GalCer i essent igual d'efectiu en el tractament preventiu de les metàstasis en el pulmó provocades per la inoculació i.v de la línia tumoral B16.

Els anàlegs aminociclitols també poden ser reconeguts i expandir les cèl·lules iNKT humanes (Fig.9). Utilitzant cèl·lules mononuclears de sang perifèrica hem demostrat que els compostos AC11, AC16 i AC18 són capaços d'expandir les iNKT presents en la sang, essent per tant candidats a un possible futur ús en assajos clínics. De manera sorprenent el compost AC18 que no és actiu en ratolí, en humà indueix l'expansió de les iNKT. Per el contrari, l'HS44 que prèviament havia demostrat la seva capacitat antitumoral en ratolins, gairebé no és reconegut per les iNKT humanes. Aquest fenomen posa de manifest que tot i l'estructura gairebé idèntica entre els complexos CD1d- $\alpha$ GalCer-iTCR de ratolí i d'humà<sup>49</sup>, que permeten la reactivitat creuada entre espècies <sup>45</sup>, petites diferències estructurals en alguns casos poden comportar canvis rellevants en l'activitat funcional.

També hem vist que cap dels anàlegs utilitzats, com a mínim a les concentracions amb que hem treballat, no poden expandir una petita població recentment descrita de cèl·lules T $\gamma\delta$  humanes que estan restringides per CD1d i que expressen un TCR amb el segment V $\delta$ 1<sup>239</sup>, que en canvi si que poden reconèixer i expandir-se en resposta a l' $\alpha$ GalCer (Fig.10B).

### **5.2. AC11: resposta *in vivo***

Administrant els anàlegs en ratolins hem vist que també són capaços de produir una resposta *in vivo*. Tot i la molt menor capacitat de tots els anàlegs respecte de l' $\alpha$ GalCer per estimular les cèl·lules iNKT *in vitro* (Fig.7), la resposta d'IFN $\gamma$  que produeixen l'AC11 i l'AC16 quan s'injecta 1 $\mu$ g per via i.p és igual o superior a la que produeix la mateixa dosi d' $\alpha$ GalCer (Fig.8B). Quan la dosi d'agonista és més baixa, de 100ng d'AC11 o 200ng en el cas de l'AC16, la quantitat d'IFN $\gamma$  alliberada és significativament superior que amb 100ng d' $\alpha$ GalCer, posant de manifest la major potència d'aquests anàlegs. Encara més important que la magnitud de la resposta, és el fet que a diferència de l' $\alpha$ GalCer cap dels tres anàlegs no induïx la producció d'IL-4 (Fig.8A), produint-se una resposta exclusivament de tipus Th1. Aquest fet per tant soluciona un dels grans inconvenients del tractament amb  $\alpha$ GalCer, que és la generació d'una resposta de tipus Th0. L'explicació del perquè amb aquests anàlegs la resposta és exclusivament de tipus Th1 no està totalment clara i segurament es deguda a múltiples factors, però tal i com han suggerit alguns autors es pot explicar en part per la seva estructura més hidrofòbica que la de l' $\alpha$ GalCer<sup>68,211</sup>. La substitució de l'oxigen del sucre del cap polar per un carboni, i de l'oxigen de l'enllaç O-glicosídic per un nitrogen augmenten la insolubilitat dels aminociclitolos. Aquest fet dificulta que es puguin trobar en forma lliure dissolts en el medi extracel·lular i que per tant s'uneixin directament al CD1d en la superfície. Aquesta insolubilitat hauria de facilitar la seva incorporació a les partícules d'VLDL i a altres partícules de transport de lípids, obligant a que s'hagin de processar per la via intracel·lular i que per tant es presentin en els *lipid rafts* per APC professionals<sup>68</sup>. La presentació en els *lipid rafts* concentra una gran quantitat de complexos CD1d-antígen en una superfície de membrana relativament petita, i s'ha hipotetitzat que el reconeixement d'aquesta gran concentració de complexos CD1d-antígen agrupats és un dels factors clau per a que les iNKT induïxin una resposta de tipus Th1<sup>68</sup>. Una altre explicació, que pot ser complementària a l'anterior, és la disponibilitat més prolongada dels aminociclitolos en l'organisme. De la mateixa manera que passa amb l' $\alpha$ -C-GalCer<sup>221</sup>, que és un altre anàleg que també desvia la resposta cap a tipus Th1, els anàlegs aminociclitolos no tenen enllaç O-glicosídic ni tampoc oxigen en l'anell del cap polar, fent que siguin resistents a la degradació per glucosidases. La menor degradació enzimàtica

permet que es presentin durant més temps que l' $\alpha$ GalCer, i encara que interactuen amb menys afinitat amb el iTCR la seva presentació prolongada permet una activació més potent de les cèl·lules NK, que són les responsables directes de la major part de l'IFN $\gamma$  que s'observa en la resposta<sup>87,232</sup>.

Una altre diferència en la resposta de citocines entre l' $\alpha$ GalCer i els anàlegs la trobem en la dosi-resposta de producció de la quimiocina CXCL9 (Fig.8C). CXCL9 s'indueix en resposta a l'IFN $\gamma$  i també en menor mesura a l'IFN $\alpha/\beta$  i al TNF $\alpha$ <sup>237,271,272</sup>. CXCL9 s'uneix al receptor CXCR3 expressat sobretot en cèl·lules CD4 Th1, CTLs, NK i iNKT, guiant-les cap als teixits inflamats. En la resposta als anàlegs veiem que la alliberació/producció de CXCL9 segueix clarament un patró dosi-resposta respecte de la producció d'IFN $\gamma$  (Fig.8B i 8C), a majors nivells d'IFN $\gamma$  majors són els nivells de CXCL9. Per el contrari amb l' $\alpha$ GalCer aquest fenomen no passa, i el que veiem és que amb uns nivells en sang relativament baixos d'IFN $\gamma$  s'assoleix el que sembla ser un punt màxim en la producció de CXCL9. Una explicació a aquest fenomen pot ser l'alliberació de TNF $\alpha$  que es produeix en la resposta de l' $\alpha$ GalCer<sup>224</sup> que com hem comentat també indueix l'alliberació de CXCL9<sup>237,273</sup>. L'acció combinada del TNF $\alpha$  i l'IFN $\gamma$  pot tenir un efecte sinèrgic sobre la producció de CXCL9, permetent que amb uns nivells relativament baixos d'IFN $\gamma$  s'assoleixi la màxima producció de CXCL9. En la resposta als anàlegs en canvi no s'indueix la producció de TNF $\alpha$ <sup>224</sup>, i per tant en aquest cas els nivells de CXCL9 depenen exclusivament de l'IFN $\gamma$ . La interpretació de les possibles conseqüències pràctiques d'aquest fenomen és complicada, tot i que posa de manifest que els anàlegs estudiats són agonistes amb una resposta més controlada i predictable que l' $\alpha$ GalCer.

L'administració *in vivo* d' $\alpha$ GalCer activa a les cèl·lules iNKT, i aquestes per contactes directes a través de molècules de co-estimulació o indirectes a través de citocines indueixen l'activació secundària d'una gran varietat de tipus cel·lulars, entre el quals destaquen les cèl·lules NK, T, B, DC i M $\Phi$ <sup>1</sup>. El reconeixement d'AC11 per les iNKT també té un efecte activador de la resposta immune i de totes aquestes cèl·lules. Tot i això la cinètica amb que els dos compostos ho fan és significativament diferent. L'administració i.p d' $\alpha$ GalCer produeix un augment molt ràpid de l'expressió de CD69 en les iNKT del peritoneu (2h), que poc després (5h) arriba també a les iNKT de la Melsa i la MO

(Fig.11A). Amb l'AC11 l'increment de l'expressió de CD69 en les iNKT de l'òrgan diana, el peritoneu, també és molt ràpid (2h), però en zones més distants al punt d'administració com la melsa i la MO succeeix més tard (12h) i amb una intensitat molt menor que amb l' $\alpha$ GalCer. El fet de no haver seguit l'experiment més enllà de les 12 hores ens impedeix saber si l'estat d'activació en les iNKT de la melsa i la MO ja ha assolit un pic o encara està augmentant. L'activació de les cèl·lules T i NK amb  $\alpha$ GalCer en els tres òrgans (melsa, peritoneu i MO), succeeix de manera posterior a la de les cèl·lules iNKT (Fig.11B i 11C), fenomen que s'explica perquè es tracta d'una resposta secundària que s'inicia a partir de l'activació de les iNKT. Amb l'AC11 aquesta activació és molt més lenta i tan sols a les 12 hores es detecta una activació apreciable en les NK. Malgrat la menor activació que veiem en general amb AC11 de les cèl·lules iNKT, T i NK en els tres òrgans analitzats, el fet que en les iNKT del peritoneu l'activació amb AC11 sigui igual o superior que amb  $\alpha$ GalCer fa pensar que les diferències entre els dos agonistes podrien no ser degudes a una eficiència d'activació més gran de l' $\alpha$ GalCer, sinó a una cinètica d'activació més lenta amb l'AC11. Com ja hem hipotetitzat abans el fet que l'AC11 hagi de presentar-se majoritàriament a través de la via endocítica podria explicar la resposta més lenta enfront de l' $\alpha$ GalCer, ja que aquest últim compost al poder unir-se directament al CD1d de superfície no requereix d'un temps de processament intracel·lular per a l'inici de l'estimulació de les iNKT.

A conseqüència de l'activació amb  $\alpha$ GalCer molts tipus cel·lulars alliberen citocines i quimiocines, induint-se una gran proliferació i mobilització de cèl·lules per l'organisme. L'administració sistèmica d' $\alpha$ GalCer indueix la proliferació de les cèl·lules iNKT en tot el cos, però sobretot en la melsa, el fetge, la medul·la òssia i la sang<sup>243</sup>. En la melsa i la MO l'expansió (entenent com a expansió la suma de la proliferació i la mobilització) de les iNKT assoleix el seu punt màxim entre les 48 i 72 hores després d'administrar  $\alpha$ GalCer<sup>242</sup>, i a partir d'aquest punt el seu nombre van disminuint gradualment per apoptosi fins a retornar als nivells inicials, entre 7 i 10 dies després amb una dosi de 2 $\mu$ g i 5 $\mu$ g respectivament<sup>242,274</sup>. Nosaltres veiem que amb una dosi de 100ng per via i.p el pic en l'expansió s'assoleix a les 48 hores en la melsa i la MO, i al cap de 4 dies en el peritoneu (Fig.12). Sis dies després el nombre de cèl·lules iNKT en els tres òrgans ha retornat als nivells inicials. L'AC11 també expandeix les cèl·lules iNKT en la melsa, el peritoneu i la

MO, tot i que en aquest cas el pic d'expansió s'assoleix més tard, als 4 dies, i és entre tres i deu vegades més gran que amb l' $\alpha$ GalCer. El retorn als nivells inicials també es produeix més tard, i al cap de 6 dies en els tres òrgans encara hi ha un nombre molt elevat de cèl·lules iNKT. Aquesta expansió de les iNKT més gran i sostinguda en el temps possiblement també augmenta la duració de la resposta sistèmica i per tant també l'eficiència d'activació. Contràriament al que podríem esperar les iNKT expandides amb l'AC11 expressen uns nivells inferiors de PD1 en comparació amb les que ho han estat amb  $\alpha$ GalCer (Fig.12). El PD1 és un receptor implicat en la supressió de la resposta T que s'expressa en les cèl·lules T-CD8 exhaustes <sup>275</sup>. El PD1 també s'expressa en les cèl·lules iNKT en resposta a una activació potent a través del iTCR i s'utilitza com a marcador d'anergia funcional<sup>244</sup>. Tal i com suggereixen els estudis amb els hibridomes (Fig.7) la probablement menor afinitat del iTCR per el complex CD1d-AC11 en comparació amb el complex CD1d- $\alpha$ GalCer explicaria la menor expressió de PD1, ja que aquesta s'ha relacionat amb la intensitat del reconeixement del CD1d-antigen per el TCR. Així doncs el reconeixement d'AC11 indueix una expansió de les iNKT major, més prolongada i amb menys esgotament funcional que amb l' $\alpha$ GalCer, característiques que a priori indicarien una resposta de millor utilitat terapèutica.

Com hem comentat l' $\alpha$ GalCer produeix de manera indirecte l'activació de molts tipus cel·lulars, especialment de cèl·lules del sistema immune. La presentació d' $\alpha$ GalCer per part d'una APC a la iNKT indueix en aquesta l'alliberació de citocines i l'expressió de molècules de co-estimulació que a la vegada també activen i fan madurar a l'APC. L'APC respon alliberant més citocines i augmentant la seva capacitat presentadora, produint-se un bucle de retroalimentació positiva entre aquests dos tipus cel·lulars. Una de les molècules que intervenen en aquest procés és CD86. El CD86 s'expressa en les APC activades, i juntament amb CD80 són les principals molècules de co-estimulació que permeten l'activació i supervivència dels limfòcits T. Recentment també s'ha relacionat l'expressió de CD86 en les APC amb la generació d'una resposta Th1 per part de les iNKT<sup>158</sup>. S'ha observat que els agonistes iNKT que provoquen una resposta de tipus Th1 indueixen una major expressió de CD86 en les APC que els agonistes Th2. Per el contrari no s'han documentat diferències en l'expressió de CD80 entre agonistes Th1 i Th2. Es creu que els lligands de CD1d altament insolubles i que per tant s'han de captar i

presentar sobretot a través de la via endosomal agrupats en els *lipid rafts*, provoquen una activació de les iNKT diferent a la dels compostos que es carreguen directament en la superfície i que són presentats de forma dispersa per tota la membrana<sup>68</sup>. Les iNKT activades per el reconeixement de CD1d en els *lipid rafts* activen a les APC d'una manera que promou l'expressió de CD70, CD86 i Rae-1. Les APC que expressen aquestes molècules de co-estimulació poden activar directament a les NK per a que alliberin més IFN $\gamma$ . L'expressió de CD86 que veiem en les APC en resposta a l'AC11 així com el perfil de la resposta de citocines encaixen perfectament amb aquesta hipòtesi (Fig.14 i 8A). L'AC11 que és més insoluble que l' $\alpha$ GalCer, indueix una expressió significativament més gran de CD86 en les APC i una resposta de citocines exclusivament de tipus Th1. Aquesta major expressió de CD86 hauria d'afavorir tant l'activació de les cèl·lules NK com també la de les T-CD4.

El procés de trans-activació entre l'APC i la cèl·lula iNKT allibera grans quantitats de citocines i quimiocines que activen, fan proliferar i mobilitzen altres cèl·lules del sistema immune, i aquestes a la vegada també responen alliberant més citocines i quimiocines que provoquen una resposta a nivell sistèmic. Aquesta resposta sistèmica és tradueix en importants variacions en el nombre total de cèl·lules en diversos òrgans del sistema immune. En la melsa i en el peritoneu els dos agonistes generen un increment d'entre cinc i deu vegades el nombre total de cèl·lules (Fig.13), que en els dos casos és significativament major amb l'AC11. Aquests augments en la cel·lularitat total de la melsa i el peritoneu es poden explicar en part degut a la proliferació i/o mobilització de cèl·lules T i NK (Fig.13A i B). En la melsa, malgrat l'increment en el nombre total de cèl·lules T i NK es produeix una disminució relativa d'aquestes poblacions respecte del total de cèl·lules de l'òrgan. Aquesta aparent contradicció es pot explicar per una expansió més gran d'altres poblacions cel·lulars no analitzades (com les cèl·lules B o les mieloides), o també per una sortida de cèl·lules T i NK de la melsa cap a la perifèria en major proporció que la d'altres tipus cel·lulars. Per el contrari en el peritoneu (òrgan diana) l'increment en el nombre total de cèl·lules T i NK va acompanyat també d'un increment relatiu. Degut al baix nombre d'aquestes cèl·lules que hi ha en el peritoneu dels animals no tractats, sobretot en el cas de les NK, és molt probable que una gran part d'aquestes cèl·lules no vingui de la proliferació *in situ*, sinó del reclutament des



d'altres punts de l'organisme com per exemple la melsa. L'augment de la cel·lularitat general (de fins a 10 vegades) suggereix que és el reclutament de cèl·lules limfoides i sobretot mieloides, que són les primeres cèl·lules en mobilitzar-se en la resposta immune, la causa fonamental d'aquest increment, que es pot correlacionar amb la important producció de citocines i quimiocines Th1 com CXCL9 (Fig.8B i C).

Tot i que l'augment màxim de cèl·lules T i NK en el peritoneu és similar amb els dos compostos i es produeix al mateix temps (dia 4), amb l'AC11 és més prolongat, especialment en el cas de les cèl·lules T, no havent pràcticament disminuït a dia 6, i per el contrari amb l' $\alpha$ GalCer han decaïgut gairebé fins als nivells homeostàtics. Aquest fet es relaciona directament amb el retorn dels percentatges de cèl·lules T i NK a la normalitat a dia 6 en la melsa, i que per el contrari amb l'AC11 encara es mantenen disminuïts, sobretot en el cas de les NK, suggerint que la mobilització cap a la perifèria és encara rellevant.

La via d'administració dels agonistes és determinant en la magnitud de la resposta immune induïda en els diferents òrgans, fet que es reflexa en l'increment de les poblacions limfocitàries d'estudi (Fig.17). Hem estudiat l'efecte de l'administració i.v (sistèmica) en la resposta als agonistes, comprovant que provoca una gran resposta en la melsa, que encara que segueix essent més gran amb l'AC11 és d'una magnitud similar amb els dos compostos. Així al cap de 4 dies els nivells totals de cel·lularitat i de limfòcits T i NK es troben fortament incrementats, havent-hi uns nivells similars o lleugerament més alts amb l'AC11. L'expansió de les iNKT és clarament més elevada amb l'AC11. Per el contrari en el peritoneu encara que la resposta amb els dos agonistes també és d'una magnitud similar, la intensitat és molt limitada havent-hi uns nivells de cel·lularitat només una mica superiors als dels animals control. Aquest es pot explicar perquè l'administració i.v distribueix els compostos per tot l'organisme fent que sobretot siguin captats i presentats per les APC dels òrgans limfoides secundaris abans que puguin arribar als teixits perifèrics. Per altra banda l'administració i.p (local) indueix una potent resposta en el peritoneu, especialment en el cas de l'AC11, amb el qual les iNKT s'expandeixen molt més que amb l' $\alpha$ GalCer. Amb els dos compostos els nivells de cèl·lules NK i T augmenten extraordinàriament en comparació al reduït nombre

d'aquestes poblacions que hi ha en estat basal. Com ja hem comentat aquesta enorme expansió limfocitària és difícilment justificable només per la proliferació de les NK del peritoneu, i segurament el reclutament cel·lular procedent dels òrgans limfoides secundaris hi jugui un paper important. L'expansió de les poblacions limfocitàries estudiades en la melsa després de l'administració i.p arriba a nivells similars a la generada per la via i.v, probablement a causa del transport per les APC dels lligands de CD1d cap als òrgans limfàtics secundaris, tot i que tampoc es pot descartar un transport a través de lipoproteïnes de la sang i la limfa. En aquest cas en la melsa també s'observa una expansió de les iNKT major amb l'AC11, que en el cas de l'administració i.v no era tan evident.

### **5.3. AC11: resposta antitumoral**

La potent resposta immune que provoca l' $\alpha$ GalCer ha demostrat la seva eficàcia terapèutica contra múltiples tipus de models tumorals<sup>166,276-278</sup>. Enfront el model B16 de metàstasis pulmonar és capaç d'induir una potent resposta NK que limita l'establiment de les metàstasis. Un dels nostres anàlegs, l'HS44 en estudis previs s'ha mostrat igual d'eficaç que l' $\alpha$ GalCer en la prevenció de les metàstasis en el pulmó provocades per aquest model tumoral<sup>224</sup>. En el present treball per tal d'avaluar l'activitat antitumoral de l'AC11 hem escollit un model diferent. En aquest cas hem utilitzat com a model tumoral les línies RMA i RMA-S degut al fet que quan són injectades en el peritoneu dels ratolins creixen de forma lliure en el líquid peritoneal, i aquesta característica ens permet o bé deixar-les créixer fins a l'eutanàsia del ratolí (supervivència), o bé recuperar el fluid peritoneal amb les cèl·lules tumorals i comptar-les amb precisió, podent així avaluar la resposta citotòxica *in vivo* contra el tumor. Un altre motiu per el qual hem escollit aquest model és per el fet de disposar de dos línies equivalents, una amb expressió d'MHC de classe I (RMA) i una sense (RMA-S) que és fàcilment eliminada per les NK, proporcionant-nos la possibilitat de comparar la resposta innata amb l'adaptativa. De la mateixa manera que passa amb el model tumoral B16, l'administració d' $\alpha$ GalCer també és efectiva contra les RMA i les RMA-S. L'administració preventiva de 100ng d' $\alpha$ GalCer i.p retarda el creixement tant de les

cèl·lules RMA (Fig.16A) com de les RMA-S en el peritoneu, allargant el temps de supervivència dels animals. La mateixa dosi d'AC11 és significativament més efectiva que l' $\alpha$ GalCer a l'hora d'incrementar el temps de supervivència dels animals inoculats amb RMA. Quan els agonistes són administrats després del tumor (tractament terapèutic), únicament l'AC11 és capaç de generar un increment significatiu del temps de supervivència enfront les RMA (Fig.16B). La major efectivitat de l'AC11, tant quan s'aplica de manera preventiva com terapèutica, es pot relacionar directament amb l'increment més sostingut de cèl·lules efectores limfoides (iNKT, NK i T) en els peritoneus dels animals tractats amb AC11 (Fig.12 i 13). La presència més prolongada de limfòcits activats i també d'altres tipus de cèl·lules efectores juntament amb la major producció de citocines Th1 com l'IFN $\gamma$  explicarien el millor control del creixement tumoral en els animals tractats amb AC11.

L'AC11 també mostra més activitat antitumoral contra les RMA en els experiments de citotoxicitat *in vivo*. En aquests hem administrat la mateixa dosi d'agonista que en els de supervivència, 100ng per via i.p tres dies abans de la inoculació de les cèl·lules tumorals, i per tant l'anàlisi de la resposta coincideix amb el punt on hi ha la màxima expansió de les cèl·lules iNKT, T i NK amb els dos agonistes (D+4). Tant l' $\alpha$ GalCer com l'AC11 provoquen una eliminació molt important de cèl·lules RMA, significativament superior amb l'AC11 (Fig.17B). Per el contrari l'eliminació de les RMA-S és similar amb els dos compostos al ser molt més eficient la destrucció per les cèl·lules NK essent eliminades completament. La major efectivitat antitumoral de l'AC11 contra les RMA no pot ser explicada només per una major acumulació de cèl·lules T i NK en el peritoneu tal i com hem hipotetitzat que passa en els experiments de supervivència, ja que en el punt on s'avalua la resposta (D+4) el nombre d'aquestes cèl·lules és pràcticament igual amb els dos agonistes (Fig.13). Un anàlisi més extens de totes les poblacions de cèl·lules efectores que hi han en el peritoneu dels animals inoculats amb tumor i que són sensibles a intervenir de manera directe en l'activitat citotòxica, revela que existeixen diferències rellevants en la resposta cel·lular dels dos agonistes (Fig.19). Tal i com ja havíem comprovat amb animals sense tumor en aquest cas l'increment en el nombre de cèl·lules iNKT també és molt major amb l'AC11 (Fig.19A). També trobem grans diferències en el nombre de neutròfils (Fig.19D), havent n'hi també molts més amb

l'AC11. Per el contrari el nombre de cèl·lules NK, MØ, T-CD8 i T totals és igual amb els dos compostos (Fig.19B, C, E i F). Per tant independentment de quins d'aquests tipus cel·lulars actuïn directament en l'eliminació de les RMA, el nombre més alt de cèl·lules efectores totals que hi ha en els peritoneus dels animals tractats amb AC11 és un factor que ja pot explicar la major activitat antitumoral d'aquest anàleg.

La via d'administració dels agonistes també modifica l'eficàcia de la resposta citotòxica (Fig.17B i C), tal i com era d'esperar a l'haver demostrat ja l'efecte sobre el nombre total de cèl·lules iNKT, T i NK que s'acumulen en el peritoneu en funció de la via d'administració (Fig.15). En aquest cas la resposta citotòxica també és més potent quan els compostos s'administren per via i.p que no quan es fa per via i.v. Tot i la menor efectivitat de la resposta a través de la via i.v les diferències entre l'αGalCer i l'AC11 no es veuen modificades (Fig.17C), essent l'AC11 més efectiu. La menor activació de la resposta immune quan els agonistes s'administren per via i.v fa que les RMA-S no s'eliminin completament, i això ens permet comprovar que l'AC11 també és més efectiu que l'αGalCer en l'inducció de la destrucció de les RMA-S sensibles a les NK.

Per altre part l'AC11 no només és més eficient induint una resposta antitumoral, sinó que també és més potent. Així quan utilitzem dosis més baixes d'agonista (10ng) les diferències d'activitat antitumoral entre l'αGalCer i l'AC11 esdevenen màximes (Fig.18), de manera que 10ng d'AC11 indueixen la mateixa eliminació del tumor que una dosi deu vegades més gran d'αGalCer. Aquest fet es correlaciona directament amb la major potència de l'AC11 per a induir l'alliberació sistèmica d'IFNγ. Tal i com han hipotetitzat alguns autors la presència prolongada del compost en l'organisme pot ser un factor més determinant de la potència de la resposta que no pas l'afinitat per el iTCR<sup>157,279</sup>. L'AC11 al ser més resistent a la degradació endògena és presentat durant més temps, generant una activació major i més sostinguda del sistema immune que altres compostos que es degraden més ràpidament com l'αGalCer. Utilitzant dosis d'agonista més elevades les diferències no serien tan evidents, ja que la major disponibilitat d'αGalCer saturaria tant la presentació com la degradació enzimàtica, aproximant la resposta a la de l'AC11 <sup>280</sup>.

La gran acumulació observada de diversos tipus de cèl·lules efectores (iNKT, NK, MØ, PMN, T-CD8 i T) en el peritoneu produïda en la resposta citotòxica enfront les RMA i les

RMA-S en els animals tractats amb agonista, ens va portar a preguntar-nos quin era el paper de cada una d'aquestes poblacions en la resposta antitumoral i quina influència tenien en les diferències observades entre els dos compostos. L'eliminació selectiva d'aquestes poblacions amb anticossos monoclonals o altres reactius posa en evidència importants diferències funcionals entre la resposta antitumoral de l' $\alpha$ GalCer i de l'AC11. Com era d'esperar l'eliminació selectiva de les cèl·lules T-CD8 no afecta a la resposta citotòxica (Fig.23), ja que el poc temps transcorregut des de la inoculació de les cèl·lules tumorals fins l'anàlisi (24 hores) impedeix la generació d'una resposta adaptativa. Tampoc sembla que els T-CD8 innats com els  $\gamma\delta$  juguin un paper rellevant en l'eliminació dels tumors. L'eliminació dels neutròfils tampoc afecta a la resposta antitumoral ni de l' $\alpha$ GalCer ni de l'AC11 (Fig.22), descartant així que les diferències en l'activitat citotòxica dels dos agonistes siguin degudes al gran augment d'aquestes cèl·lules que produeix l'AC11.

Per el contrari la depleció de les cèl·lules NK i dels M $\phi$ -DC té importants efectes en la resposta dels dos agonistes. Per una banda l'eliminació de les cèl·lules NK inhibeix totalment la resposta citotòxica de l' $\alpha$ GalCer contra les RMA i les RMA-S (Fig.20), recuperant-se el mateix nombre de cèl·lules tumorals que en els animals control. En canvi en el cas de l'AC11 l'eliminació de les NK només suprimeix totalment la resposta enfront les RMA-S però no contra les RMA, produint en aquest últim cas únicament una reducció d'entorn el 50 per cent de l'activitat antitumoral. Amb l' $\alpha$ GalCer de manera redundante amb el que passa quan s'eliminen les NK, l'eliminació dels M $\phi$  i/o DC també suprimeix totalment l'activitat antitumoral contra les RMA (Fig.21), i la fa disminuir contra les RMA-S però no l'inhibeix completament. Contràriament i de manera inesperada, l'eliminació dels M $\phi$ -DC no té cap efecte negatiu en la resposta citotòxica de l'AC11 contra les RMA. Contra les RMA-S tampoc té un efecte significatiu. Alguns d'aquests efectes són difícils d'explicar. Per una banda la pèrdua d'activitat antitumoral quan s'eliminen les NK tant amb l' $\alpha$ GalCer com amb l'AC11 és totalment esperable degut a l'important paper d'aquestes cèl·lules en la resposta antitumoral inicial demostrat per nombrosos autors<sup>247,281</sup>, i especialment en el cas de les RMA-S que gairebé no expressen MHC de classe I essent les dianes per excel·lència de les NK. En el cas de l' $\alpha$ GalCer la pèrdua total d'activitat antitumoral quan s'eliminen les NK suggereix que aquestes

constitueixen les principals o úniques cèl·lules efectores responsables de l'eliminació del tumor. Per altra banda el fet que també s'inhibeixi totalment l'activitat antitumoral contra les RMA quan s'eliminen els MØ-DC indica que s'estableix una col·laboració indispensable entre aquestes cèl·lules i les NK per a poder portar a terme la resposta antitumoral.

Per el contrari en la resposta a l'AC11 les cèl·lules NK no semblen ser les úniques cèl·lules efectores, ja que tot i la seva eliminació es conserva gran part de l'activitat antitumoral. En aquest cas la col·laboració entre MØ i/o DC amb les NK que veiem en la resposta a l'αGalCer no existeix, tal i com queda clarament demostrat per el nul efecte que el tractament amb clodronat té en la resposta contra les RMA (Fig.21). L'existència d'un eix d'activació MØ-NK depenent d'IFNγ ja ha estat demostrat anteriorment<sup>282,283</sup>. Les nostres dades indiquen que l'activació eficient de les NK per l'αGalCer en la resposta antitumoral contra les RMA requereix la cooperació amb cèl·lules mieloides. Per el contrari l'eficient activació de les NK per l'AC11 no requereix aquesta cooperació, i podria donar-se directament per les iNKT. El nombre molt més gran de cèl·lules iNKT (Fig.19A) juntament amb la major activació de les cèl·lules presentadores (Fig.14) recolzen fortament aquesta explicació.

El fet que l'eliminació de les NK no suprimeixi completament la resposta induïda per AC11 contra les RMA, i que tampoc ho faci cap altre de les eliminacions selectives (MØ, PMN i T-CD8), planteja la possibilitat que un altre tipus cel·lular també intervingui en la resposta. Aquest tipus cel·lular podrien ser les iNKT, degut a que s'ha documentat la seva capacitat per exercir activitat citotòxica contra cèl·lules tumorals similars a les RMA de manera depenent de CD1d<sup>183,256</sup>, amb AC11 l'expansió d'aquestes cèl·lules en el peritoneu és molt més gran que amb l'αGalCer (Fig.12 i 19A). Per tal de comprovar aquesta hipòtesi la primera aproximació que vam seguir va consistir en bloquejar amb anticossos el CD1d de les RMA. Abans d'inocular les RMA les vam incubar amb anti-CD1d, i després al mateix moment d'injectar-les als ratolins també els hi vam administrar anti-CD1d soluble per tal de mantenir el bloqueig durant tot el temps que les RMA estiguessin en el peritoneu. Amb aquest mètode tot i que no vam aconseguir veure cap efecte rellevant d'inhibició de la resposta antitumoral (Fig.24), no vam descartar del tot

el possible efecte citotòxic de les iNKT sobre les RMA, ja que podria ser que el bloqueig no fos absolut i que una petita porció de CD1d no bloquejat present en la superfície de la cèl·lula fos suficient per permetre el reconeixement. Tant mateix, els anticossos podrien induir ADCC que compenses l'absència de citotoxicitat per les iNKT. Per tal d'excloure aquestes possibilitats vam eliminar el gen del CD1d de les RMA utilitzant la tècnica del CRISPR-CAS9 (Fig.25A). Amb aquesta nova línia RMA deficient en CD1d no s'observen diferències amb les cèl·lules RMA en la resposta antitumoral, tant en els experiments de citotoxicitat *in vivo* (Fig.25B) com en els de supervivència (Fig.26). Per tant podem descartar així qualsevol efecte citotòxic rellevant que es pogués donar a través del reconeixement directe del CD1d de les cèl·lules tumorals per part del TCR de les iNKT. Aquest fet planteja una pregunta que de moment encara no hem pogut respondre, la de quines cèl·lules o mecanismes són els responsables de l'activitat antitumoral contra les RMA en els animals tractats amb AC11 i deplecionats de cèl·lules NK.

En aquest punt i a falta de més experiments sorgeixen diverses hipòtesis per a explicar la persistència d'activitat antitumoral:

- 1) Que existeixi un altre tipus cel·lular o mecanisme (com per exemple el complement) implicat en l'activitat antitumoral.
- 2) Que en la resposta citotòxica de l'AC11 realment hi participi alguna de les altres cèl·lules deplecionades (MØ, T-CD8, PMN, iNKT), però que l'activitat antitumoral de les NK sigui tan alta que l'eliminació d'alguna d'aquests poblacions quedi compensada per les NK.
- 3) Que en l'activitat antitumoral hi participin simultàniament diverses poblacions efectores però en un grau petit, i que per tant el seu efecte no pugui ser detectat per l'eliminació individual de cada tipus cel·lular.
- 4) Que les iNKT estiguin exercint activitat citotòxica de manera independent de CD1d, a través de receptors NK o per la producció d'IFN $\gamma$ .

Tot i que finalment no hem pogut acabar de descriure per complet els mecanismes cel·lulars implicats en la resposta citotòxica de l'AC11 contra les RMA, hem vist que aquest agonista és un activador més potent i més eficaç de la resposta antitumoral innata que l' $\alpha$ GalCer. També hem demostrat que les diferències de potència entre els

dos compostos no són degudes només a una major activació de les mateixes cèl·lules efectores, sinó també a l'implicació de diferents tipus cel·lulars en les dos respostes. Així doncs en la resposta a l' $\alpha$ GalCer es produeix una col·laboració NK/M $\phi$ -DC totalment indispensable per a que es pugui portar a terme l'activitat antitumoral de manera eficient, que no es produeix amb l'AC11 que seria capaç de llicenciar directament a les NK per arribar al màxim de la seva funcionalitat, i de la qual no teníem constància que hagués estat descrita anteriorment en el peritoneu.

### **5.4. AC11: Vacunació antitumoral**

La resposta antitumoral consta de 2 components, la resposta innata i l'adaptativa. Fins ara hem vist que l'administració d'AC11 és capaç d'induir una major i més eficient resposta antitumoral degut a una activació més potent de la resposta innata. Evidentment una possible aplicació terapèutica eficaç d'aquest agonista requeriria també la inducció d'una resposta específica. En el present treball també hem estudiat i demostrat la capacitat de l'AC11 per generar una resposta específica, es a dir, la seva capacitat com a adjuvant. En ratolins que han estat inoculats per via subcutània amb la línia tumoral EG-7(OVA+), una única dosi d'una vacuna terapèutica composta per AC11 i OVA administrada per via i.p és capaç de generar un augment en el nombre de cèl·lules T-CD8 específiques d'OVA (Fig.28A), aconseguint fer retrocedir el creixement inicial del tumor (Fig.28B) i produint un lleuger augment encara que no significatiu de la supervivència (Fig.27). Els efectes en la resposta però, són similars als que s'obtenen amb l' $\alpha$ GalCer, i no superiors com es podria esperar d'un compost que únicament indueix l'alliberació de citocines Th1. En vacunes experimentals contra diversos tipus de patògens s'ha demostrat que la capacitat de l' $\alpha$ GalCer per actuar com a adjuvant està estretament relacionada amb la producció d'IFN $\gamma$ <sup>193</sup>, i que els anàlegs que indueixen uns majors nivells d'IFN $\gamma$  també generen respostes específiques més potents<sup>219,220</sup>.

En el cas de les vacunes antitumorals, possiblement per la gran complexitat del microambient tumoral, aquesta relació no està tan clara. Per exemple s'ha vist que un compost com l' $\alpha$ GalCer, que indueix una resposta de tipus Th0, i l'OCH que indueix una



resposta de tipus Th2, activen una resposta específica contra el model tumoral EG-7<sup>199</sup>. Tot i això s'accepta de manera general que la producció d'IFN $\gamma$  és beneficiosa per a la generació de cèl·lules T-CD8 específiques de tumor i d'un efecte terapèutic. El poc efecte que la nostra pauta de vacunació amb els dos agonistes té en la supervivència era esperable sobretot en el cas de l' $\alpha$ GalCer, degut a la documentada<sup>204</sup> limitada capacitat quan s'administra en forma lliure per a induir la generació de cèl·lules T-CD8 específiques d'antigen. L'objectiu d'utilitzar una pauta de vacunació restrictiva, que ja coneixíem que no era molt efectiva<sup>257</sup>, era per saber si aquest nou anàleg podia superar algunes de les limitacions de l' $\alpha$ GalCer tal i com suggerien els resultats previs.

De fet, la vacunació per induir una resposta específica eficient normalment requereix d'administracions repetitives, especialment en els tractaments antitumorals. En aquest sentit hipotetitzem que el menor nivell d'esgotament funcional induït per l'AC11 en les iNKT (Fig.13C) seria més eficient que l' $\alpha$ GalCer en tractaments de varies administracions. Altres estratègies d'administració com l'ús de cèl·lules dendrítiques carregades amb antigen i  $\alpha$ GalCer<sup>167</sup>, o exosomes amb antigen i  $\alpha$ GalCer<sup>204</sup>, indueixen menys anergia i una major generació de cèl·lules T-CD8, permetent administracions repetides de la vacuna i augmentant-ne l'efecte terapèutic. Ens queda per saber si l'administració d'AC11 a través d'aquests mètodes alternatius és capaç o no de millorar els efectes de l' $\alpha$ GalCer.

També hem intentat utilitzar l'AC11 per induir una resposta de vacunació protectora contra la línia RMA inoculada en el peritoneu. En aquest cas en la composició de la vacuna no hem utilitzat un antigen conegut, sinó que hem proporcionat els antígens a través de l'administració de cèl·lules RMA necròtiques. Aquesta vacuna no s'ha mostrat efectiva en la generació d'una resposta antitumoral específica d'efecte terapèutic amb cap dels dos agonistes (Fig.29). Tant el retard en el creixement del tumor com l'augment en el temps de supervivència que veiem en els animals tractats amb agonista, es produeixen de manera independent a la presència de les cèl·lules necròtiques, per l'efecte d'activació inespecífica del sistema immune que provoquen els agonistes. La nul·la efectivitat d'aquesta estratègia de vacunació per a generar una resposta protectora segurament s'explica per la poca capacitat que en alguns estudis mostren les

cèl·lules necròtiques per a induir la generació de limfòcits T-CD8 específics de tumor<sup>270,284</sup>, i que en alguns casos fins i tot poden arribar a inhibir l'activitat de les cèl·lules T-CD8<sup>285</sup>.

### **5.5. AC11: teràpia combinada amb anti-CD20**

Els anticossos monoclonals han revolucionat en els últims anys el tractament de molts tipus de càncer. Un d'aquests anticossos, el rituximab, específic del marcador de cèl·lules B CD20, ha demostrat un gran benefici terapèutic en el tractament dels limfomes no-hodgkin<sup>286</sup> i en l'eliminació de cèl·lules B no cancerígenes en pacients amb malalties autoimmunes<sup>287</sup>. Tot i els bons resultats del tractament contra molts tipus de limfomes B, un 10 per cent dels pacients no responen al tractament i més del 50 per cent no generen una resposta de llarga durada<sup>288</sup>. A més tot i que el rituximab és molt efectiu en l'eliminació de les cèl·lules B circulants, l'efecte sobre les cèl·lules B localitzades en els teixits és molt més limitat<sup>289</sup>. Amb l'objectiu d'intentar millorar l'efectivitat del tractament hem provat d'utilitzar l'activació del sistema immune que indueixen els agonistes iNKT per augmentar els efectes deplecionants d'un anticòs anti-CD20 de ratolí anàleg al rituximab, tant sobre les cèl·lules B normals com tumorals.

Primerament vam validar la prova de concepte, l'activació del sistema immune amb els agonistes iNKT incrementa l'efecte deplecionant de l'anticòs anti-CD20 (5D2) sobre les cèl·lules B endògenes. En la sang una única dosi de 5µg d'anti-CD20 aconsegueix eliminar gairebé la totalitat de les cèl·lules B circulants al cap de 24 hores (Fig.30A). Amb una dosi de 2µg l'eliminació és parcial, i si la dosi és de 0,5µg els nivells de cèl·lules B circulants gairebé no es modifiquen. L'activació del sistema immune amb αGalCer o AC11 i la posterior administració de 2µg d'anti-CD20 incrementa l'efectivitat de l'anticòs en l'eliminació de les cèl·lules B circulants, reduint considerablement el percentatge d'aquestes cèl·lules en la sang al cap de 24 hores d'haver administrat el tractament. A les 72 hores la reducció en el percentatge de cèl·lules B circulants encara es manté (Fig.30B). Aquesta disminució és produïda per l'efecte deplecionant de l'anticòs, i no per un efecte de mobilització de cèl·lules B des de la sang cap als teixits, ja que

l'administració només d' $\alpha$ GalCer o AC11 no modifica els percentatges de cèl·lules B en la sang, tal i com passa a les 24 hores (Fig.30A). L'augment en l'eliminació de les cèl·lules B amb el tractament combinat segurament és degut a una major activació de les cèl·lules de Kupffer del fetge. En condicions basals l'efecte deplecionant de l'anticòs és gairebé totalment dependent de les cèl·lules de Kupffer i dels seus receptors Fc<sup>251,267</sup>. La potent resposta d'IFN $\gamma$  que generen l' $\alpha$ GalCer i l'AC11, així com l'interacció directe de les iNKT amb les cèl·lules de Kupffer a través de CD1d<sup>113</sup> haurien d'activar aquestes cèl·lules, incrementant la seva expressió de receptors d'Fc i per tant també l'efectivitat amb que eliminen a les cèl·lules B.

En la melsa l'administració només d' $\alpha$ GalCer o AC11 produeix un augment en el nombre total de cèl·lules B (Fig.30C), un efecte contrari al de l'anticòs. L'administració d' $\alpha$ GalCer o AC11 juntament amb 2 $\mu$ g de l'anti-CD20 fa disminuir el nombre total de cèl·lules B en la melsa, compensant així l'augment de cèl·lules B generat per l'activació del sistema immune amb els agonistes, i produint una disminució neta del total de cèl·lules B respecte dels animals no tractats, major en el cas de l'AC11. Tot i que el nombre de cèl·lules B totals no és inferior al dels animals només tractats amb anti-CD20, la comparació amb els tractaments només amb agonista posa en evidència que es produeix una gran eliminació de cèl·lules B. Així doncs, els agonistes iNKT sinergitzen amb l'anti-CD20 en la depleció dels limfòcits B, encara que el resultat final també estigui influenciat per el complex sistema d'efectes activadors sobre el sistema immune.

Tot i que l'eliminació de les cèl·lules B en condicions d'homeòstasi es produeix en el fetge<sup>267,268</sup>, podria ser que en el nostre cas on hi ha una activació potent i generalitzada del sistema immune també es produís depleció en altres localitzacions i a través d'altres tipus cel·lulars. Per exemple s'ha documentat que les cèl·lules NK també poden exercir un efecte deplecionant *in vitro* sobre les cèl·lules B unides amb anti-CD20<sup>265</sup>. De manera que l'activació del sistema immune amb  $\alpha$ GalCer o AC11 podria activar cèl·lules de la melsa que expressen receptors d'Fc i que en condicions normals no participen en la depleció, com les NK i els M $\emptyset$ , fent que també actuïn contra les cèl·lules B unides a l'anti-CD20.

Aquesta complexa interacció es reproduïx quan apliquem el tractament combinat a un model de limfoma B de ratolí. El model utilitzat és el BL3750 que prové del ratolí E $\mu$ -myc, inoculat en ratolins C57BL/6. El tractament amb AC11 al cap de 24 hores d'inocular el tumor seguit d'una dosi d'anti-CD20 el dia següent no produeix cap benefici terapèutic respecte de l'administració únicament d'anti-CD20 (Fig.31A). Sorprenentment si el tractament el realitzem amb  $\alpha$ GalCer no només tampoc es produeix cap benefici terapèutic, sinó que disminueix significativament l'eficàcia del tractament, augmentant l'agressivitat del limfoma de manera que es desenvolupa fins i tot abans que en el grup d'animals control sense tractar. Aquest augment en l'agressivitat del tumor pot ser degut a les citocines de tipus Th2 i reguladores que s'alliberen amb l'administració d' $\alpha$ GalCer com IL-4, IL-10, IL-13 i TGF $\beta$  que poden inhibir l'inici de la resposta immune contra el tumor i possiblement també promouen la proliferació. En particular la IL-10 s'ha demostrat que inhibeix de manera directa l'efecte de la teràpia amb anticossos anti-CD20 enfront aquest model de limfoma<sup>289</sup>.

Quan modifiquem la pauta d'administració, realitzant una única administració conjunta de l'agonista i anticòs al cap de 5 dies d'haver inoculat el tumor tampoc s'obté cap benefici terapèutic respecte del tractament només amb anti-CD20 (Fig.31B). La hipòtesi per aplicar aquesta modificació era que administrant el tractament més tard el tumor disposaria de més temps per establir-se, ja que potser la dosi tan baixa d'anti-CD20 injectada, de només 5 $\mu$ g, en les etapes inicials del creixement del tumor on la proporció de cèl·lules B tumorals és molt baixa, fa que la major part de l'anticòs s'uneixi als limfòcits normals, deixant un espai que pot ser ocupat per el tumor. En el cas de l' $\alpha$ GalCer la nova pauta d'administració no augmenta l'agressivitat del tumor. Aquest canvi radical pot ser degut a que al cap de 5 dies d'haver inoculat el tumor ja s'hagi començat a desenvolupar la resposta antitumoral específica, en canvi quan l'administració es realitza només 24 hores després no hi ha hagut prou temps per a que s'iniciï la resposta específica, i les citocines immunoreguladores induïdes per l' $\alpha$ GalCer (TGF $\beta$ , IL-10) inhibeixen el seu desenvolupament, fent que la progressió de la malaltia sigui més ràpida. Tot i aquesta millora no s'aconsegueix un augment significatiu de la supervivència dels animals amb cap dels dos tractaments combinats respecte del tractament només amb anticòs.

Tot i l'absència d'efectivitat terapèutica que l'administració combinada d'AC11 i anti-CD20 té en aquests experiments, no podem descartar totalment la possible aplicació d'un tractament basat en aquesta combinació. El fet que la dosi d'anti-CD20 que hem utilitzat sigui cinquanta vegades inferior a la que s'utilitza en altres treballs podria emascarar alguns efectes. Així mateix canvis en la pauta d'administració podrien tenir efectes dràstics com el que hem observat amb l' $\alpha$ GalCer, augmentant la sinèrgia dels agonistes amb l'anti-CD20. S'ha hipotetitzat que un mecanisme que explica l'acció antitumoral del rituximab (anti-CD20) a llarg termini és la inducció d'una resposta adaptativa de manera similar a com ho fa una vacuna<sup>290</sup>. En aquest cas l'AC11 podria actuar d'adjuvant potenciant aquest efecte, tot i que per a poder-ho estudiar s'haurien d'utilitzar dosis més elevades d'anti-CD20 que permetessin un increment més gran del temps de supervivència dels animals. De totes maneres independentment del nul benefici terapèutic d'aquests tractaments, els resultats posen en evidència la superioritat i seguretat d'una resposta antitumoral de tipus Th1 com la que indueix l'AC11 enfront d'una de tipus Th0 com la que indueix l' $\alpha$ GalCer.

## 6. CONCLUSIONS

Les conclusions principals que podem extreure d'aquest treball són les següents:

- 1) Els anàlegs de l' $\alpha$ GalCer AC11, AC16 i AC19 poden presentar-se a través del CD1d de ratolí i ser reconeguts i estimular a les cèl·lules iNKT de ratolí.
- 2) Aquests anàlegs juntament amb l'AC18 són reconeguts i estimulen la proliferació de les cèl·lules iNKT humanes.
- 3) Aquests agonistes de les iNKT quan s'administren en ratolins generen una potent resposta sistèmica de citocines i quimiocines de perfil exclusivament Th1.
- 4) L'agonista AC11 induïx l'activació i expansió *in vivo* de les cèl·lules iNKT, NK i T amb una cinètica de resposta més lenta que amb l' $\alpha$ GalCer, però de forma més potent, eficient i prolongada.
- 5) El tractament amb AC11 limita el creixement *in vivo* del tumor RMA i augmenta la supervivència dels animals d'una manera més eficaç que l' $\alpha$ GalCer.
- 6) La resposta immune innata citotòxica induïda *in vivo* per l'AC11 contra les cèl·lules RMA és més eficaç i més potent que la de l' $\alpha$ GalCer.
- 7) Les respostes citotòxiques antitumorals de l' $\alpha$ GalCer i l'AC11 són quantitativa i qualitativament diferents, havent-hi una implicació diferent dels macròfags en les dos respostes.
- 8) L'AC11 actua com a adjuvant en la generació d'una resposta immune específica contra l'antigen OVA com a model d'antigen tumoral.
- 9) L'activació del sistema immune amb els agonistes iNKT incrementa els efectes deplecionants d'un anticòs anti-CD20 sobre els limfòcits B, suggerint la possibilitat de trobar una estratègia d'aplicació que sinergitzi en l'eliminació dels limfomes B.
- 10) L'AC11 és un agonista que supera en eficàcia, potència i seguretat la resposta antitumoral del lligand prototip de les iNKT, l' $\alpha$ GalCer, i podria ser una alternativa immunoterapèutica capaç de superar les actuals limitacions de l'aplicació clínica de l'activació de les iNKT.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Brennan, P. J., Brigl, M. & Brenner, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 101–117 (2013).
2. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. & Van Kaer, L. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 231–237 (2004).
3. Budd, R. C. *et al.* Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J. Exp. Med.* **166**, 577–582 (1987).
4. Fowlkes, B. J. *et al.* A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* **329**, 251–254 (1987).
5. Ceredig, R., Lynch, F. & Newman, P. Phenotypic properties, interleukin 2 production, and developmental origin of a 'mature' subpopulation of Lyt-2- L3T4- mouse thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8578–8582 (1987).
6. Arase, H., Arase, N., Nakagawa, K., Good, R. A. & Onoé, K. NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J. Immunol.* **23**, 307–310 (1993).
7. Yoshimoto, T. & Paul, W. E. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* **179**, 1285–1295 (1994).
8. Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M. & Lanzavecchia, A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J. Exp. Med.* **180**, 1171–1176 (1994).
9. Porcelli, S., Yockey, C. E., Brenner, M. B. & Balk, S. P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* **178**, 1–16 (1993).



10. Ohteki, T. & MacDonald, H. R. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> subsets of natural killer 1.1<sup>+</sup> T cell receptor-alpha/beta<sup>+</sup> cells in the liver of mice. *J. Exp. Med.* **180**, 699–704 (1994).
11. Bendelac, A. *et al.* CD1 recognition by mouse NK1<sup>+</sup> T lymphocytes. *Science* **268**, 863–865 (1995).
12. Martin, L. H., Calabi, F., Lefebvre, F. A., Bilsland, C. A. & Milstein, C. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 9189–9193 (1987).
13. Calabi, F. & Milstein, C. A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* **323**, 540–543 (1986).
14. Porcelli, S., Morita, C. T. & Brenner, M. B. CD1b restricts the response of human CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* **360**, 593–597 (1992).
15. Castaño, A. R. *et al.* Peptide binding and presentation by mouse CD1. *Science* **269**, 223–226 (1995).
16. Sieling, P. A. *et al.* CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* **269**, 227–230 (1995).
17. Beckman, E. M. *et al.* Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta<sup>+</sup> T cells. *Nature* **372**, 691–694 (1994).
18. Zeng, Z. *et al.* Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* **277**, 339–345 (1997).
19. Kawano, T. *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626–1629 (1997).
20. Cui, J. *et al.* Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **278**, 1623–1626 (1997).

21. Hammond, K. J. *et al.* CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J. Immunol.* **1950** **167**, 1164–1173 (2001).
22. Cardell, S. *et al.* CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J. Exp. Med.* **182**, 993–1004 (1995).
23. Hammond, K. J. *et al.* NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3768–3781 (1999).
24. Matsuda, J. L. *et al.* Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* **192**, 741–754 (2000).
25. Rossjohn, J., Pellicci, D. G., Patel, O., Gapin, L. & Godfrey, D. I. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 845–857 (2012).
26. Farr, A. R., Wu, W., Choi, B., Cavalcoli, J. D. & Laouar, Y. CD1d-unrestricted NKT cells are endowed with a hybrid function far superior than that of iNKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12841–12846 (2014).
27. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. T-cell receptor gene rearrangement. (2001).
28. Burdin, N. *et al.* Structural requirements for antigen presentation by mouse CD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10156–10161 (2000).
29. Burdin, N. *et al.* Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J. Immunol.* **1950** **161**, 3271–3281 (1998).
30. Rhost, S., Sedimbi, S., Kadri, N. & Cardell, S. L. Immunomodulatory type II natural killer T lymphocytes in health and disease. *Scand. J. Immunol.* **76**, 246–255 (2012).
31. Jahng, A. *et al.* Prevention of Autoimmunity by Targeting a Distinct, Noninvariant CD1d-reactive T Cell Population Reactive to Sulfatide. *J. Exp. Med.* **199**, 947–957 (2004).

32. Tatituri, R. V. V. *et al.* Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with diverse TCRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1827–1832 (2013).
33. Marrero, I., Ware, R. & Kumar, V. Type II NKT Cells in Inflammation, Autoimmunity, Microbial Immunity, and Cancer. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
34. Dhodapkar, M. V. & Kumar, V. Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *J. Immunol.* **198**, 1015–1021 (2017).
35. Longley, J., Kraus, J., Alonso, M. & Edelson, R. Molecular cloning of CD1a (T6), a human epidermal dendritic cell marker related to class I MHC molecules. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 628–631 (1989).
36. Hughes, A. L. Evolutionary origin and diversification of the mammalian CD1 antigen genes. *Mol. Biol. Evol.* **8**, 185–201 (1991).
37. Balk, S. P., Bleicher, P. A. & Terhorst, C. Isolation and expression of cDNA encoding the murine homologues of CD1. *J. Immunol.* **150**, 768–774 (1991).
38. Brigl, M. & Brenner, M. B. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 817–890 (2004).
39. Salio, M., Silk, J. D. & Cerundolo, V. Recent advances in processing and presentation of CD1 bound lipid antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 81–88 (2010).
40. de la Salle, H. *et al.* Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e. *Science* **310**, 1321–1324 (2005).
41. Bradbury, A., Belt, K. T., Neri, T. M., Milstein, C. & Calabi, F. Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. *EMBO J.* **7**, 3081–3086 (1988).
42. Chen, Y. H. *et al.* Expression of CD1d2 on thymocytes is not sufficient for the development of NK T cells in CD1d1-deficient mice. *J. Immunol.* **162**, 4560–4566 (1999).

43. Moseley, W. S., Watson, M. L., Kingsmore, S. F. & Seldin, M. F. CD1 defines conserved linkage group border between human chromosomes 1 and mouse chromosomes 1 and 3. *Immunogenetics* **30**, 378–382 (1989).
44. Loringh van Beeck, F. A. *et al.* Functional CD1d and/or NKT cell invariant chain transcript in horse, pig, African elephant and guinea pig, but not in ruminants. *Mol. Immunol.* **46**, 1424–1431 (2009).
45. Brossay, L. *et al.* CD1d-mediated Recognition of an  $\alpha$ -Galactosylceramide by Natural Killer T Cells Is Highly Conserved through Mammalian Evolution. *J. Exp. Med.* **188**, 1521–1528 (1998).
46. Adams, E. J. & Luoma, A. M. The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 529–561 (2013).
47. Porcelli, S. A. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv. Immunol.* **59**, 1–98 (1995).
48. Koch, M. *et al.* The crystal structure of human CD1d with and without  $\alpha$ -galactosylceramide. *Nat. Immunol.* **6**, 819–826 (2005).
49. Pellicci, D. G. *et al.* Differential recognition of CD1d- $\alpha$ -galactosyl ceramide by the V $\beta$ 8.2 and V $\beta$ 7 semi-invariant NKT T-cell receptors. *Immunity* **31**, 47–59 (2009).
50. Canchis, P. W. *et al.* Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* **80**, 561–565 (1993).
51. Mandal, M. *et al.* Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules. *Mol. Immunol.* **35**, 525–536 (1998).
52. Olszak, T. *et al.* Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* **509**, 497–502 (2014).

53. Im, J. S. *et al.* Expression of CD1d molecules by human schwann cells and potential interactions with immunoregulatory invariant NK T cells. *J. Immunol.* 1950 **177**, 5226–5235 (2006).
54. Agrati, C. *et al.* CD1d expression by hepatocytes is a main restriction element for intrahepatic T-cell recognition. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **19**, 41–48 (2005).
55. Balk, S. P. *et al.* Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science* **265**, 259–262 (1994).
56. van de Wal, Y. *et al.* Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**, 1420–1431 (2003).
57. Chun, T. *et al.* CD1d-expressing Dendritic Cells but Not Thymic Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells. *J. Exp. Med.* **197**, 907–918 (2003).
58. Sonoda, K.-H. & Stein-Streilein, J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur. J. Immunol.* **32**, 848–857 (2002).
59. Yang, O. O. *et al.* CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V alpha 24J alpha Q T cells: a feedback mechanism for immune regulation. *J. Immunol.* 1950 **165**, 3756–3762 (2000).
60. Allan, L. L. *et al.* Apolipoprotein-mediated lipid antigen presentation in B cells provides a pathway for innate help by NKT cells. *Blood* **114**, 2411–2416 (2009).
61. van den Elzen, P. *et al.* Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* **437**, 906–910 (2005).
62. Hunger, R. E. *et al.* Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J. Clin. Invest.* **113**, 701–708 (2004).

63. Prigozy, T. I. *et al.* The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* **6**, 187–197 (1997).
64. Barral, D. C. & Brenner, M. B. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 929–941 (2007).
65. Leadbetter, E. A. *et al.* NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8339–8344 (2008).
66. Barral, P. *et al.* B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8345–8350 (2008).
67. Yu, K. O. A. *et al.* Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3383–3388 (2005).
68. Im, J. S. *et al.* Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity* **30**, 888–898 (2009).
69. Girardi, E. & Zajonc, D. M. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunol. Rev.* **250**, 167–179 (2012).
70. Hüttinger, R., Staffler, G., Majdic, O. & Stockinger, H. Analysis of the early biogenesis of CD1b: involvement of the chaperones calnexin and calreticulin, the proteasome and  $\beta$ 2-microglobulin. *Int. Immunol.* **11**, 1615–1623 (1999).
71. Kang, S.-J. & Cresswell, P. Calnexin, calreticulin, and ERp57 cooperate in disulfide bond formation in human CD1d heavy chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44838–44844 (2002).
72. Cernadas, M. *et al.* Lysosomal localization of murine CD1d mediated by AP-3 is necessary for NK T cell development. *J. Immunol.* **171**, 4149–4155 (2003).

73. Elewaut, D. *et al.* The adaptor protein AP-3 is required for CD1d-mediated antigen presentation of glycosphingolipids and development of Valpha14i NKT cells. *J. Exp. Med.* **198**, 1133–1146 (2003).
74. Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447 (2003).
75. Sugita, M. *et al.* Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity* **16**, 697–706 (2002).
76. De Libero, G. & Mori, L. Novel insights into lipid antigen presentation. *Trends Immunol.* **33**, 103–111 (2012).
77. Roberts, T. J. *et al.* Recycling CD1d1 molecules present endogenous antigens processed in an endocytic compartment to NKT cells. *J. Immunol.* **168**, 5409–5414 (2002).
78. Ernst, W. A. *et al.* Molecular interaction of CD1b with lipoglycan antigens. *Immunity* **8**, 331–340 (1998).
79. Prigozy, T. I. *et al.* Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science* **291**, 664–667 (2001).
80. Zhou, D. *et al.* Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* **306**, 1786–1789 (2004).
81. Lang, G. A., Maltsev, S. D., Besra, G. S. & Lang, M. L. Presentation of  $\alpha$ -galactosylceramide by murine CD1d to natural killer T cells is facilitated by plasma membrane glycolipid rafts. *Immunology* **112**, 386–396 (2004).
82. Park, Y.-K., Lee, J.-W., Ko, Y.-G., Hong, S. & Park, S.-H. Lipid rafts are required for efficient signal transduction by CD1d. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 1143–1154 (2005).
83. Borg, N. A. *et al.* CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* **448**, 44–49 (2007).

84. Adams, E. J. & López-Sagaseta, J. The Immutable Recognition of CD1d. *Immunity* **34**, 281–283 (2011).
85. Godfrey, D. I. *et al.* Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin. Immunol.* **22**, 61–67 (2010).
86. Joyce, S., Girardi, E. & Zajonc, D. M. NKT Cell Ligand Recognition Logic: Molecular Basis for a Synaptic Duet and Transmission of Inflammatory Effectors. *J. Immunol.* **195**, 1081–1089 (2011).
87. Patel, O. *et al.* NKT TCR recognition of CD1d- $\alpha$ -galactosylceramide. *J. Immunol.* **195**, 4705–4713 (2011).
88. Wun, K. S. *et al.* A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR. *J. Exp. Med.* **205**, 939–949 (2008).
89. Raju, R. *et al.* Synthesis and evaluation of 3'- and 4'-deoxy and -fluoro analogs of the immunostimulatory glycolipid, KRN7000. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 4122–4125 (2009).
90. Godfrey, D. I., Stankovic, S. & Baxter, A. G. Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* **11**, 197–206 (2010).
91. Dao, T. *et al.* Development of CD1d-restricted NKT cells in the mouse thymus. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3542–3552 (2004).
92. Egawa, T. *et al.* Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* **22**, 705–716 (2005).
93. Gapin, L., Matsuda, J. L., Surh, C. D. & Kronenberg, M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat. Immunol.* **2**, 971–978 (2001).
94. Facciotti, F. *et al.* Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat. Immunol.* **13**, 474–480 (2012).



95. Moran, A. E. *et al.* T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **208**, 1279–1289 (2011).
96. Seiler, M. P. *et al.* Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat. Immunol.* **13**, 264–271 (2012).
97. Griewank, K. *et al.* Homotypic interactions mediated by Ly108 and SLAM control NKT lineage development. *Immunity* **27**, 751–762 (2007).
98. Griewank, K. *et al.* Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* **27**, 751–762 (2007).
99. Kageyama, R. *et al.* The receptor Ly108 functions as a SAP adaptor-dependent on-off switch for T cell help to B cells and NKT cell development. *Immunity* **36**, 986–1002 (2012).
100. Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. & Bendelac, A. A Thymic Precursor to the NK T Cell Lineage. *Science* **296**, 553–555 (2002).
101. Pellicci, D. G. *et al.* A Natural Killer T (NKT) Cell Developmental Pathway Involving a Thymus-dependent NK1.1–CD4<sup>+</sup> CD1d-dependent Precursor Stage. *J. Exp. Med.* **195**, 835–844 (2002).
102. Pellicci, D. G. *et al.* Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1816–1823 (2003).
103. McNab, F. W. *et al.* The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J. Immunol.* **175**, 3762–3768 (2005).
104. Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213013/>. (Accessed: 22nd August 2017)

105. Matsuda, J. L. *et al.* Homeostasis of V $\alpha$ 14i NKT cells. *Nat. Immunol.* **3**, 966–974 (2002).
106. Berzins, S. P., McNab, F. W., Jones, C. M., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J. Immunol.* **176**, 4059–4065 (2006).
107. Salio, M., Silk, J. D., Jones, E. Y. & Cerundolo, V. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 323–366 (2014).
108. Esteban, L. M. *et al.* Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J. Immunol.* **171**, 2873–2878 (2003).
109. Lee, P. T. *et al.* Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **110**, 793–800 (2002).
110. Barral, P., Sánchez-Niño, M. D., van Rooijen, N., Cerundolo, V. & Batista, F. D. The location of splenic NKT cells favours their rapid activation by blood-borne antigen. *EMBO J.* **31**, 2378–2390 (2012).
111. PLZF induces an intravascular surveillance program mediated by long-lived LFA-1-ICAM-1 interactions. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624939>. (Accessed: 22nd August 2017)
112. Thomas, S. Y. *et al.* PLZF induces an intravascular surveillance program mediated by long-lived LFA-1-ICAM-1 interactions. *J. Exp. Med.* **208**, 1179–1188 (2011).
113. Lee, W.-Y. *et al.* An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat. Immunol.* **11**, 295–302 (2010).
114. Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T. & Brenner, M. B. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* **195**, 625–636 (2002).
115. Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L. & Bendelac, A. Distinct functional lineages of human V $\alpha$ 24 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* **195**, 637–641 (2002).

116. O'Reilly, V. *et al.* Distinct and Overlapping Effector Functions of Expanded Human CD4+, CD8 $\alpha$ + and CD4-CD8 $\alpha$ - Invariant Natural Killer T Cells. *PLOS ONE* **6**, e28648 (2011).
117. Buechel, H. M., Stradner, M. H. & D'Cruz, L. M. Stages versus subsets: Invariant Natural Killer T cell lineage differentiation. *Cytokine* **72**, 204–209 (2015).
118. Watarai, H. *et al.* Development and Function of Invariant Natural Killer T Cells Producing TH2- and TH17-Cytokines. *PLOS Biol.* **10**, e1001255 (2012).
119. Engel, I. *et al.* Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat. Immunol.* **17**, 728–739 (2016).
120. Lee, Y. J. *et al.* Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity* **43**, 566–578 (2015).
121. Coquet, J. M. *et al.* Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11287–11292 (2008).
122. Terashima, A. *et al.* A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.* **205**, 2727–2733 (2008).
123. Michel, M.-L. *et al.* Identification of an IL-17–producing NK1.1neg iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* **204**, 995–1001 (2007).
124. Michel, M.-L. *et al.* Critical role of ROR- $\gamma$ t in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19845–19850 (2008).
125. Doisne, J.-M. *et al.* Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor ( $\gamma$ )t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *J. Immunol.* **1950** **183**, 2142–2149 (2009).

126. Pichavant, M. *et al.* Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J. Exp. Med.* **205**, 385–393 (2008).
127. Doisne, J.-M. *et al.* Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *J. Immunol.* **1950** **186**, 662–666 (2011).
128. Kinjo, Y. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat. Immunol.* **12**, 966–974 (2011).
129. Kinjo, Y. *et al.* Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* **434**, 520–525 (2005).
130. Mattner, J. *et al.* Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* **434**, 525–529 (2005).
131. Sriram, V., Du, W., Gervay-Hague, J. & Brutkiewicz, R. R. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1692–1701 (2005).
132. Kinjo, Y. *et al.* Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat. Immunol.* **7**, 978–986 (2006).
133. Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E. & Brenner, M. B. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat. Immunol.* **4**, 1230–1237 (2003).
134. Nagarajan, N. A. & Kronenberg, M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **1950** **178**, 2706–2713 (2007).
135. Paget, C. *et al.* Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* **27**, 597–609 (2007).

136. Salio, M. *et al.* Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20490–20495 (2007).
137. Cox, D. *et al.* Determination of cellular lipids bound to human CD1d molecules. *PLoS One* **4**, e5325 (2009).
138. Haig, N. A. *et al.* Identification of self-lipids presented by CD1c and CD1d proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 37692–37701 (2011).
139. Muindi, K. *et al.* Activation state and intracellular trafficking contribute to the repertoire of endogenous glycosphingolipids presented by CD1d [corrected]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3052–3057 (2010).
140. Porubsky, S. *et al.* Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5977–5982 (2007).
141. Gadola, S. D. *et al.* Impaired selection of invariant natural killer T cells in diverse mouse models of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *J. Exp. Med.* **203**, 2293–2303 (2006).
142. Brennan, P. J. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize lipid self-antigen induced by microbial danger signals. *Nat. Immunol.* **12**, 1202–1211 (2011).
143. Pei, B. *et al.* Diverse endogenous antigens for mouse NKT cells: self-antigens that are not glycosphingolipids. *J. Immunol.* **186**, 1348–1360 (2011).
144. Kain, L. *et al.* The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian  $\alpha$ -linked glycosylceramides. *Immunity* **41**, 543–554 (2014).
145. Nagarajan, N. A. & Kronenberg, M. Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **178**, 2706–2713 (2007).

146. Kitamura, H. *et al.* The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1121–1128 (1999).
147. Leite-De-Moraes, M. C. *et al.* A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J. Immunol.* **163**, 5871–5876 (1999).
148. Rachitskaya, A. V. *et al.* Cutting Edge: NKT Cells Constitutively Express IL-23 Receptor and ROR $\gamma$ t and Rapidly Produce IL-17 upon Receptor Ligation in an IL-6-Independent Fashion. *J. Immunol.* **180**, 5167–5171 (2008).
149. Stock, P., Lombardi, V., Kohlrutz, V. & Akbari, O. Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB. *J. Immunol.* **182**, 5116–5122 (2009).
150. Wesley, J. D., Tessmer, M. S., Chaukos, D. & Brossay, L. NK Cell-Like Behavior of V $\alpha$ 14i NK T Cells during MCMV Infection. *PLoS Pathog.* **4**, (2008).
151. Brigl, M. *et al.* Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *J. Exp. Med.* **208**, 1163–1177 (2011).
152. Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J. Exp. Med.* **183**, 2391–2396 (1996).
153. Germain, C. *et al.* Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon- $\gamma$  contributes to modulate immune responses. *J. Biol. Chem.* **286**, 37964–37975 (2011).
154. Champsaur, M. & Lanier, L. L. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol. Rev.* **235**, 267–285 (2010).

155. Bellone, M. *et al.* iNKT Cells Control Mouse Spontaneous Carcinoma Independently of Tumor-Specific Cytotoxic T Cells. *PLoS ONE* **5**, (2010).
156. Godfrey, D. I. & Kronenberg, M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* **114**, 1379–1388 (2004).
157. Sullivan, B. A. *et al.* Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by V $\alpha$ 14i NKT cells. *J. Immunol.* **1950** **184**, 141–153 (2010).
158. Arora, P. *et al.* A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens. *Immunity* **40**, 105–116 (2014).
159. Bai, L. *et al.* Distinct APCs explain the cytokine bias of  $\alpha$ -galactosylceramide variants in vivo. *J. Immunol.* **1950** **188**, 3053–3061 (2012).
160. Wang, H., Lee, Y. J. & Hogquist, K. Localization of iNKT subsets determines lipid response (APP2P.101). *J. Immunol.* **194**, 45.2-45.2 (2015).
161. Fujii, S.-I., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J. & Steinman, R. M. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med.* **199**, 1607–1618 (2004).
162. Schmieg, J., Yang, G., Franck, R. W. & Tsuji, M. Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand  $\alpha$ -Galactosylceramide. *J. Exp. Med.* **198**, 1631–1641 (2003).
163. Dellabona, P., Abrignani, S. & Casorati, G. iNKT-cell help to B cells: a cooperative job between innate and adaptive immune responses. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2230–2237 (2014).
164. Chang, P.-P. *et al.* Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat. Immunol.* **13**, 35–43 (2012).
165. King, I. L. *et al.* Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat. Immunol.* **13**, 44–50 (2012).

166. Kawano, T. *et al.* Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V $\alpha$ 14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5690–5693 (1998).
167. Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M. & Steinman, R. M. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat. Immunol.* **3**, 867–874 (2002).
168. Smyth, M. J. *et al.* Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J. Exp. Med.* **191**, 661–668 (2000).
169. Swann, J. B. *et al.* Type I natural killer T cells suppress tumors caused by p53 loss in mice. *Blood* **113**, 6382–6385 (2009).
170. Crowe, N. Y., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Exp. Med.* **196**, 119–127 (2002).
171. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 239–252 (2012).
172. Song, L. *et al.* V $\alpha$ 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J. Clin. Invest.* **119**, 1524–1536 (2009).
173. Tahir, S. M. *et al.* Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J. Immunol.* **167**, 4046–4050 (2001).
174. Yanagisawa, K. *et al.* Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J. Immunol.* **168**, 6494–6499 (2002).
175. Schneiders, F. L. *et al.* Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 567–570 (2012).



176. Increased Intratumor Valpha24-Positive Natural Killer T Cells: A Prognostic Factor for Primary Colorectal Carcinomas. *PubMed Journals* Available at: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/16243803/>. (Accessed: 2nd October 2017)
177. Swann, J. B., Coquet, J. M. C., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **314**, 293–323 (2007).
178. Smyth, M. J. *et al.* Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* **99**, 1259–1266 (2002).
179. Altman, J. B., Benavides, A. D., Das, R. & Bassiri, H. Antitumor Responses of Invariant Natural Killer T Cells. *Journal of Immunology Research* (2015). doi:10.1155/2015/652875
180. Metelitsa, L. S., Weinberg, K. I., Emanuel, P. D. & Seeger, R. C. Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia* **17**, 1068–1077 (2003).
181. Renukaradhya, G. J. *et al.* Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* **111**, 5637–5645 (2008).
182. Wingender, G., Krebs, P., Beutler, B. & Kronenberg, M. Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency. *J. Immunol.* **185**, 2721–2729 (2010).
183. Bassiri, H. *et al.* iNKT cell cytotoxic responses control T-lymphoma growth in vitro and in vivo. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 59–69 (2014).
184. Kuylenstierna, C. *et al.* NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1913–1923 (2011).

185. Smyth, M. J. *et al.* NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 165–171 (2002).
186. Singh, A. K. *et al.* Natural Killer T Cell Activation Protects Mice Against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **194**, 1801–1811 (2001).
187. Hong, S. *et al.* The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* **7**, 1052–1056 (2001).
188. Wang, B., Geng, Y.-B. & Wang, C.-R. Cd1-Restricted Nk T Cells Protect Nonobese Diabetic Mice from Developing Diabetes. *J. Exp. Med.* **194**, 313–320 (2001).
189. Johnson, T. R., Hong, S., Van Kaer, L., Koezuka, Y. & Graham, B. S. NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **76**, 4294–4303 (2002).
190. Sada-Ovalle, I., Sköld, M., Tian, T., Besra, G. S. & Behar, S. M.  $\alpha$ -Galactosylceramide as a Therapeutic Agent for Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 841–847 (2010).
191. Emoto, M. *et al.* Alpha-galactosylceramide promotes killing of *Listeria monocytogenes* within the macrophage phagosome through invariant NKT-cell activation.,  $\alpha$ -Galactosylceramide Promotes Killing of *Listeria monocytogenes* within the Macrophage Phagosome through Invariant NKT-Cell Activation. *Infect. Immun. Infect. Immun.* **78**, **78**, 2667, 2667–2676 (2010).
192. Hansen, D. S., Siomos, M.-A., Buckingham, L., Scalzo, A. A. & Schofield, L. Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* **18**, 391–402 (2003).
193. Gonzalez-Aseguinolaza, G. *et al.* Natural Killer T Cell Ligand  $\alpha$ -Galactosylceramide Enhances Protective Immunity Induced by Malaria Vaccines. *J. Exp. Med.* **195**, 617–624 (2002).

194. Huang, Y. *et al.* Enhancement of HIV DNA vaccine immunogenicity by the NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Vaccine* **26**, 1807–1816 (2008).
195. Ko, S.-Y. *et al.* alpha-Galactosylceramide can act as a nasal vaccine adjuvant inducing protective immune responses against viral infection and tumor. *J. Immunol.* **175**, 3309–3317 (2005).
196. Youn, H.-J. *et al.* A single intranasal immunization with inactivated influenza virus and alpha-galactosylceramide induces long-term protective immunity without redirecting antigen to the central nervous system. *Vaccine* **25**, 5189–5198 (2007).
197. Hermans, I. F. *et al.* NKT Cells Enhance CD4+ and CD8+ T Cell Responses to Soluble Antigen In Vivo through Direct Interaction with Dendritic Cells. *J. Immunol.* **171**, 5140–5147 (2003).
198. Fujii, S.-I., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L. & Steinman, R. M. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J. Exp. Med.* **198**, 267–279 (2003).
199. Silk, J. D. *et al.* Utilizing the adjuvant properties of CD1d-dependent NK T cells in T cell-mediated immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **114**, 1800–1811 (2004).
200. Nagaraj, S. *et al.* Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo. *Int. Immunol.* **18**, 1279–1283 (2006).
201. Petersen, T. R. *et al.* Potent anti-tumor responses to immunization with dendritic cells loaded with tumor tissue and an NKT cell ligand. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 596–604 (2010).
202. Shimizu, K., Goto, A., Fukui, M., Taniguchi, M. & Fujii, S. Tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide induce innate NKT and NK cell-dependent resistance to tumor implantation in mice. *J. Immunol.* **178**, 2853–2861 (2007).

203. Hong, S. *et al.* Tumor cells loaded with  $\alpha$ -galactosylceramide promote therapeutic NKT-dependent anti-tumor immunity in multiple myeloma. *Immunol. Lett.* **156**, 132–139 (2013).
204. Gehrman, U. *et al.* Synergistic induction of adaptive antitumor immunity by codelivery of antigen with  $\alpha$ -galactosylceramide on exosomes. *Cancer Res.* **73**, 3865–3876 (2013).
205. Giaccone, G. *et al.* A phase I study of the natural killer T-cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 3702–3709 (2002).
206. Nieda, M. *et al.* Therapeutic activation of V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* **103**, 383–389 (2004).
207. Nair, S. & Dhodapkar, M. V. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **8**, 1178 (2017).
208. Sag, D., Krause, P., Hedrick, C. C., Kronenberg, M. & Wingender, G. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *J. Clin. Invest.* **124**, 3725–3740 (2014).
209. Yamasaki, K. *et al.* Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin. Immunol.* **138**, 255–265 (2011).
210. Kunii, N. *et al.* Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* **100**, 1092–1098 (2009).
211. Carreño, L. J., Saavedra-Ávila, N. A. & Porcelli, S. A. Synthetic glycolipid activators of natural killer T cells as immunotherapeutic agents. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, e69 (2016).
212. Parekh, V. V. *et al.* Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J. Clin. Invest.* **115**, 2572–2583 (2005).

213. Parekh, V. V. *et al.* PD-1:PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated iNKT cells. *J. Immunol.* **1950** **182**, 2816–2826 (2009).
214. Uldrich, A. P. *et al.* A semi-invariant V $\alpha$ 10+ T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties. *Nat. Immunol.* **12**, 616–623 (2011).
215. Miyamoto, K., Miyake, S. & Yamamura, T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* **413**, 531–534 (2001).
216. McCarthy, C. *et al.* The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J. Exp. Med.* **204**, 1131–1144 (2007).
217. Forestier, C. *et al.* Improved outcomes in NOD mice treated with a novel Th2 cytokine-biasing NKT cell activator. *J. Immunol.* **1950** **178**, 1415–1425 (2007).
218. Wu, T.-N. *et al.* Avidity of CD1d-ligand-receptor ternary complex contributes to T-helper 1 (Th1) polarization and anticancer efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17275–17280 (2011).
219. Padte, N. N. *et al.* A glycolipid adjuvant, 7DW8-5, enhances CD8+ T cell responses induced by an adenovirus-vectored malaria vaccine in non-human primates. *PLoS One* **8**, e78407 (2013).
220. Li, X. *et al.* Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13010–13015 (2010).
221. Fujii, S.-I. *et al.* Glycolipid  $\alpha$ -C-galactosylceramide is a distinct inducer of dendritic cell function during innate and adaptive immune responses of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11252–11257 (2006).

222. Pellicci, D. G. *et al.* Recognition of  $\beta$ -linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors. *Nat. Immunol.* **12**, 827–833 (2011).
223. Silk, J. D. *et al.* Cutting edge: nonglycosidic CD1d lipid ligands activate human and murine invariant NKT cells. *J. Immunol.* **180**, 6452–6456 (2008).
224. Kerzerho, J. *et al.* Structural and functional characterization of a novel nonglycosidic type I NKT agonist with immunomodulatory properties. *J. Immunol. Md* **188**, 2254–2265 (2012).
225. Tashiro, T. *et al.* Induction of Th1-biased cytokine production by alpha-carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for NKT cells. *Int. Immunol.* **22**, 319–328 (2010).
226. Hung, J.-T., Huang, J.-R. & Yu, A. L. Tailored design of NKT-stimulatory glycolipids for polarization of immune responses. *J. Biomed. Sci.* **24**, 22 (2017).
227. Wun, K. S. *et al.* A molecular basis for the exquisite CD1d-restricted antigen specificity and functional responses of natural killer T cells. *Immunity* **34**, 327–339 (2011).
228. Wun, K. S. *et al.* Human and Mouse Type I Natural Killer T Cell Antigen Receptors Exhibit Different Fine Specificities for CD1d-Antigen Complex. *J. Biol. Chem.* **287**, 39139–39148 (2012).
229. Raju, R. *et al.* Synthesis and evaluation of 3''- and 4''-deoxy and -fluoro analogs of the immunostimulatory glycolipid, KRN7000. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 4122–4125 (2009).
230. Zhou, X.-T. *et al.* Synthesis and NKT Cell Stimulating Properties of Fluorophore- and Biotin-Appended 6' '-Amino-6' '-deoxy-galactosylceramides. *Org. Lett.* **4**, 1267–1270 (2002).
231. Ebensen, T. *et al.* A pegylated derivative of alpha-galactosylceramide exhibits improved biological properties. *J. Immunol.* **179**, 2065–2073 (2007).
232. Aspeslagh, S. *et al.* Galactose-modified iNKT cell agonists stabilized by an induced fit of CD1d prevent tumour metastasis. *EMBO J.* **30**, 2294–2305 (2011).

233. Aspeslagh, S. *et al.* Enhanced TCR footprint by a novel glycolipid increases NKT-dependent tumor protection. *J. Immunol.* 1950 **191**, 2916–2925 (2013).
234. Harrak, Y. *et al.* Aminocyclitol-substituted phytoceramides and their effects on iNKT cell stimulation. *ChemMedChem* **4**, 1608–1613 (2009).
235. Harrak, Y., Barra, C. M., Delgado, A., Castaño, A. R. & Llebaria, A. Galacto-configured aminocyclitol phytoceramides are potent in vivo invariant natural killer T cell stimulators. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 12079–12084 (2011).
236. Xia, C. *et al.* Roles of 3' and 4' Hydroxyls in  $\alpha$ -Galactosylceramide Stimulation of Invariant Natural Killer T Cells. *ChemMedChem* **4**, 1810–1815 (2009).
237. Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 207–215 (2011).
238. Watarai, H., Nakagawa, R., Omori-Miyake, M., Dashtsoodol, N. & Taniguchi, M. Methods for detection, isolation and culture of mouse and human invariant NKT cells. *Nat. Protoc.* **3**, 70–78 (2008).
239. Uldrich, A. P. *et al.* CD1d-lipid antigen recognition by the  $\gamma\delta$  TCR. *Nat. Immunol.* **14**, 1137–1145 (2013).
240. Ziegler, S. F., Ramsdell, F. & Alderson, M. R. The activation antigen CD69. *Stem Cells* **12**, 456–465 (1994).
241. Bedel, R. *et al.* Effective functional maturation of invariant natural killer T cells is constrained by negative selection and T-cell antigen receptor affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E119–E128 (2014).
242. Wilson, M. T. *et al.* The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10913–10918 (2003).

243. Parekh, V. V., Lalani, S. & Van Kaer, L. The in vivo response of invariant natural killer T cells to glycolipid antigens. *Int. Rev. Immunol.* **26**, 31–48 (2007).
244. Iyoda, T. *et al.* Invariant NKT cell anergy is induced by a strong TCR-mediated signal plus co-stimulation. *Int. Immunol.* **22**, 905–913 (2010).
245. McLellan, A. D., Starling, G. C., Williams, L. A., Hock, B. D. & Hart, D. N. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2064–2068 (1995).
246. Ljunggren, H. G., Ohlén, C., Höglund, P., Franksson, L. & Kärre, K. The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection. *Int. J. Cancer Suppl. J. Int. Cancer Suppl.* **6**, 38–44 (1991).
247. Glas, R. *et al.* Recruitment and Activation of Natural Killer (Nk) Cells in Vivo Determined by the Target Cell Phenotype. *J. Exp. Med.* **191**, 129–138 (2000).
248. Wang, M., Ellison, C. A., Gartner, J. G. & HayGlass, K. T. Natural killer cell depletion fails to influence initial CD4 T cell commitment in vivo in exogenous antigen-stimulated cytokine and antibody responses. *J. Immunol.* **160**, 1098–1105 (1998).
249. Moynihan, K. D. *et al.* Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nat. Med.* **22**, 1402–1410 (2016).
250. Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S. & Albina, J. E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 64–70 (2008).
251. Minard-Colin, V. *et al.* Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood* **112**, 1205–1213 (2008).



252. Bruhn, K. W., Dekitani, K., Nielsen, T. B., Pantapalangkoor, P. & Spellberg, B. Ly6G-mediated depletion of neutrophils is dependent on macrophages. *Results Immunol.* **6**, 5–7 (2015).
253. Carr, K. D. *et al.* Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2666–2676 (2011).
254. Barbarin, A. *et al.* Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
255. Guo, H., Baker, S. F., Martínez-Sobrido, L. & Topham, D. J. Induction of CD8 T Cell Heterologous Protection by a Single Dose of Single-Cycle Infectious Influenza Virus. *J. Virol.* **88**, 12006–12016 (2014).
256. Hix, L. M. *et al.* CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis. *PLoS One* **6**, e20702 (2011).
257. Silk, J. D. *et al.* Utilizing the adjuvant properties of CD1d-dependent NK T cells in T cell-mediated immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **114**, 1800–1811 (2004).
258. Macho-Fernandez, E. *et al.* Targeted Delivery of  $\alpha$ -Galactosylceramide to CD8 $\alpha$ + Dendritic Cells Optimizes Type I NKT Cell-Based Antitumor Responses. *J. Immunol.* 1303029 (2014). doi:10.4049/jimmunol.1303029
259. Sauter, B. *et al.* Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 423–434 (2000).
260. Iyoda, T. *et al.* The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 1289–1302 (2002).

261. Gamrekelashvili, J. *et al.* Peptidases released by necrotic cells control CD8+ T cell cross-priming. *J. Clin. Invest.* **123**, 4755–4768 (2013).
262. Salles, G. *et al.* Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv. Ther.* (2017). doi:10.1007/s12325-017-0612-x
263. Cartron, G., Watier, H., Golay, J. & Solal-Celigny, P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* **104**, 2635–2642 (2004).
264. Flieger, D., Renoth, S., Beier, I., Sauerbruch, T. & Schmidt-Wolf, I. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell. Immunol.* **204**, 55–63 (2000).
265. Kohrt, H. E. *et al.* CD137 stimulation enhances the antilymphoma activity of anti-CD20 antibodies. *Blood* **117**, 2423–2432 (2011).
266. Weng, W.-K. & Levy, R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3940–3947 (2003).
267. Montalvao, F. *et al.* The mechanism of anti-CD20-mediated B cell depletion revealed by intravital imaging. *J. Clin. Invest.* **123**, 5098–5103 (2013).
268. Gül, N. *et al.* Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *J. Clin. Invest.* **124**, 812–823 (2014).
269. Yeap, W. H. *et al.* CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* **6**, srep34310 (2016).
270. Mattarollo, S. R. *et al.* NKT cell adjuvant-based tumor vaccine for treatment of myc oncogene-driven mouse B-cell lymphoma. *Blood* **120**, 3019–3029 (2012).
271. Farber, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 246–257 (1997).

272. Ohmori, Y. *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am. J. Pathol.* **142**, 861–870 (1993).
273. Kraft, M. *et al.* IFN- $\gamma$  synergizes with TNF- $\alpha$  but not with viable *H. pylori* in up-regulating CXC chemokine secretion in gastric epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **126**, 474–481 (2001).
274. Crowe, N. Y. *et al.* Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J. Immunol.* **195**, 4020–4027 (2003).
275. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
276. Nur, H. *et al.* Stimulation of invariant natural killer T cells by  $\alpha$ -Galactosylceramide activates the JAK-STAT pathway in endothelial cells and reduces angiogenesis in the 5T33 multiple myeloma model. *Br. J. Haematol.* **167**, 651–663 (2014).
277. Hung, J.-T. *et al.* Abstract 2005: Synergistic effect of phenyl  $\alpha$ -galactosylceramide C34 and chemotherapy on 4T1-tumor bearing mouse model. *Cancer Res.* **77**, 2005–2005 (2017).
278. Tatsumi, T. *et al.* Intrahepatic delivery of  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. *Hepatology* **45**, 22–30 (2007).
279. Birkholz, A. M. *et al.* A Novel Glycolipid Antigen for NKT Cells That Preferentially Induces IFN- $\gamma$  Production. *J. Immunol.* **195**, 924–933 (2015).
280. Jukes, J. *et al.* Non-glycosidic compounds can stimulate both human and mouse iNKT cells. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1224–1234 (2016).
281. Hayakawa, Y. *et al.* Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J. Immunol.* **169**, 5377–5381 (2002).

282. Zhou, Z., Zhang, C., Zhang, J. & Tian, Z. Macrophages Help NK Cells to Attack Tumor Cells by Stimulatory NKG2D Ligand but Protect Themselves from NK Killing by Inhibitory Ligand Qa-1. *PLOS ONE* **7**, e36928 (2012).
283. Bellora, F. *et al.* The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21659–21664 (2010).
284. Scheffer, S. R. *et al.* Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int. J. Cancer* **103**, 205–211 (2003).
285. Gamrekelashvili, J. *et al.* Necrotic Tumor Cell Death In Vivo Impairs Tumor-Specific Immune Responses. *J. Immunol.* **178**, 1573–1580 (2007).
286. Feugier, P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. *Future Oncol.* **11**, 1327–1342 (2015).
287. Gürcan, H. M. *et al.* A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 10–25 (2009).
288. Jemal, A. *et al.* Cancer statistics, 2009. *CA. Cancer J. Clin.* **59**, 225–249 (2009).
289. Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T. & Tedder, T. F. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4268–4280 (2011).
290. Hilchey, S. P. *et al.* Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a “vaccinal effect” of rituximab. *Blood* **113**, 3809–3812 (2009).

