

Trabajo Fin de Máster

Inmunoliposomas basados en la granulicina como tratamiento del cáncer

Granulysin-based immunoliposomes as a cancer
treatment

Autor:

María de la Torre Cabezón

Director/es:

Luis Alberto Anel Bernal, Raquel Ibáñez Pérez y Ana
Pilar Tobajas de la Fuente

Titulación del autor

Máster en inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer

FACULTAD DE MEDICINA
2025

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director **Alberto Anel**, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por su confianza desde el principio y sus grandes consejos.

A mis dos directoras, **Raquel Ibáñez** y **Ana Tobajas**, por acompañarme día a día, por enseñarme tanto, por su paciencia y por hacerme sentir parte del grupo desde el primer momento. Gracias por transmitirme vuestra pasión por la investigación.

A mis padres, **Elena** y **Toño**. Por ser mis pilares fundamentales, por su apoyo incondicional, por creer en mí y por acompañarme en cada paso que doy. A **Gabriel**, por hacer que todo cueste un poquito menos cuándo está cerca. Por quererme tanto y cuidarme con paciencia. Os quiero.

A **Saray**, mi hermana y mi persona favorita. Por ser un ejemplo silencioso de lucha y resiliencia. Por todo lo que ha tenido que superar y por seguir adelante con la misma fuerza y luz de siempre. Gracias por quedarte a mi lado. Eres mi porqué. Te quiero.

A todas **mis compañeras del grupo Apoptosis, inmunidad y cáncer**, por todos los momentos compartidos, por el buen ambiente que creáis y por acompañarme con tanta cercanía en este camino.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. CÁNCER E INMUNOTERAPIA	3
1.2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN LA INMUNIDAD ANTITUMORAL: LINFOCITOS T CD8 ⁺ y NATURAL KILLER (NK).....	5
1.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS.....	6
1.3.1. VÍA INTRÍNSECA	8
1.3.2. VÍA EXTRÍNSECA	8
1.4. GRANULISINA.....	9
1.4.1. GENERALIDADES	9
1.4.2. ACCIÓN ANTITUMORAL.....	10
1.4.3. LIMITACIONES Y VENTAJAS.....	11
1.5. ANTÍGENOS TUMORALES COMO DIANAS TERAPÉUTICAS	12
1.6. NANOLIPOSOMAS EN TERAPIAS ANTITUMORALES	13
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	15
2.1. ANTECEDENTES	15
2.2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	17
3.1. CULTIVOS CELULARES	17
3.2. MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE GRNLY.....	19
3.3. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE GRNLY RECOMBINANTE	19
3.3.1. TINCIÓN CON COLORANTE AZUL DE COOMASSIE	22
3.3.2. INMUNOBLOT	22
3.3.3. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	23
3.3.4. ENSAYOS COLORIMÉTICOS BCA	24
3.4. MEDIOS PARA LA PRODUCCION DE scFv-5E5	25

3.5. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE scFv-5E5.....	25
3.6. PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS LUV	28
3.7. ENSAYOS DE UNIÓN.....	31
3.8. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	32
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. PRODUCCIÓN DE scFv-5E5 EN <i>Escherichia coli</i> Y PURIFICACIÓN	34
4.2. PRODUCCIÓN DE GRNLY CON <i>Pichia pastoris</i> Y PURIFICACIÓN	36
4.3. UNIÓN DE scFv-5E5 A LINEAS CELULARES TUMORALES	37
4.4. DOSIS-RESPUESTA DE LUVs SOBRE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL JURKAT.....	40
4.5. UNIÓN DE GRNLY Y scFv-5E5 A LOS LUV	42
4.6. UNIÓN DE LOS INMUNOLIPOSOMAS A LÍNEAS CELULARES TUMORALES.....	44
4.7. CITOTOXICIDAD DE LOS INMUNOLIPOSOMAS CONTRA LINEAS CELULARES TUMORALES.....	47
5. CONCLUSIONES.....	50
6. CONCLUSIONS	50
7. BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

El cáncer continúa siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial, lo que ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más específicas y eficaces. En este contexto, la inmunoterapia dirigida ha emergido como una herramienta prometedora. Este trabajo se centra en el diseño y evaluación de nanoliposomas funcionalizados con fragmentos scFv del anticuerpo 5E5 y con la proteína citotóxica humana granulicina (GRNLY). Este sistema constituye una nueva terapia dirigida contra células tumorales que expresan el antígeno MUC1/Tn, un marcador característico de múltiples tipos de cáncer.

Para ello, se produjeron y purificaron el anticuerpo 5E5 en su forma scFv y la granulicina recombinante. Seguidamente, se comprobó su unión específica al antígeno MUC1/Tn en líneas celulares tumorales como JURKAT, Capan-2, MCF7, HCT116 y A549. Tanto el scFv-5E5 como GRNLY se acoplaron de forma estable a los nanoliposomas a concentraciones $\leq 8 \mu\text{M}$, y se diseñaron diferentes formulaciones de LUVs funcionalizados: con cada proteína por separado o en combinación.

En los ensayos de unión, los inmunoliposomas mostraron alta afinidad por células MUC1/Tn+, y los ensayos de citotoxicidad *in vitro* evidenciaron que los liposomas funcionalizados inducen una mayor tasa de muerte celular que los tratamientos con las proteínas libres. En particular, los liposomas que combinan scFv-5E5 y GRNLY fueron los más eficaces, confirmando el valor de la conjugación para potenciar el efecto terapéutico.

En conjunto, estos resultados demuestran que los nanoliposomas funcionalizados con scFv-5E5 y granulicina constituyen una plataforma prometedora para la inmunoterapia dirigida contra el cáncer, y abren la puerta a futuros estudios preclínicos en modelos animales.

Palabras clave: Cáncer; Inmunoterapia dirigida; Granulicina; scFv-5E5; antígeno MUC1/Tn; Nanoliposomas funcionalizados; Apoptosis; Vehiculización

ABSTRACT

Cancer remains one of the leading causes of death worldwide, driving the development of new, more specific and effective therapeutic strategies. In this context, targeted immunotherapy has emerged as a promising tool. This study focuses on the design and evaluation of nanoliposomes functionalized with scFv fragments of the 5E5 antibody and the human cytotoxic protein granulysin (GRNLY). This system represents a novel targeted therapy against tumor cells expressing the MUC1/Tn antigen, a characteristic marker of various cancer types.

For this purpose, the 5E5 antibody in its scFv format and recombinant granulysin were produced and purified. Their specific binding to the MUC1/Tn antigen was confirmed in tumor cell lines such as JURKAT, Capan-2, MCF7, HCT116, and A549. Both scFv-5E5 and GRNLY were stably conjugated to nanoliposomes at concentrations $\leq 8 \mu\text{M}$, and various formulations of functionalized LUVs were developed, either with each protein individually or in combination.

In binding assays, the immunoliposomes showed high affinity for MUC1/Tn+ cells, and *in vitro* cytotoxicity assays revealed that functionalized liposomes induced a higher rate of cell death compared to treatments with free proteins. Notably, liposomes combining scFv-5E5 and GRNLY were the most effective, confirming the added value of conjugation in enhancing the therapeutic effect.

Overall, these results demonstrate that nanoliposomes functionalized with scFv-5E5 and granulysin constitute a promising platform for targeted cancer immunotherapy and pave the way for future preclinical studies in animal models.

Keywords: Cancer; Targeted immunotherapy; Granulysin; scFv-5E5; MUC1/Tn antigen; Functionalized nanoliposomes; Apoptosis; Drug delivery

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER E INMUNOTERAPIA

El cáncer es una de las enfermedades con mayor tasa de morbilidad y mortalidad tanto en adultos como en niños. Es una patología con diferentes causas, en su mayoría se trata de una acumulación de mutaciones puntuales en el material genético de una o varias células y con una regulación deficiente de la propagación celular. El crecimiento acelerado de las células malignas y su capacidad de invadir otros tejidos provocan graves daños funcionales que pueden resultar mortales. Esto se debe a algunas de las características generales de las células tumorales, conocidas como “*hallmarks*” (**Figura 1**) con su capacidad de resistir la apoptosis o muerte celular programada, de evadir el sistema inmunológico o de inducir angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) [1]. Además, tienen la capacidad de metastatizar, es decir, de propagarse a órganos distantes [2].

Nuestro sistema inmune tiene la capacidad de detectar y eliminar las células anormales gracias a la inmunovigilancia. Sin embargo, los tumores pueden evadirla perdiendo sus antígenos o secretando sustancias que inhiben la respuesta inmune.

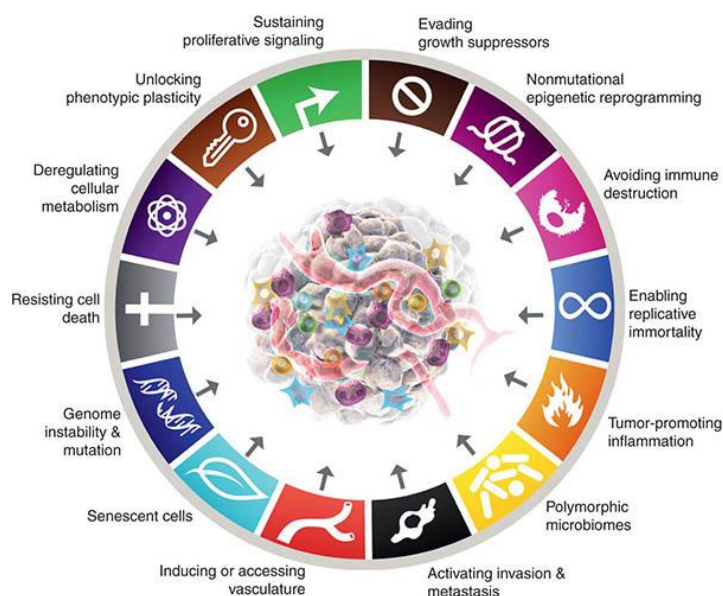


Figura 1. Hallmarks del cáncer. Procesos biológicos que caracterizan a las células tumorales. Incluye propiedades clásicas como la resistencia a la muerte celular o la capacidad de proliferación, y nuevas dimensiones como la evasión inmunitaria, la inflamación tumoral o la plasticidad fenotípica [1].

La inmunoterapia ha surgido como una estrategia prometedora que en lugar de exponer el cuerpo a sustancias químicas tóxicas o a radiación para acabar con las células cancerosas, potencia nuestras células inmunes y manda señales de alarma moleculares para que las propias defensas del organismo ejecuten esa misión desde dentro. Existen diferentes enfoques de tratamientos inmunoterápicos:

Los inhibidores de puntos de control inmunitario (immune checkpoint inhibitors) son anticuerpos monoclonales que bloquean proteínas como PD-1 o CTLA-4, las cuales normalmente limitan la actividad de las células T. Estas proteínas, cuando se unen a sus ligandos (PD-L1 o CD80/CD86, que pueden estar en las células tumorales), inhiben la respuesta inmunitaria. Al bloquear estas interacciones, los inhibidores permiten que las células T reconozcan y ataquen a las células tumorales. Evita que se unan a sus ligandos PDL-1 o CD80/CD86 presentes en las células tumorales. Algunos de ellos son anti-PD-1 (pembrolizumab o nivolumab), anti-PD-L1 (atezolizumab o durvalumab) o anti-CTLA-4 (ipilimumab) [3]. La **terapia celular adoptiva** como la terapia con células CAR-T se basa en células T propias del paciente o de donantes modificadas genéticamente con receptores antigénicos quiméricos (CAR) para reconocer y atacar células tumorales específicas [4]. También está el uso de **factores inmunomoduladores**, entre los que destacan las citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-12, IL-15 o TNF- α , que potencian la activación y proliferación de células T o NK, pero también pueden ser usadas por el tumor para favorecer un ambiente inflamatorio crónico. Su uso en la clínica requiere un equilibrio para evitar toxicidades sistémicas [5]. Más recientemente, se están investigando vacunas con antígenos tumorales para llevar a cabo terapias personalizadas [6]. Los **anticuerpos monoclonales** dirigidos contra antígenos tumorales es una de las estrategias más consolidadas. Son proteínas diseñadas para unirse de forma específica a dianas en la superficie de las células tumorales como proteínas sobreexpresadas o alteradas, lo que permite atacar al tumor sin dañar a las células sanas [7].

1.2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN LA INMUNIDAD ANTITUMORAL: LINFOCITOS T CD8⁺ y NATURAL KILLER (NK)

Los linfocitos T CD8⁺ (células T citotóxicas o CTLs) y las células NK son cruciales en la respuesta inmunitaria frente a los tumores. En los últimos años, ha habido muchos avances en la caracterización de las respuestas del sistema inmune frente a antígenos tumorales. Gracias a ello y a los resultados clínicos de tratamientos que activan a los linfocitos T, se ha visto que los CTLs son clave en la defensa inmune contra el cáncer [8]. Un ejemplo es el desarrollo de terapias basadas en inhibidores de puntos de control inmunitarios, como los inhibidores de PD-1/PD-L1 y CTLA-4 [9]. Estos tratamientos ayudan a que los linfocitos T recuperen su actividad antitumoral. En pacientes con respuestas positivas a los fármacos se ha visto una gran actividad de CTLs en los tumores, lo que confirma su papel clave en la eliminación del cáncer [10] [11] [12].

Los CTLs son esenciales porque pueden reconocer y destruir células tumorales. Lo hacen gracias a la presentación de antígenos por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) [13]. Durante su desarrollo viajan desde la médula ósea al timo, luego migran a los órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos y, cuando se activan, se desplazan a los tejidos infectados para llevar a cabo respuestas inmunitarias específicas.

Las células NK son clave en la vigilancia del sistema inmune frente al cáncer, no solo pueden destruir directamente células tumorales, sino que también interactúan con las células dendríticas, ayudando a activar la respuesta adaptativa y favoreciendo la activación de los linfocitos T [14]. Algunos tumores escapan del sistema inmune reduciendo la expresión de MHC-I en la superficie de las células tumorales para que los CTLs no los reconozcan [15]. Sin embargo, esto las hace vulnerables a las células NK, que están preparadas para detectar y destruir células que no expresan esta molécula [16].

Muchos tumores expresan en su superficie ligandos que activan a las células NK a través del receptor NKG2D [13]. Entre ellos se encuentran moléculas como MIC-A, MIC-B y las proteínas ULBP [17]. Esta unión ligando-receptor envía una señal que puede activar a las NK incluso cuando hay señales inhibitorias, como las de MHC-I. Gracias a este mecanismo, las NK pueden reconocer y destruir células tumorales que intentan evadir a los linfocitos T.

Las NK también pueden activarse mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Si una célula tumoral está recubierta por anticuerpos, las NK pueden reconocerlos a través de su receptor FcγRIII (CD16) y destruir a la célula [18]. Esta capacidad las convierte en una pieza clave en inmunoterapias que utilizan anticuerpos monoclonales para atacar tumores. Su acción antitumoral puede potenciarse con citocinas como IL-2, IL-15 e IL-12 [19]. Estas moléculas favorecen su activación, proliferación y capacidad citotóxica [20]. En modelos *in vivo*, se ha visto que los efectos antitumorales de estas citocinas en parte se deben a la estimulación de las NK, reforzando su papel esencial en la defensa inmunitaria contra el cáncer [21].

1.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un mecanismo propio de organismos multicelulares que está altamente regulado y por el cual las células se autodestruyen de forma ordenada cuando han sufrido un daño irreparable. Este proceso no solo es crucial durante el desarrollo embrionario y la renovación de tejidos, sino que también mantiene el equilibrio celular en organismos adultos, especialmente dentro del sistema inmunitario [22].

Una de las funciones esenciales de la apoptosis es la eliminación de células autorreactivas. Este proceso ocurre durante su desarrollo en el timo o en la médula ósea y es conocido como selección negativa [22]. Por otra parte, la respuesta inmunitaria de los linfocitos maduros también ha de ser regulada, constituyendo la llamada tolerancia periférica [23]. La mayoría de los linfocitos activados mueren por apoptosis en una fase llamada contracción clonal o muerte inducida por activación, evitando así una expansión descontrolada que podría causar enfermedades autoinmunes [24]. La apoptosis es también fundamental en la función efectora de los CTLs y NKs manteniendo su tolerancia inmunológica. Destruyen células infectadas por virus o transformadas en tumorales sin causar una excesiva inflamación.

A nivel molecular, la apoptosis puede activarse por dos vías diferentes. La vía extrínseca se activa por señales externas. La vía intrínseca se activa por señales internas o indirectamente por señales externas, como la falta de factores de crecimiento o la activación de receptores de muerte (**Figura 2**). Como resultado activan proteínas proapoptóticas como BIM o tBid y provocan la liberación de citocromo c desde la

mitocondria. En ambos casos, se activa una cascada de caspasas [25]. Las iniciadoras, como la 8, 9 y 10 reciben la señal de muerte y se activan al cambiar su conformación cuando se unen a complejos como el DISC (vía extrínseca) o el apoptosoma (vía intrínseca). Tras esto, cortan y activan a las efectoras como la 3, 6 y 7 que degradan a multitud de proteínas celulares esenciales. Por ejemplo, la caspasa 3 rompe el complejo CAD/ICAD, liberando la DNasa CAD que fragmenta el ADN. También desorganiza el citoesqueleto, perturba el metabolismo y facilita la exposición de señales como la fosfatidilserina, que marcan a la célula para su eliminación por fagocitosis. Se crean ampollas en la membrana de la célula y esta se separa en cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos [26].

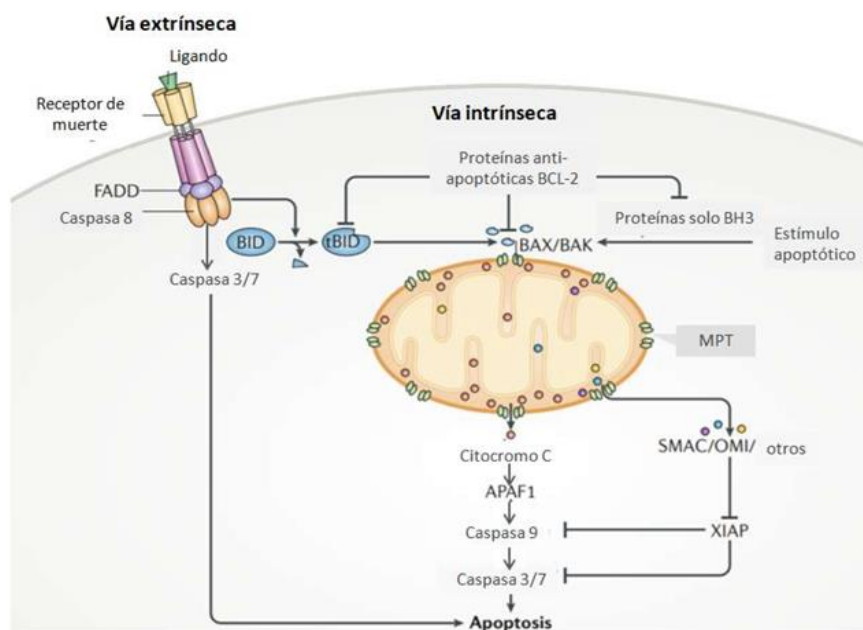


Figura 2. Vías de señalización apoptótica. La vía extrínseca se activa por receptores de muerte como Fas y DR4/DR5, y conlleva la activación de caspasas vía FADD y caspasa-8. La vía intrínseca responde a daños internos, implicando la liberación de citocromo c desde la mitocondria, formación del apoptosoma y activación de caspasa-9. Ambas vías convergen en las caspasas ejecutoras 3 y 7 [27].

1.3.1. VÍA INTRÍNSECA

La vía intrínseca o vía apoptótica mitocondrial se activa cuando la célula detecta un daño interno, como estrés oxidativo (ROS), radiación o falta de nutrientes. Este tipo de señales son reconocidas por proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 del tipo “BH3-only”, como BIM, PUMA, NOXA, tBid o BAD. Estas proteínas inhiben a las antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1, y liberan a las proapoptóticas efectoras Bax y Bak. Una vez activadas, Bax y Bak se introducen en la membrana externa de la mitocondria y forman poros para que salgan proteínas proapoptóticas, como el citocromo c [28] [29].

El citocromo c, una vez en el citoplasma, se une a Apaf-1 en el citosol y con ATP forman un complejo llamado apoptosoma, que recluta y activa a la caspasa-9. Esta, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras como la caspasa-3 que destruye la célula. Durante este proceso, otras proteínas liberadas por la mitocondria, como Smac/Diablo y OMI/HtrA2, bloquean a los inhibidores de caspasas (IAPs, especialmente XIAP) y permiten que la apoptosis siga adelante [30]. También se liberan proteínas como AIF o EndoG, que degradan el ADN de forma independiente de las caspasas. Así, la vía mitocondrial funciona como un sistema de control interno, que decide si la célula tiene que morir y se asegura de que lo haga sin causar daño al entorno [26].

1.3.2. VÍA EXTRÍNSECA

MUERTE CELULAR PROVOCADA POR LIGANDOS DE MUERTE

El sistema inmune cuenta con diferentes estrategias para eliminar células tumorales, una de las más estudiadas es la muerte celular mediada por receptores de muerte. Este mecanismo empieza con la activación de receptores transmembrana como Fas/CD95, TNFR1 o DR4/DR5 que pertenecen a la familia de receptores del TNF. Reconocen los ligandos de muerte FasL, TNF- α o Apo2L/TRAIL, respectivamente, y ponen en marcha una cascada intracelular que conduce a la activación de las caspasas y que puede llevar a la muerte celular programada [31].

La unión de los ligandos mortales a sus receptores induce la oligomerización de trímeros produciendo la exposición de los dominios de muerte (DD), a través de los cuales los receptores reclutan los adaptador FADD. FADD produce el reclutamiento de la procaspasa-8 (pro-caspasa-10) formando el complejo DISC (Death-Inducing

Signaling Complex) [32] (**Figura 2**). En el DISC, las procaspasas-8 se activan por proximidad y procesamiento en trans, iniciando así la cascada apoptótica. La caspasa-8 activa directamente a las caspasas ejecutoras o, en algunos casos, activa la vía mitocondrial mediante la escisión de Bid en su forma truncada tBid, que estimula la liberación de citocromo c [31] (**Figura 2**). La inducción de la expresión de los ligandos mortales por parte de CTL o NK o su secreción en asociación con exosomas es uno de los mecanismos efectores con los que cuentan estas células [33].

MECANISMO DE EXOCITOSIS DE GRÁNULOS CITOTÓXICOS

La liberación de proteínas líticas como perforina, granzimas y granulicina (GRNLY) desde los gránulos citotóxicos de los CTLs y de las NK constituye su principal mecanismo para inducir la muerte celular [34]. La perforina forma poros en la membrana de la célula diana, lo que permite a las granzimas entrar en el citoplasma de la célula. La granzima B activa directamente las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3, y también puede activar a tBid, lo que pone en marcha la vía apoptótica mitocondrial [33]. La granzima A actúa independiente de caspasas, causa daño en el DNA y estrés oxidativo [35]. En el contexto del cáncer la granulicina destaca debido a que actúa directamente sobre membranas con baja concentración de colesterol, como es el caso de las células tumorales [36][37]. La función fisiológica demostrada para la granulicina es su actividad antimicrobiana, sobre todo bacterias intracelulares [38].

1.4. GRANULICINA

1.4.1. GENERALIDADES

La granulicina es una proteína lítica localizada en los gránulos citotóxicos del citoplasma de CTLs y NKs humanos, desde donde se libera para producir la muerte de diversos patógenos [39]. Pertenece a la familia SAPLIP (saposine-like protein), son unas proteínas catiónicas pequeñas que activan enzimas degradadoras de lípidos [40].

Presentan un haz polipeptídico de 5 hélices con residuos de cisteína formando enlaces estables disulfuro (**Figura 3**). En humanos se encuentra codificada en el cromosoma 2 y se expresa como una proteína con dos isoformas estables. Una precursora de 15 kDa que sufre una ruptura mediada por proteasas específicas dentro de los gránulos citotóxicos y que genera una isoforma de 9 kDa [41]. Esta isoforma

citotóxica tiene selectividad para unirse a membranas pobres en colesterol, como las bacterias, parásitos y células tumorales [42].

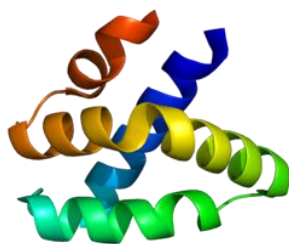


Figura 3. Estructura terciaria de la granulisina. La proteína presenta un plegamiento tipo saposina formado por cinco hélices alfa. [43]

Al principio fue identificada como un marcador de activación tardía de linfocitos T. Una curiosidad sobre la granulisina es que no tiene homólogo en la especie murina, lo cual dificulta asegurar cuál es su función fisiológica más importante [44].

1.4.2. ACCIÓN ANTITUMORAL

El principal mecanismo de acción de la granulisina consiste en la formación de poros en las membranas de células diana, desencadenando desestabilización osmótica. En el caso de las células tumorales puede provocar daño mitocondrial, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y liberación de citocromo c y de AIF, lo que resulta en ruptura del DNA dependiente o independiente de caspasas [45] [33].

La granulisina es una proteína con capacidad citotóxica sobre células tumorales. Se ha demostrado que su forma recombinante es capaz de inducir la muerte de células tumorales *in vitro*, sobre todo en líneas de leucemia aguda de linfocitos T o de mieloma [44]. Además, varios estudios han relacionado su expresión en linfocitos T infiltrados en tumores con un mejor pronóstico en pacientes, reforzando su papel fisiológico antitumoral [45] [46].

El mecanismo de acción de GRNLY combina distintas rutas bioquímicas de inducción de muerte celular (**Figura 4**). Una de las más destacadas es su capacidad para inducir apoptosis mediante una vía dependiente o independiente de ceramida, con generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento de calcio intracelular, liberación de citocromo c y activación de caspasas [47].

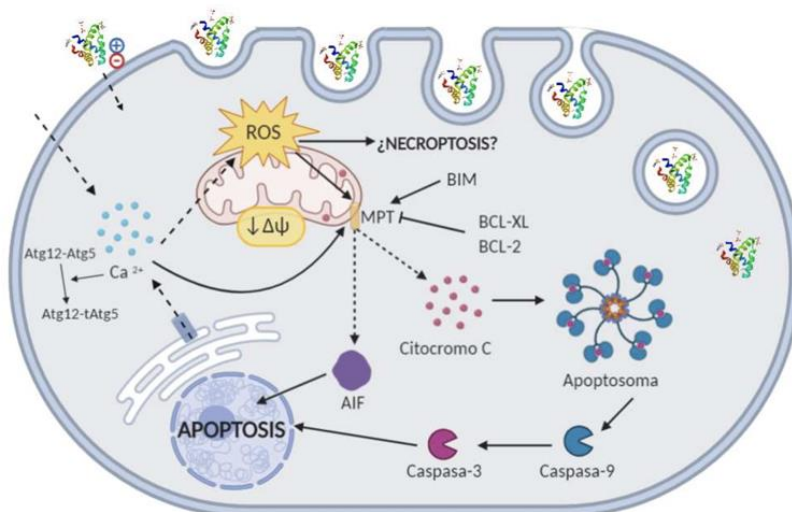


Figura 4. Mecanismo de acción antitumoral de la granulicina recombinate [48].

También se ha observado que su eficacia puede depender del perfil molecular de la célula tumoral, en particular de la expresión de genes antiapoptóticos como BCL-2 y BCL-xL [47].

1.4.3. LIMITACIONES Y VENTAJAS

Algunos estudios apuntan a que la granulicina no circula de forma estable en concentraciones elevadas [49], lo que sugiere que su vida media en el medio extracelular podría ser limitada. Además, cuando se libera al entorno extracelular, se requieren dosis altas en el orden de μM , para que ejerza su efecto, lo que indica una posible pérdida de eficacia si no se administra en condiciones controladas.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, se trata de una proteína de origen humano, es decir, una proteína endógena y que, por tanto, carecerá de inmunogenicidad si se usa como tratamiento antitumoral [50].

1.5. ANTÍGENOS TUMORALES COMO DIANAS TERAPÉUTICAS

El cáncer puede surgir a partir de células normales que acumulan alteraciones genéticas o epigenéticas debido a factores internos o del entorno, y que dan lugar a proteínas diferentes a las de las células sanas. Identificar antígenos tumorales es fundamental para desarrollar terapias inmunológicas más eficaces. Las células presentadoras de antígenos fagocitan restos tumorales, presentan en su superficie antígenos tumorales y activan células T vírgenes. Además, otras células inmunitarias innatas también pueden colaborar en la eliminación del tumor al detectar señales alteradas en su superficie [51].

Los antígenos tumorales son moléculas clave en el desarrollo de terapias antitumorales dirigidas. Algunas se expresan también en tejidos sanos, pero se sobreexpresan en las células tumorales. Además, los neoantígenos solo aparecen en células tumorales y derivan de mutaciones genéticas o epigenéticas. Son especialmente interesantes por su alta especificidad y bajo riesgo de toxicidad e identificar bien estos antígenos permite diseñar terapias basadas en células T, como los receptores TCR modificados o los CAR-T. Estas células pueden reconocer y destruir las células tumorales de forma muy precisa. Sin embargo, los tumores pueden dejar de expresar ciertos antígenos o variar mucho entre pacientes. Aun así, mejorar la selección de dianas tumorales es clave para avanzar hacia inmunoterapias más seguras y personalizadas [51].

El antígeno Tn, asociado a la mucina MUC1, es un marcador tumoral formado por la unión de una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de serina o treonina [52]. Este antígeno se genera debido a una glicosilación aberrante en la mucina MUC1, que permite la expresión de este antígeno que quedaría oculto por el glicocálix en las células normales. MUC1 pertenece a la familia de las mucinas y son unas glicoproteínas transmembrana que se encuentran normalmente expresadas en las células epiteliales. En ciertos tumores como los de mama, páncreas y hematológicos, MUC1 se encuentra sobreexpresada y anormalmente O-glicosilada [53]. Esta alteración hace que se distribuya a lo largo de toda la superficie celular, llevando a la aparición de antígeno Tn [54].

En estudios preclínicos, se ha utilizado la glicoproteína 5E5, un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-MUC1/Tn, para diseñar células CAR-T específicas contra MUC1-Tn y han demostrado una potente actividad antitumoral en ensayos preclínicos

in vivo [55]. Además, se ha observado que la versión humanizada del anticuerpo 5E5 mejora la citotoxicidad mediada por células NK, lo que sugiere su potencial en inmunoterapias basadas en anticuerpos [56].

1.6. NANOLIPOSOMAS EN TERAPIAS ANTITUMORALES

Los nanoliposomas son vesículas formadas por una o varias bicapas lipídicas que a su vez están formadas por fosfolípidos y esfingomielina, entre otros lípidos. Los fosfolípidos son anfifílicos, es decir, que tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica [57] (**Figura 6**).

Esta característica permite que los fosfolípidos se organicen espontáneamente en estructuras como los liposomas en un entorno acuoso. Las vesículas unilamelares grandes (LUVs) son liposomas formados por una sola bicapa lipídica con un diámetro que va de los 100 nm a los 250 nm [57].

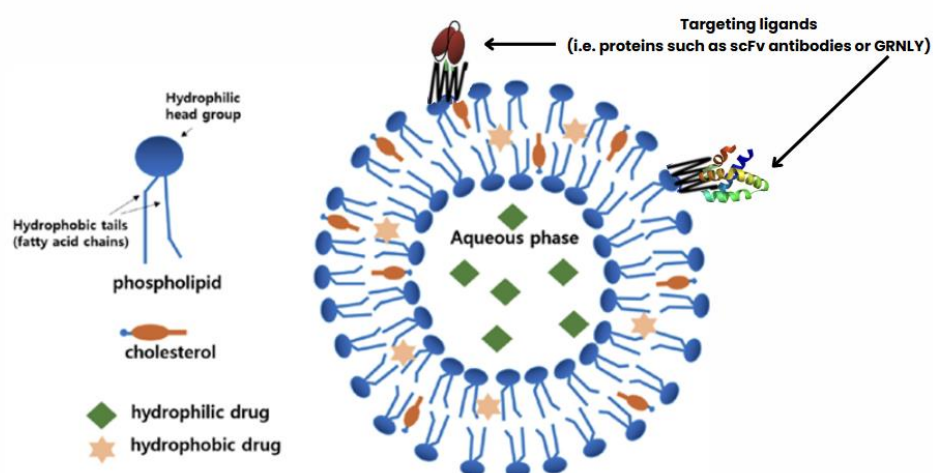


Figura 5. Estructura y composición general de un liposoma. Imagen de *Pharmaceutics*2020,12(3), 264 y modificada con Biorender.

Los avances en el campo de los liposomas han generado nuevas tecnologías que amplían su funcionalidad y versatilidad terapéutica [58]. Pueden ser diseñados con superficies funcionalizadas mediante la incorporación de biomoléculas específicas, lo que permite dirigirse a blancos biológicos particulares y abre la puerta a terapias altamente selectivas y efectivas. Estas innovaciones prometen mejorar significativamente la eficacia y la personalización de los tratamientos basados en liposomas [57]. Los liposomas pueden ser funcionalizados con anticuerpos o ligandos

específicos para dirigirse a células, tejidos y órganos de interés, y recubiertos con polímeros inertes y biocompatibles como el PEG, lo que prolonga su vida media en circulación *in vivo* [59].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. ANTECEDENTES

La granulisinina es una proteína humana producida por CTLs y NKs. Tiene un papel fisiológico en la eliminación de patógenos. En estudios previos de nuestro grupo se ha visto que la granulisinina recombinante en su isoforma de 9kDa puede ser un tratamiento prometedor para el tratamiento del cáncer [41] [60]. Al ser de origen endógeno, tiene una baja inmunogenicidad si se usa como tratamiento.

Se demostró en estudios *in vivo* que la inyección de GRNLY intratumoral resultaba eficaz contra el desarrollo de diversos tumores sólidos y que además inducía la infiltración de células NK en ratones atímicos, sugiriendo que podría tener efectos inmunogénicos [61][62]. Seguidamente, se generaron inmunotoxinas basadas en GRNLY que la combinaban en la misma molécula con fragmentos de anticuerpos dirigidos contra los antígenos tumorales CEA o MUC1/Tn, demostrando actividad antitumoral tras inyección sistemática en modelos *in vivo* [63][64].

La búsqueda de tratamientos antitumorales eficaces ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias, como el uso de sistemas de vehiculización en liposomas con anticuerpos específicos. Un ejemplo es Doxil[®], un liposoma con doxorrubicina encapsulada [65]. Nuestro grupo desarrolló LUV-TRAIL, o más recientemente LUV-GRNLY [66], donde los ligandos se anclan a las vesículas a través de lípidos, como el DOGS-NTA-Níquel, e inducen apoptosis en células tumorales de forma más eficaz. Sin embargo, en el caso de los LUV-GRNLY, no se han combinado todavía con anticuerpos que puedan dar direccionamiento antitumoral al tratamiento.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Fin de Máster es:

- Desarrollar y caracterizar un sistema de Inmunoliposomas basado en LUVs funcionalizados con fragmentos scFv del anticuerpo 5E5 anti-Tn y granulicina, como estrategia terapéutica dirigida para el tratamiento del cáncer.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Expresar y purificar las proteínas recombinantes: GRNLY y 5E5.
2. Comprobar la unión de los fragmentos scFv del anticuerpo 5E5 a diferentes líneas celulares que presentan el antígeno Tn.
3. Desarrollar nanoliposomas LUVs conjugados con los fragmentos scFv del anticuerpo 5E5 y de granulicina.
4. Analizar la unión de los inmunoliposomas en diferentes líneas celulares.
5. Evaluar la citotoxicidad de los inmunoliposomas en diferentes líneas celulares.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. CULTIVOS CELULARES

En este Trabajo de Fin de Máster se trabajaron con diferentes líneas celulares tumorales, pero las principales fueron MDA-MB-231, JURKAT, H929, Capan-2 y A549.

Línea celular	Tumor de origen
Células adherentes	
MDA-MB-231	Cáncer de mama en etapa avanzada
Capan-2	Adenocarcinoma pancreático
A549	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
Caco-2	Adenocarcinoma de colon
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix
MCF7	Adenocarcinoma de pecho
HCT116	Carcinoma colorrectal
MIA PaCa-2	Carcinoma pancreático
HT29	Adenocarcinoma colorrectal
MKN45	Cáncer gástrico
Células en suspensión	
JURKAT	Leucemia aguda de linfocitos T
H929	Mieloma de linfocitos B

Las líneas celulares de células adherentes se cultivaron con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (*gibco, Grand Island, Nueva York*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin y se cultivaron en frascos medianos en esterilidad. Las de células en suspensión se cultivaron con medio RPMI 1640 (*gibco, Grand Island, Nueva York*) suplementado con 10% de SFB, 100U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin y se cultivaron en frascos pequeños en esterilidad. Ambos tipos celulares se incubaron

en un incubador termostático MCO-18AIC(UV) CO₂ Incubator (*SANYO, Osaka, Japón*) a 37°C con humedad y un 5% de CO₂. Para el manejo de las líneas celulares se usó una campana de flujo laminar vertical PV-30/70 (*Telstar, Waiblingen, Alemania*) en condiciones de esterilidad.

Para el conteo y viabilidad de las células en suspensión se usó tinción con azul tripán en una cámara de Neubauer. Esta tinción se basa en que las células muertas pierden la integridad de sus membranas y se hacen permeables al colorante. El conteo se realizó cada 3-4 días y se usó un microscopio óptico DM300 (*LEICA, Wetzlar, Alemania*). Los cultivos celulares se mantuvieron con una densidad de alrededor de 1×10^6 células/mL.

Para la congelación de las líneas celulares se usaron tubos de criopreservación y se guardaron en un congelador a -80°C VIP ECO ULT Freezers (*phcbi, Tokio, Japón*). Para reducir la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico se utilizó como medio de congelación SFB con un 10% de dimetilsulfoxido (DMSO). en una densidad celular de 1×10^5 células/mL.

La descongelación fue rápida ya que el DMSO es tóxico a temperatura ambiente para las células. Se añadió medio atemperado a las células en un falcon de 15 mL, se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos en una centrífuga Allegra X (*BECKMAN COULTER, California, EE. UU.*). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio de cultivo complementado.

3.2. MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE GRNLY

BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium)	
- 1% (m/V) yeast extract	- 1% (V/V) glicerol
- 2% (m/V) peptona	- 80% (V/V) agua destilada
Autoclavar botella y complementar en esterilidad:	
- 13.4% (m/V) YNB (yeast nitrogen base)	- 10% (V/V) tampón fosfato pH6 (0.95% (m/V) de KH_2PO_4 y 0.52% (m/V) de K_2HPO_4)
BMM (Bold's Basal Medium)	
- 60% (V/V) agua destilada	- 3% (V/V) anti-foam 204
Autoclavar botella y complementar en esterilidad:	
- 13.4 % (m/V) YNB	- 10% (V/V) metanol
- 10% (V/V) tampón fosfato pH6	- 1% (m/V) casaminoácidos
- 0.00004% (m/V) biotina	

3.3. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE GRNLY RECOMBINANTE

El descubrimiento y estudio de nuevos métodos de producción de proteína recombinante mediante ingeniería genética ha sido uno de los grandes avances en la industria biotecnológica. El desarrollo de proteínas heterólogas en organismos procariotas o eucariotas ha ayudado a poder obtener proteínas de interés.

Para la producción de granulisina se usaron colonias de levaduras de *Pichia pastoris*. Se trata de una levadura metilotrófica con alta productividad, capacidad de glicosilación similar a las células de mamíferos y con facilidad de manipulación genética [67]. Cuya fuente de carbono es el metanol, lo que ayuda a una regulación precisa de los genes insertados, como sucede con el promotor AOX1 del plásmido integrativo pPICZαC-GRNLY, que se activa y controla la expresión proteica (**Figura 5**) [68].

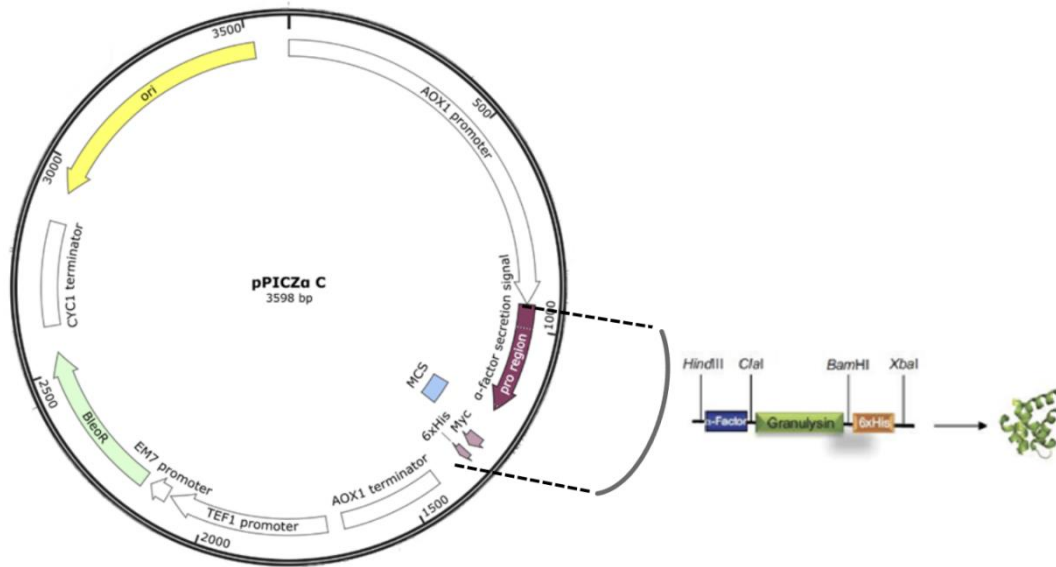


Figura 6. Esquema del plásmido integrativo pPICZαC de granulisina. La zona señalada es el sitio específico donde se insertó del cDNA que codifica la granulisina. De esta manera permite su expresión en el sistema. Imágenes obtenida de SnapGene y [62] y modificada con Biorender.

Para realizar el precultivo se dejó crecer la colonia con medio YPD (yeast extract, peptona y dextrosa) en un incubador WIS-30 (WITEG, Wertheim, Alemania) a 30°C con agitación de 250 rpm constante durante 24 horas. Después, para su crecimiento, se inocularon en una concentración de 10^6 levaduras/mL en los 2 litros del medio BMGY y se dejó incubando a 30°C, 250 rpm durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se realizan controles de densidad óptica en el espectrofotómetro (10^8 levaduras/mL) y se comprueba que no haya habido contaminaciones de otros microorganismos en el microscopio.

Posteriormente, se centrifugó en la ultracentrífuga 2236R (Gyrozen, Daejeon, Corea del Sur) a 6900 rpm, 4°C, durante 10 minutos. Se recogió el pellet y se disolvió con agitación en los 2 litros del medio BMM. Después, se pasaron alrededor de 340 mL de la mezcla en cada uno de los 6 de los Erlenmeyer y se pusieron a incubar a 18°C, 250 rpm durante 24 horas. Desde ese día y los dos días siguientes se echó un 2% (V/V) de metanol en cada matraz por día para la inducción de granulisina por parte de *P. pastoris*.

Este proceso se resume en la **Figura 7**. Además, se llevó a cabo en campanas de flujo lamilar y con materiales previamente esterilizados por filtración y autoclavado para mantener la esterilidad del cultivo bacteriano.

Después, se centrifugó en una centrífuga Sorvall LYNX 4000 (*Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.*) la mezcla para poder coger el sobrenadante a 4°C, 9600 rpm durante 20 minutos. Tras eso, se pasó por un filtro de 0.22µm (se cogió muestra y se midió pH) y se incubó con resina de Ni-NTA agarosa 30 minutos en agitación en la cámara fría (4°C). Después, se pasó por un embudo de filtración con disco de vidrio sinterizado de porosidad 4 para separar la resina del sobrenadante y se procedió a realizar la elución de la proteína transfiriendo la resina de níquel junto a la proteína de interés unida a ella a una columna para llevar a cabo los siguientes pasos de la cromatografía y se guardó el sobrenadante postresina para comprobar que no queda proteína en ella y que se ha unido toda a la resina. La resina de níquel junto a la proteína de interés unida a ella se transfirió a una columna tras realizar un lavado con PBS para realizar la cromatografía.

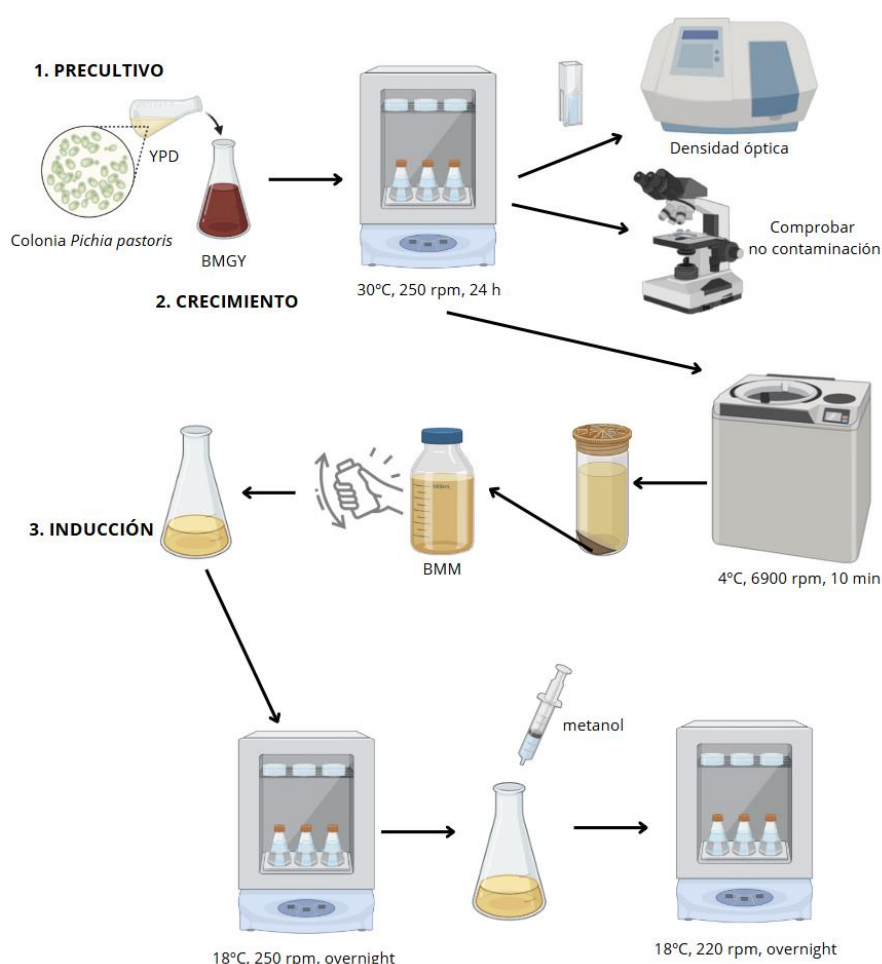


Figura 7. Esquema de la producción de granulinas recombinante. Imagen creada con Biorender.

Finalmente, la elución de la proteína se realizó mediante gradiente de imidazol 0,15M (30 mL) y 0,5M (30 mL), imidazol 2M (25 mL), agua (40 mL) y PBS (40 mL). La columna se conservó en cámara fría (4°C) en metanol.

Las muestras fueron recolectadas en eppendorfs de 2 mL en un colector de fracciones Redi-Frac (*Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia*) con las que se realizaron ensayos de electroforesis en gel (de 4-20%, Tris-glicina) para analizar la presencia de proteína.

3.3.1. TINCIÓN CON COLORANTE AZUL DE COOMASSIE

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas de proteínas se tiñeron con el colorante Azul de Coomassie R. Esta solución colorante contiene 0.65 g de Azul de Coomassie R, 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua destilada. Los geles se cubrieron totalmente con el colorante y se mantuvieron en agitación durante media hora. Después, se retiró el colorante y se añadió una mezcla de decolorante para aclarar los geles. El decolorante se preparó con 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada. Los geles permanecieron en la mezcla de decolorante hasta que quedaron incoloras las zonas del gel donde no había bandas de proteína.

3.3.2. INMUNOBLOT

Se realizaron técnicas de inmunoblot con iBlot™ 3 (*Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.*), se utilizó un paquete preensamblado llamado iBlot™ Transfer Stack, que incluye una membrana de nitrocelulosa y papeles absorbentes necesarios para la transferencia. Se colocó la base sobre la placa inferior de iBlot™ 3, con la membrana hacia arriba. Luego, se colocó el gel directamente sobre la membrana y se cerró el sándwich de transferencia con la parte superior del stack, que contiene los papeles absorbentes y el contacto con el electrodo positivo. Al terminar la transferencia, se retiró el stack y se extrajo la membrana, que ya contiene las proteínas transferidas desde el gel. Para bloquear la membrana se realizó un bloqueo para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana con una solución preparada disolviendo con 5 gramos de leche en polvo desnatada en 100 mL de tampón B (0.01% (m/v) timerosal, 0.5% (v/v) Tween y disueltos en PBS) durante 30 minutos. Seguidamente, se

realizaron 3 lavados con tampón B, cada lavado con una duración de al menos 5 minutos y se realizó a temperatura ambiente en agitación suave. Tras los lavados, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-cola de histidinas a una concentración final de 0.5 mg/mL en agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con tampón B a temperatura ambiente en agitación suave, con una duración de cada lavado de al menos 5 minutos. Después, la membrana se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-mouse-PO que se disolvió 1 µL con 5 ml de tampón B y 5 ml de la solución previamente preparada de leche, se lavó 3 veces con tampón B en agitación y a temperatura ambiente (cada lavado con una duración de al menos 10 minutos). Por último, se llevó a cabo la detección de los inmunocomplejos mediante revelado por quimioluminiscencia. Esta técnica se basa en la detección de la luz emitida por la oxidación por parte de la peroxidasa de luminol, un sustrato quimioluminiscente. Para realizar este revelado, la solución del kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (*Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.*) se añadió a la membrana y se dejó actuar aproximadamente 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se reveló mediante el equipo Amersham Imager 680 (*GE Healthcare Life Sciences, Massachusetts, EE. UU.*).

3.3.3. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se realizó con varios ciclos de centrifugación a 4200 rpm durante tiempos de 5 a 30 minutos en filtros Amicon® de 3 kDa (*Merck Millipore, Darmstadt, Alemania*). Este sistema permite concentrar la muestra y eliminar de forma eficiente pequeñas moléculas presentes como el imidazol, que se utiliza durante la purificación por cromatografía de afinidad. Se realizó una dilución inicial 1:5 de la muestra con PBS tras la elución, para evitar daños en la membrana del filtro que pueden ocurrir si la concentración de imidazol es demasiado alta y reducir progresivamente la concentración final de imidazol en la solución concentrada hasta que la concentración de imidazol queda por debajo de 1 mM. Esto es importante ya que si hay niveles residuales de imidazol pueden interferir con la estabilidad de la proteína y con su funcionalidad en ensayos posteriores.

3.3.4. ENSAYOS COLORIMÉTICOS BCA

Para la determinación de proteína se realizaron ensayos colorimétricos BCA (ácido bicinconínico) para cuantificar la concentración de proteína que se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por los grupos funcionales de las proteínas en medio alcalino, seguida de la formación de un complejo violeta entre Cu^+ y el reactivo BCA, que se puede cuantificar a una longitud de onda de 562 nm y empleando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Para el ensayo se utilizó el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (*Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.*).

Se prepararon diluciones seriadas de BSA partiendo de una solución de 2 mg/mL, obteniendo concentraciones finales de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Para cada dilución, se mezclaron 100 μL de la solución anterior con 100 μL de PBS, excepto en el primer tubo, donde se mezclaron 20 μL de BSA (2 mg/mL) con 180 μL de PBS y cada dilución se pipeteó por triplicado en una placa de 96 pocillos, además, se incluyeron 3 pocillos de blanco con PBS (100 μL).

En la preparación de las muestras, cada una se diluyó 1:16 mezclando 20 μL de muestra con 300 μL de PBS y se pipetearon 100 μL por pocillo, también por triplicado. Después, se preparó la mezcla de reactivos en proporciones de 50% Reactivo A, 48% Reactivo B y 2% Reactivo C y se distribuyeron 100 μL por pocillo, tanto en los estándares como en las muestras. La placa se incubó a 60°C durante 12 minutos aproximadamente y tras eso se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas.

Con los estándares se generó una curva de calibración y a partir de ella se interpolaron los valores de concentración de las muestras. La curva estándar mostraba una correlación lineal con un coeficiente de regresión (R^2) cercano a 1, lo que indica que el método es fiable y hay una correcta cuantificación de la proteína purificada. Seguidamente, se almacenaron en alícuotas en el congelador de -80°C ya que se comprobó que congelando la proteína el mismo día de su purificación se mantenía su actividad citotóxica más estable.

3.4. MEDIOS PARA LA PRODUCCION DE scFv-5E5

TB (Terrific Broth)

- | | |
|---|-----------------------------------|
| - 0.23% (m/V) KH_2PO_4 (MW 136.09) | - 2.4% (m/V) yeast extract powder |
| - 1.625% (m/V) K_2HPO_4 (MW 174.18) | - 0.4% (m/V) glicerol |
| - 1.2% (m/V) Tripona | - 93.15% (V/V) agua destilada |

Autoclavar botella y complementar en esterilidad:

- | | |
|--------------------------------|--------------------------|
| - 0.055% (m/V) glucosa | - 0.01% (m/V) ampicilina |
| - 0.002% (m/V) MgCl_2 | |

Buffer TES 4X en 100mL

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| - 17.11% (m/V) sacarosa | - 0.0186% (m/V) EDTA |
| - 2.42% (m/V) TRIS (pH 8) | |

3.5. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE scFv-5E5

Para la producción de scFv-5E5 se usaron colonias de bacterias de la cepa WK6 de *Escherichia coli*. La secuencia de DNA del scFv-5E5 fue optimizada para su expresión en *E. coli* y sintetizada por GenScript (USA). Se clonó en el vector pHEN6c con una etiqueta 6xHis, generando el plásmido pHEN6c-scFv-5E5-6xHis. Además, se produjeron mutantes específicos mediante mutagénesis dirigida y todos los plásmidos se transformaron en células WK6.

PROTOCOLO BASADO EN SONICACIÓN

En primer lugar, se cultivaron las bacterias en un preinóculo de 100 mL de LB (Luria Bertani) que contenía como nutrientes peptona de caseína y extracto de levadura, y para el equilibrio osmótico cloruro de sodio. Se incubó a 220 rpm a 37°C durante toda la noche.

Tras la incubación, se transfirió el cultivo a dos matraces de 2 L con 1 L de LB cada uno. Se incubaron a 220 rpm a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (OD600) de 0.65. Se dejó en hielo 30 minutos y se indujo la expresión proteica con 1 mL de IPTG por litro. La inducción se realizó a 180 rpm a 25 °C durante 6 horas. Después, se centrifugó a 8000 g a 4°C durante 10 minutos, se recogió el pellet con las bacterias, se lavó con PBS y se congeló a -80°C.

Al día siguiente, se descongeló el pellet y se resuspendió en tampón de lisis con diferentes aditivos (0.05% (m/V) lisozima, 0.01% (V/V) DNAsa I, 0.000062% (m/V) DTT, 0.05% (V/V) Tritón X-100 y 0.0008% (m/V) inhibidores de proteasas). Las muestras se sometieron tres veces a: 1) incubación a 4°C durante 1 hora en agitación en una noria, 2) resuspensión y 3) sonicación con amplitud 70 y ciclo 0.7 (5 ciclos de 30 sonidos). Finalmente, se centrifugó a 20000 rpm y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se pasó por una columna de resina de níquel para proceder con la cromatografía de afinidad.

PROTOCOLO CON TAMPÓN TES

Se realizó otra purificación usando un nuevo **protocolo usando un tampón TES (Tris, EDTA, y sacarosa)**. Para realizar el precultivo se sembró una colonia de la cepa de bacterias en 100 mL de medio TB con 100 µg/mL de ampicilina, 0.002% (m/V) MgCl₂ y 0.055% (m/V) glucosa, y se dejó crecer a 220 rpm a 37°C durante la noche en la incubadora.

El precultivo se dividió en los matraces que contenían medio de cultivo TB y cuando alcanzaron una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.6 (aproximadamente una hora y media después de inocular) se inoculó con IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 28°C a 220 rpm durante la noche.

Posteriormente se centrifugó a 18000 g, 4°C, durante 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 12 mL de buffer TES 4X por cada litro de cultivo y agitó en una noria a 4°C durante 6 horas. Después se añadió 24 mL de TES 1X (6 mL TES 4X + 18 mL H₂O) por cada litro de cultivo y se dejó en agitación a 4°C durante la noche.

Este proceso se resume en la **Figura 8**. Además, se llevó a cabo en campanas de flujo laminar vertical y con materiales previamente esterilizados por filtración y autoclavado para mantener la esterilidad del cultivo bacteriano.

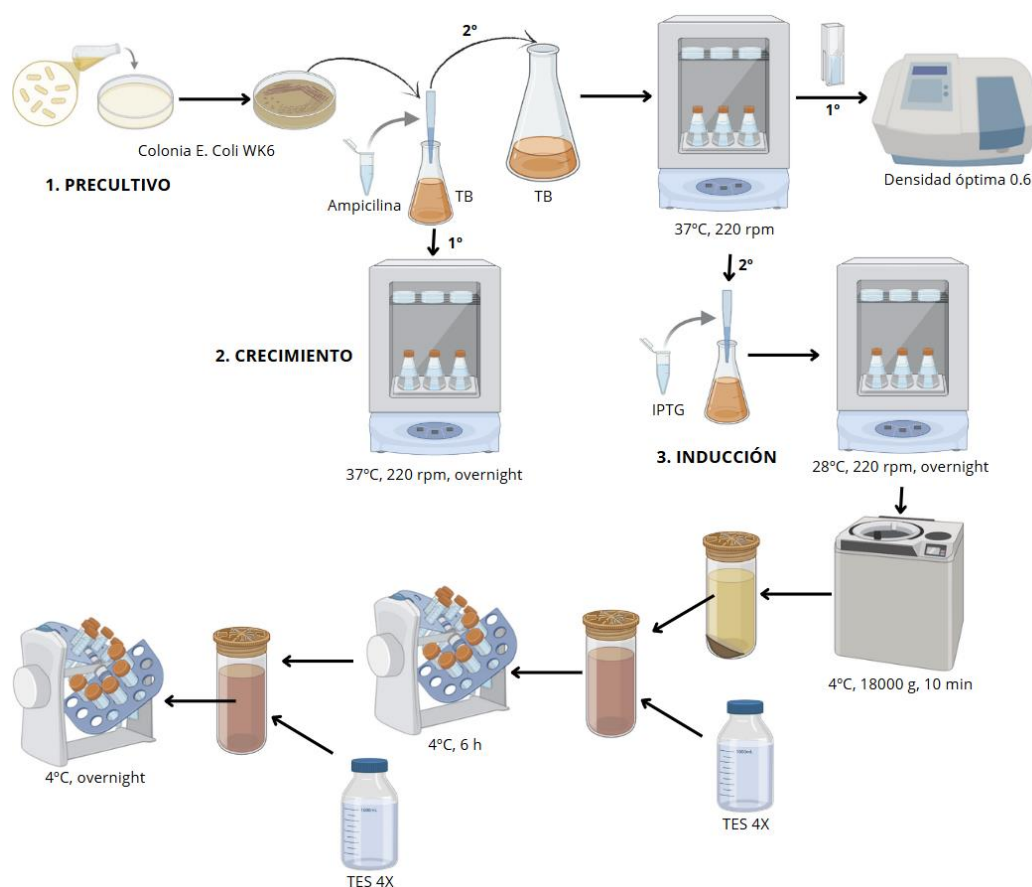


Figura 8. Esquema de la producción de scFv-5E5 recombinante. Imagen creada con Biorender.

Después, se clarificó el sobrenadante centrifugando a 4°C, 22000 rpm, 10 minutos y luego, pasando el sobrenadante a otros botes de centrífuga, a 4°C, 21000 rpm, 40 minutos para disminuir la viscosidad de la mezcla. Tras eso, se pasó por filtro de 0.22µm y se incubó con resina de Ni-NTA de agarosa hora y media en agitación en la cámara fría (4°C). El volumen de resina fue aproximadamente de 6 mL por cada 2 litros de cultivo. Después, se pasó por un embudo de filtración de vidrio con disco de vidrio sinterizado de porosidad 4 para separar la resina del sobrenadante y se procedió a realizar la elución de la proteína transfiriendo la resina de níquel junto a la proteína de interés unida a ella a una columna para llevar a cabo los siguientes pasos de la cromatografía de afinidad y se guardó la postresina para comprobar que no queda proteína en ella y que se ha unido toda a la resina. La resina de níquel junto a la proteína

de interés unida a ella se transfirió a una columna tras realizar un lavado con PBS para realizar la cromatografía.

Por último, se eluyó con un gradiente de imidazol (20mM/80mM/400mM). Con las muestras recogidas en eppendorfs de 2 mL en un colector de fracciones se realizaron ensayos de electroforesis en gel (de 4-20%, Tris-glicina) para analizar la presencia de proteína. Las bandas de proteína se vieron con tinción de Coomassie y técnicas de inmunoblot (*Descrito en los apartados 6.3.1. y 6.3.2. de la purificación de la granulisina*). De esta manera se vio la pureza de la proteína. Tras esto las muestras se concentraron centrifugando en filtros Amicon de 10 kDa (*Descrito en el apartado 6.3.3. de la purificación de la granulisina*).

Después, se realizaron ensayos BCA para cuantificar la concentración de proteína (*Descrito en el apartado 6.3.4. de la purificación de la granulisina*). La curva estándar mostraba una correlación lineal con un coeficiente de regresión (R^2) cercano a 1. Seguidamente, se almacenaron en alícuotas en el congelador de -80°C.

3.6. PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS LUV

Para la producción de los liposomas (**Figura 9**) se hizo en primer lugar una mezcla de cloroformo/metanol 2:1. Se realizaron producciones donde se mezclaron los siguientes lípidos: 50% de fosfatidilcolina (egg PC), 30% de esfingomielina (SM), 10% de colesterol, 5% de DOGS-NTA-Níquel y 5% de polietilenglicol (PEG) en la mezcla de cloroformo/metanol. El egg PC es el componente estructural principal, el SM aporta rigidez, el colesterol regula la fluidez y estabilidad de la membrana, el DOGS-NTA-Níquel tiene como función anclar proteínas con His-tag, como la granulisina y scFv-5E5, y PEG proporciona estabilidad coloidal, reduce la opsonización y prolonga la vida media en circulación.

Para eliminar el disolvente se secaron los eppendorf bajo corriente de nitrógeno alrededor de 10 minutos. Posteriormente se realizó un segundo secado para eliminar posibles trazas del cloroformo/metanol en un concentrador de vacío (*Concentrador 5301, EPPENDORF®*) a 45°C durante al menos 6 horas.

Pasadas las 6 horas de secado se añadieron a cada eppendorf el mismo volumen de PBS que el volumen añadido anteriormente de lípidos, se dejó hidratar 10 minutos, se resuspendió la mezcla y se llevó a congelar a -20°C durante la noche. El ciclo de

congelación y descongelación ayuda a eliminar las estructuras multilamellares que se forman al hidratarlo con el PBS. En la congelación el agua se expande al formar cristales que ayuda a desestabilizar y romper las membranas internas de las vesículas multilamellares grandes (MLVs) y al descongelar las membranas rotas se reorganizan formando vesículas unilamellares más grandes (LUVs).

Una vez descongelados, los eppendorfs se unificaron en un frasco de vidrio. La mezcla se extruyó 10 veces a través de un *Liposome Extruder* equipado con un filtro de 0.22µm, utilizando presión de nitrógeno. De esta manera se homogeniza el tamaño de los liposomas unilamellares y nos aseguramos de que se obtiene los LUVs de un tamaño menos de 220 nm. Finalmente, se filtró la mezcla con un filtro de 0.22µm en esterilidad en una campana de flujo laminar.

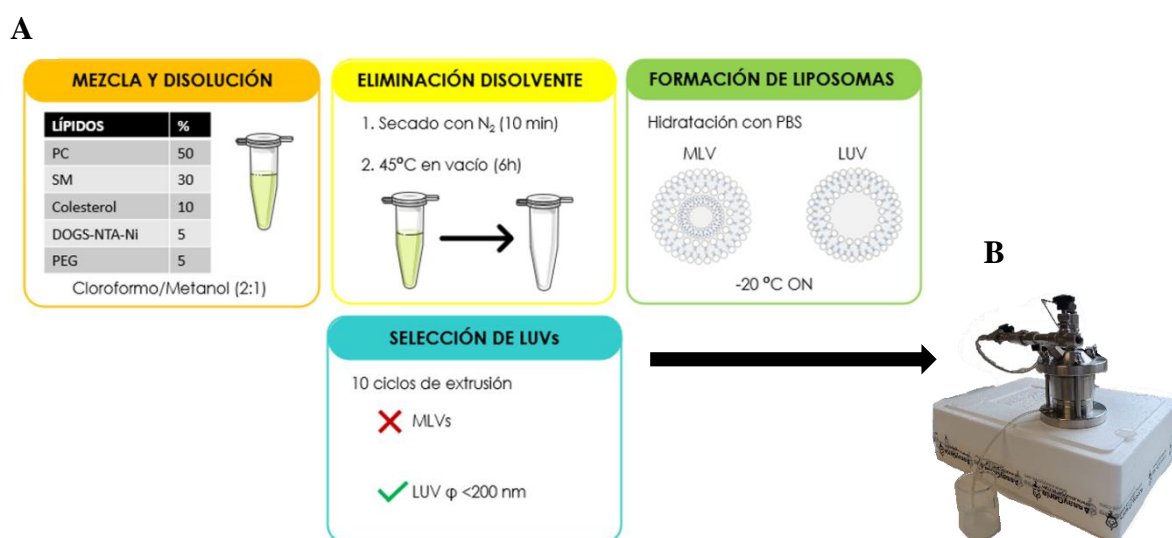


Figura 9. Producción de nanoliposomas. A. Esquema de la composición y producción de LUVs. Realizado por Raquel Ibáñez Pérez, directora del TFM (comunicación personal, 2025). B. Imagen del extruder de liposomas utilizado.

Para revestir los LUVs con GRNLY y scFv-5E5 se realizaron ensayos de unión donde se incubaron los liposomas, las proteínas y PBS en un termobloque (*Thermomixer comfort, eppendorf*) a 37°C y 800 rpm durante 30 minutos. De esta manera las proteínas se unen al níquel del DOGS-NTA-Níquel mediante la cola de histidinas (Figuras 10 y 11).

Para evaluar la eficiencia de unión se centrifugaron los eppendorf a 4°C y 14000 rpm durante 5 horas. Una vez transcurrido el tiempo se recogieron 30µL del sobrenadante (SN) y se transfirieron a otro eppendorf. Al eppendorf que contenía el pellet se le añadieron 30µL de PBS y se resuspendió la mezcla para que quedase homogénea.

Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis, empleando tinción con Coomassie e Inmunoblot con anticuerpos anti-HisTag.

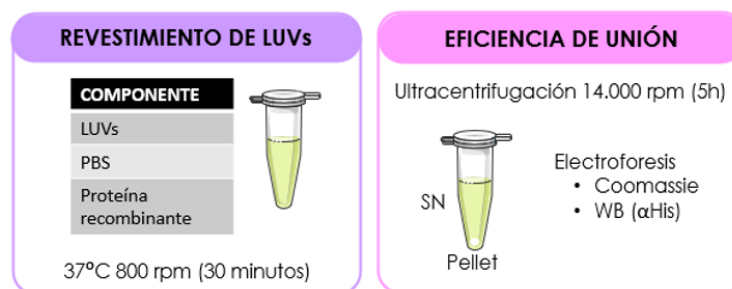


Figura 10. Esquema del revestimiento y eficiencia de unión de los LUVs con las proteínas recombinantes producidas y purificadas. Realizado por Raquel Ibáñez Pérez, directora del TFM (comunicación personal, 2025).

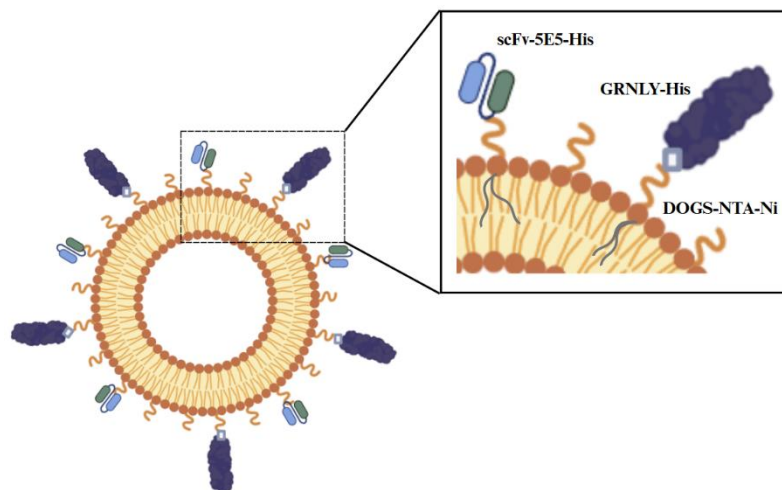


Figura 11. Representación esquemática del revestimiento de un LUV con las proteínas recombinantes producidas y purificadas. Tanto scFv-5E5 como la granulicina se unen por su cola de histidinas al níquel del lípido DOGS-NTA-Ni. Imagen creada con Biorender.

3.7. ENSAYOS DE UNIÓN

Para evaluar la unión específica de scFv-5E5 y de los LUVs funcionalizados con scFv-5E5 y scFv-5E5 + GRNLY a líneas celulares tumorales que expresan el antígeno Tn en su superficie, se llevaron a cabo ensayos de unión.

Para la preparación de las células se utilizó una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se sembraron 1×10^5 células por pocillo en un volumen final de 100 μ L/pocillo. De cada línea celular se prepararon tres condiciones experimentales:

- Solo células (control basal)
- Células + anticuerpos de detección (α -His + α -mouse-APC)
- Células + LUVs conjugados + anticuerpo de detección
- Células + proteína + anticuerpo de detección

Las incubaciones se hicieron a 4°C durante 30 minutos cada una, siguiendo el siguiente orden:

1. Proteína o LUVs conjugados (0,1 μ M) en PBS con 5 % de SFB
2. Anticuerpo anti-His (1:500) en PBS 5 % SFB
3. Anticuerpo secundario conjugado a APC (anti-mouse-APC) (1:500) en PBS 5 % SFB

En cada paso se hizo un lavado con 200 μ L de PBS 5% SFB, centrifugando a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C en Allegra X-15R (*BECKMAN COULTER, California, EE. UU.*) y eliminando el sobrenadante de un golpe cuidadosamente. En la última incubación se hicieron dos lavados.

Después del último lavado, las células se resuspendieron en 200 μ L de PBS 5% SFB y se añadieron a tubos de citometría. La unión de los anticuerpos o LUVs a la superficie celular se analizó mediante citometría de flujo en FACSCalibur (*BD Biosciences, Meylan, Francia*), evaluando la intensidad de fluorescencia en el canal APC.

3.8. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Se realizaron ensayos de citotoxicidad para estudiar el efecto citotóxico de las proteínas recombinantes scFv-5E5 y GRNLY, dosis-respuesta de los LUVs solos para determinar a qué concentración dejan de ser tóxicos para las células y la combinación de LUVs con las proteínas recombinantes. Estos ensayos de viabilidad celular fueron tanto en líneas celulares tumorales en suspensión como adherentes y se analizaron por citometría de flujo.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos plano:

- Células en suspensión: 3×10^4 células por pocillo en medio RPMI-1640 con 10 % de SFB y antibióticos.
- Células adherentes: 2×10^4 células por pocillo en medio DMEM con 10 % de SFB y antibióticos. Se incubaron 24 h para permitir su adhesión.

Las placas se mantuvieron en un incubador termostático (*SANYO CO₂ INCUBATOR*) a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta el momento del tratamiento. Tras añadir los tratamientos a los pocillos, se incubó durante el tiempo establecido para cada ensayo antes del análisis en el citómetro de flujo.

En el caso de las células adherentes, se quitó el medio, se lavó con 200 µL de PBS 5% SFB y se separaron del fondo mediante incubación con tripsina, se recolectaron en placas de fondo redondo y se realizó el marcaje.

El doble marcaje se realizó con Anexina V-FITC que es un fluoróforo que detecta la exposición de fosfatidilserina (apoptosis temprana) y con 7-AAD que penetra en células con membrana dañada y se une al DNA del núcleo (apoptosis tardía o necrosis). Por pocillo se añade un volumen final de 100 µL con 0,1 µL de Anexina V-FITC, 1 µL de 7-AAD, 20 µL de tampón ABB y el volumen restante de PBS. Las células se incubaron con la mezcla durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, se transfirieron a tubos de citometría para obtener los datos.

Se evaluaron los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana, apoptosis tardía o necrosis, en función de la fluorescencia de Anexina V-FITC y 7-AAD.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados por distintos programas en función del tipo de experimento. Para el análisis básico de datos, como la cuantificación de proteína, se usó *Microsoft Excel*. Se usó el software *FlowJo 10.8.1* para analizar los datos de citometría y obtener así imágenes e histogramas. También para cuantificar la viabilidad celular, citotoxicidad de las proteínas y la unión específica. Los análisis estadísticos se analizaron con *GraphPad Prism 8*, usando two-way ANOVA, test Tukey en comparación múltiple y considerando valores estadísticamente significativos aquellas con $p < 0,05$. De cada tratamiento efectuado, se realizaron al menos dos experimentos independientes ($n = 2$) y las muestras se analizaron por duplicado ($n = 2$), además, los resultados se muestran como media \pm desviación estándar (SD).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN DE scFv-5E5 EN *Escherichia coli* Y PURIFICACIÓN

Tras la producción del scFv-5E5 en *Escherichia coli*, se procedió a extraer las proteínas de las bacterias mediante sonicación. Seguidamente se procedió su purificación por cromatografía de afinidad en una columna de resina con níquel (*Ver MATERIALES Y MÉTODOS*). Para la elución de las proteínas se usó un gradiente de imidazol de 20 mM, 100 mM y 500 mM, con el objetivo de eliminar las proteínas contaminantes presentes en la muestra. A 500 mM, se observó una banda que coincidía con el tamaño esperado del scFv-5E5 (por encima de la banda de 25 kDa), lo que indicaba que se había logrado su elución (**Figura 12**). Sin embargo, junto a esta banda también aparecieron otras correspondientes a proteínas contaminantes. Estas impurezas persistieron a pesar de aplicar varios lavados con diferentes concentraciones de imidazol, lo que sugiere que la purificación mediante este método no fue completamente eficiente.

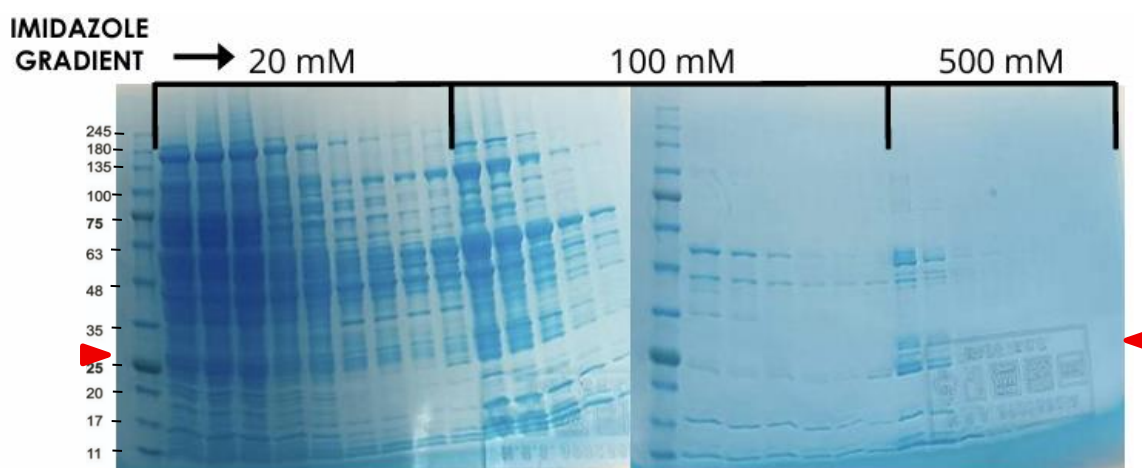


Figura 12. Análisis con tinción de azul de Coomassie de las proteínas de las fracciones de elución recogidas. Se muestra el patrón de migración de proteínas según su peso molecular en kDa tras el gradiente de imidazol a 20, 100 y 500 Mm, según se indica. Señalada con la flecha roja se encuentra la proteína de interés.

Tras los resultados obtenidos con el protocolo basado en sonicación, se ensayó un nuevo método de purificación, usando un protocolo en el que las proteínas se lisan en un tampón que contiene Tris, EDTA y sacarosa (*ver MATERIALES Y MÉTODOS, apartado 6.5.*). En primer lugar, se hizo una producción de 2 L de cultivo. Tras la incubación en la columna de afinidad con resina de níquel, se procedió a la elución de

las proteínas con un gradiente de imidazol 20 mM, 100 mM y 500 mM. Tras este proceso, se pudo detectar la proteína sin apenas contaminaciones. Sin embargo, aunque se obtuvo una banda muy pura, la concentración era algo baja (**Figura 13**).

Se probó seguidamente otro gradiente de imidazol con concentraciones de 60 mM y 500 mM. Con un único lavado a 60 mM, se logró eliminar la mayor parte de las proteínas contaminantes. La elución a 500 mM permitió obtener una banda intensa correspondiente a la proteína scFv-5E5, acompañada únicamente de algunas bandas de bajo peso molecular (**Figura 14**).

Esta modificación del protocolo resultó más eficiente: se redujo el tiempo total de elución, se minimizó la pérdida de proteína de interés y también se disminuyó el número de geles necesarios para comprobar la pureza, facilitando así el proceso general de análisis.

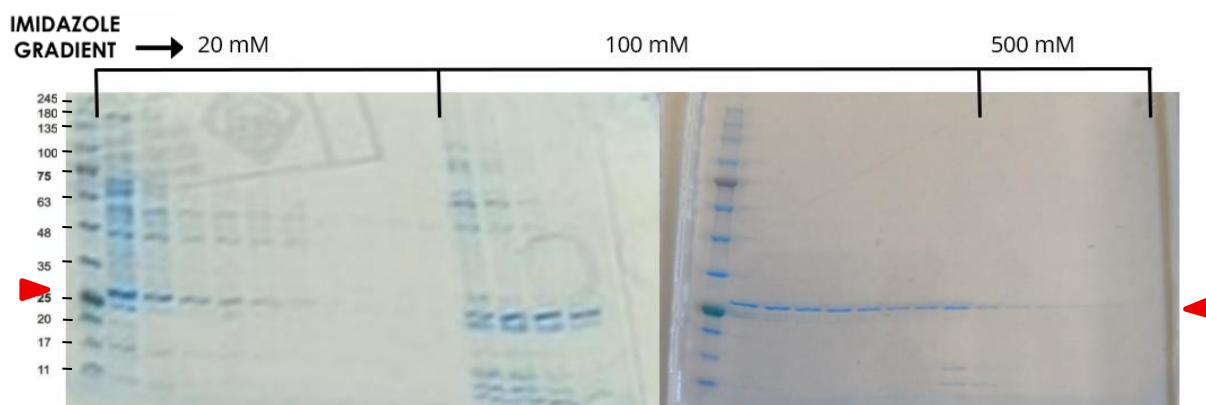


Figura 13. Análisis con tinción de azul de Coomassie de las proteínas de las fracciones de elución recogidas con el primer gradiente de imidazol. Se muestra el patrón de migración de proteínas según su peso molecular tras el gradiente de imidazol a 20, 100 y 500 mM, según se indica. Señalada con la flecha roja se encuentra la proteína de interés.

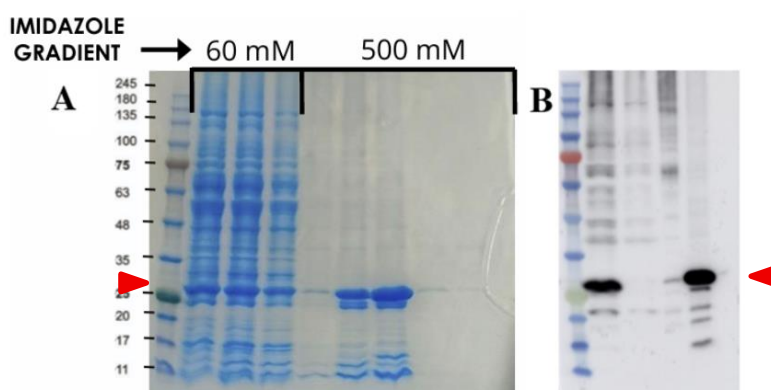


Figura 14. Análisis con tinción de azul de Coomassie e inmunoblot de las proteínas de las fracciones de elución recogidas con el segundo gradiente de imidazol. A. Se muestra el patrón de migración de proteínas según su peso molecular tras el gradiente de imidazol a 60 y 500 mM, según se indica. Señalada con la flecha roja se encuentra la proteína de interés. B. Inmunoblot de la proteína purificada usando un anticuerpo anti-HisTag de ratón, seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa y revelado mediante ECL.

4.2. PRODUCCIÓN DE GRNLY CON *Pichia pastoris* Y PURIFICACIÓN

La granulisina se produjo en la levadura *Pichia pastoris*, como se describe en los artículos previos del grupo [66][67]. Tras la incubación del sobrenadante del cultivo con la resina de níquel, se procedió a su elución usando un gradiente de imidazol con concentraciones de 150 mM (lavado) y 500 mM (elución). Tras el lavado con 150 mM de imidazol, se eliminaron eficazmente las proteínas contaminantes, y la elución con 500 mM permitió obtener una banda única e intensa, correspondiente a la granulisina (Figura 15).

La proteína se obtuvo con un alto grado de pureza y a una concentración considerable, lo que indicó que el protocolo es eficaz y permitió recuperar una buena cantidad de proteína funcional en una sola elución.

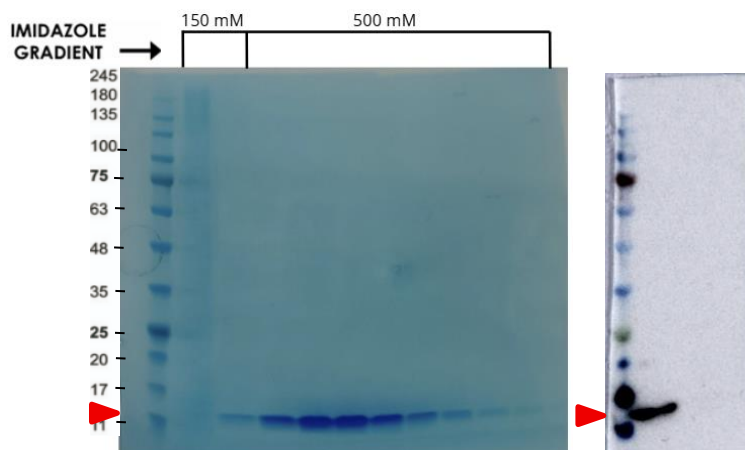


Figura 15. Análisis de Inmunoblot y con tinción de azul de Coomassie de las proteínas de las fracciones de elución recogidas. A. Se muestra el patrón de migración de proteínas según su peso molecular tras el gradiente de imidazol a 150 y 500 mM, según se indica. B. Inmunoblot de la proteína purificada usando un anticuerpo anti-HisTag de ratón, seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa y revelado mediante ECL. Señalada con flecha roja se encuentra la banda de la proteína de interés.

4.3. UNIÓN DE scFv-5E5 A LINEAS CELULARES TUMORALES

En este primer ensayo se utilizaron dos líneas celulares diferentes: MDA-MB-231 y JURKAT, seleccionadas por considerarse como control negativo y positivo, respectivamente, para la expresión del antígeno MUC1/Tn, de acuerdo con estudios preclínicos previos que emplearon estas líneas en estrategias similares basadas en granulicina [64] (**Figura 16**).

La línea celular MDA-MB-231 es derivada de un adenocarcinoma mamario humano, correspondiente a un cáncer de mama en etapa avanzada, y se empleó como control negativo, como se ha comentado. Por otro lado, la línea JURKAT, derivada de una leucemia aguda de linfocitos T humanos, se utilizó como control positivo.

En las células MDA-MB-231, que no expresan el antígeno Tn, no se detecta señal y el histograma correspondiente a la intensidad media de fluorescencia no se desplaza a la derecha con respecto al control. Lo que indica una ausencia de unión inespecífica por parte de la proteína. Esto permitió confirmar que el sistema experimental presenta un bajo ruido de fondo y que la proteína no se adhiere de forma no específica a células negativas para el antígeno.

Por el contrario, en la línea JURKAT, que sí expresa el antígeno Tn, se observa una señal clara y definida en el canal APC tras el marcaje con anti-His y anticuerpo

secundario, confirmando una unión específica y eficaz del scFv-5E5 a su antígeno tumoral Tn.

Estos resultados validan la funcionalidad de la proteína recombinante y respaldan su uso como herramienta de direccionamiento específico frente a células tumorales que expresan el antígeno Tn.

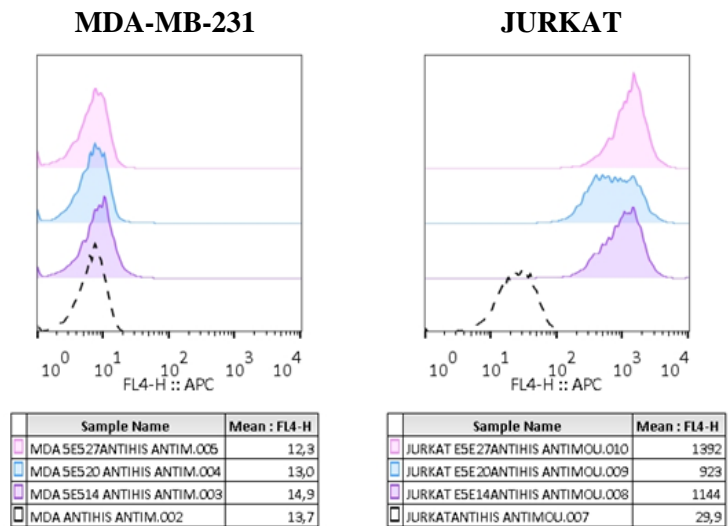


Figura 16. Estudio de unión de scFv-5E5 con dos líneas celulares tumorales. Se añadió la proteína scFv-5E5 purificada, se dejó durante 30 minutos a 4°C, seguido de un anticuerpo anti-HisTag de ratón y de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con APC y se analizó la fluorescencia unida a las células por citometría de flujo. Se usaron 3 batch diferentes de scFv-5E5: 14, 20 y 27, en orden ascendente en la gráfica, morado, azul y rosa, respectivamente. El control negativo (histograma discontinuo) corresponde a las células marcadas de igual manera, pero en ausencia del scFv-5E5.

Tras validar la especificidad de la proteína scFv-5E5 con los controles positivo (JURKAT) y negativo (MDA-MB-231), se amplió el estudio a un total de once líneas celulares tumorales con el objetivo de determinar cuáles expresaban el antígeno MUC1/Tn y en qué medida: MDA-MB-231, JURKAT, H929, Capan-2, A549, Caco-2, HeLa, MCF7, HCT116, MIA PaCa-2, HT29, MKN45 (**Figura 17**).

En este ensayo se observa una variabilidad en los niveles de unión del scFv-5E5 entre las distintas líneas celulares. Algunas muestran señal y desplazamiento hacia la derecha en el canal APC, lo que sugiere expresión del antígeno MUC1/Tn en su superficie, mientras que otras presentan una señal baja o prácticamente ausente, indicando una escasa o nula expresión de dicho marcador.

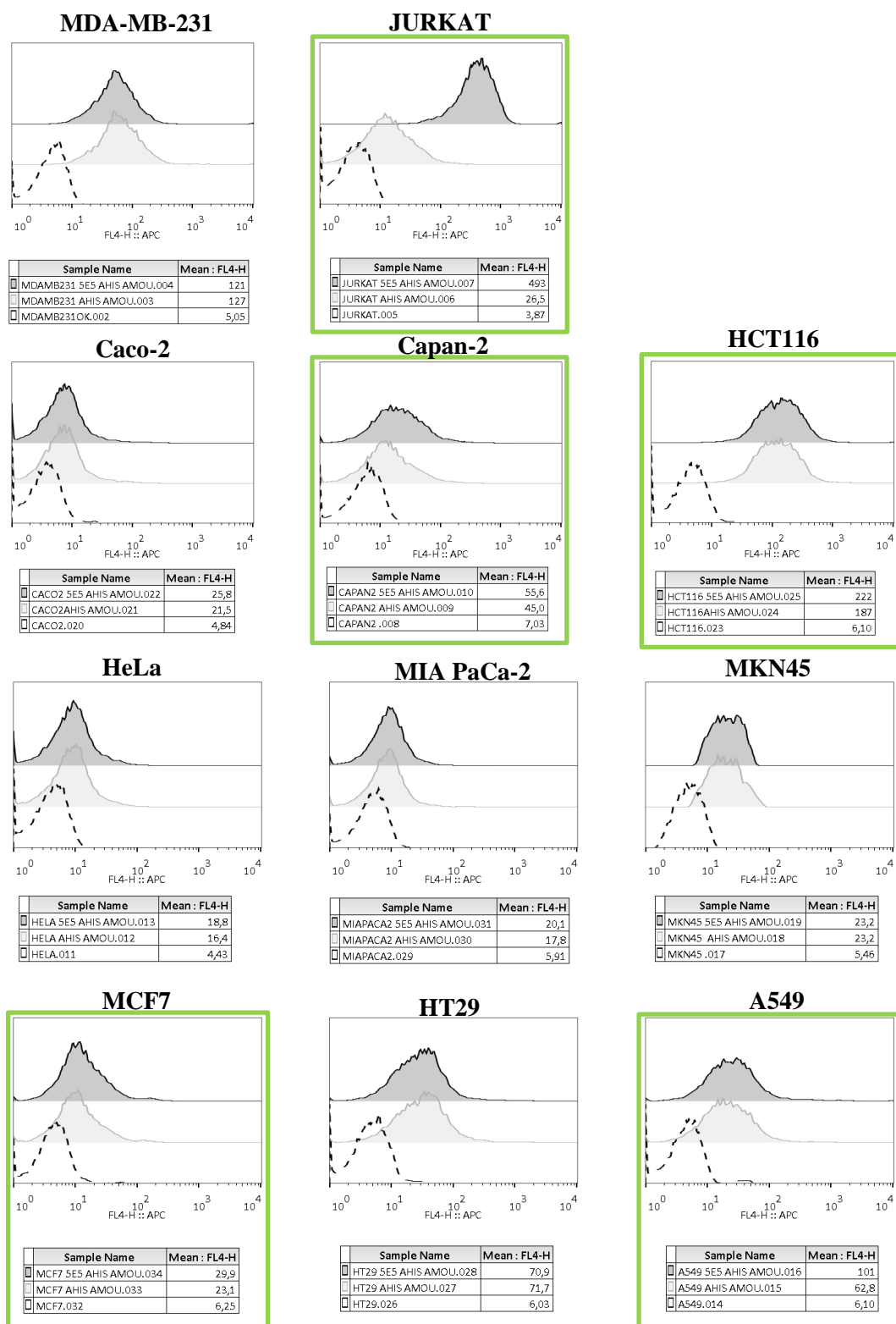


Figura 17. Estudio de unión de scFv-5E5 con once líneas celulares tumorales. MDA-MB-231 y JURKAT como controles negativo y positivo, respectivamente. En cada gráfica hay un control basal con sólo células (curva con líneas discontinuas), control negativo con los anticuerpos anti-HisTag y anti-IgG de ratón conjugado con APC (gris claro) y células incubadas con scFv-5E5 (gris oscuro). Encuadrados de verde se muestran las líneas celulares tumorales que presentan un cierto nivel de expresión del antígeno MUC1/Tn.

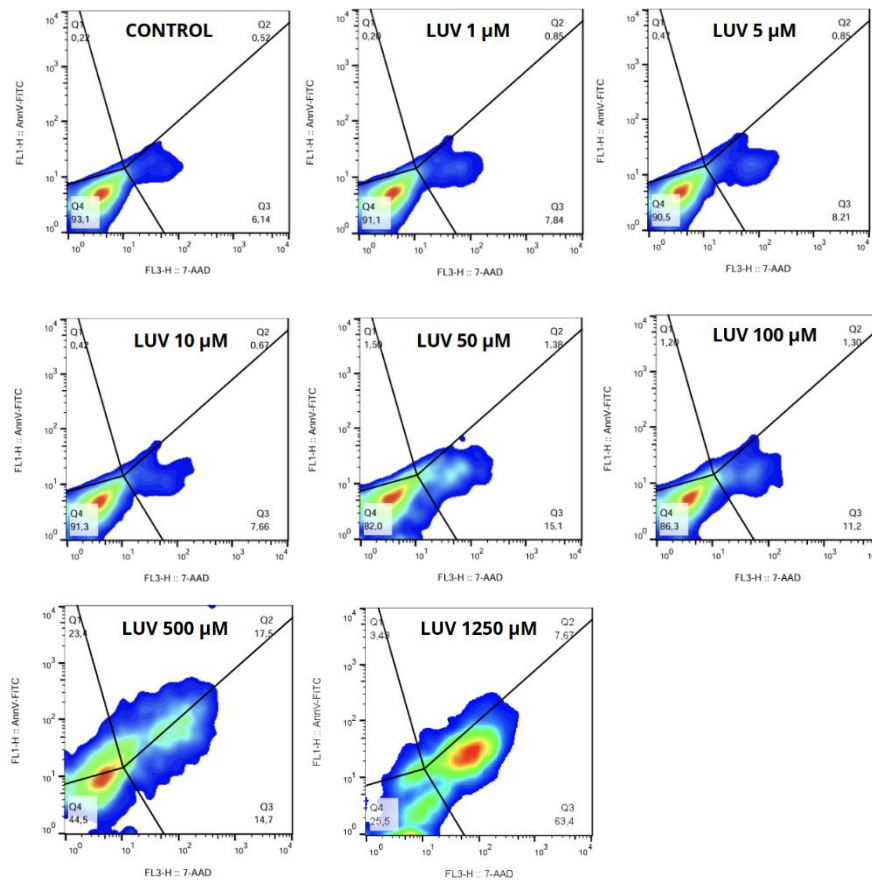
Estos resultados permitieron identificar qué líneas celulares eran más adecuadas para futuros ensayos funcionales con tratamientos dirigidos contra el antígeno MUC1/Tn. Además, sirvieron como criterio de selección para el modelo *in vivo* en ratones de mis directoras del Trabajo Fin de Máster, ya que ayudaron a determinar qué líneas celulares podrían ser inyectadas en los ratones para evaluar la eficacia terapéutica de los inmunoliposomas funcionalizados.

Las líneas celulares que muestran cierto desplazamiento, aparte del control positivo con JURKAT, son el adenocarcinoma de páncreas Capan-2 (22%), el carcinoma de mama MCF7 (28%), el carcinoma de pulmón A549 (40%) y el carcinoma de colon HCT116 (16%), confirmando la expresión del antígeno MUC1/Tn en múltiples tipos de tumores sólidos.

4.4. DOSIS-RESPUESTA DE LUVs SOBRE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL JURKAT

Como parte del control experimental, se evaluó la citotoxicidad basal de los LUVs no conjugados en la línea celular JURKAT mediante un ensayo de dosis-respuesta. Para ello, se probaron distintas concentraciones, de 0.1 μM a 1.25 mM (**Figura 18**). Se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo tras 24 horas de incubación. Los resultados muestran una alta citotoxicidad a las concentraciones más elevadas, 1250 y 500 μM , donde se observa una gran reducción en la viabilidad celular. Esto indica que, a dosis muy altas, los LUVs por sí solos pueden tener efectos tóxicos, lo cual no es deseable, ya que deberían actuar como vehículos biocompatibles sin actividad propia.

A partir de 100 μM y a concentraciones inferiores, la toxicidad descendió de forma clara, alcanzando niveles similares al control no tratado en las dosis más bajas ($\leq 10 \mu\text{M}$). Estos datos ayudan a definir el rango de concentraciones seguras de LUVs para futuros ensayos funcionales con las proteínas conjugadas, asegurando que cualquier efecto observado se deba a la actividad del tratamiento y no al nanoliposoma en sí.



JURKAT

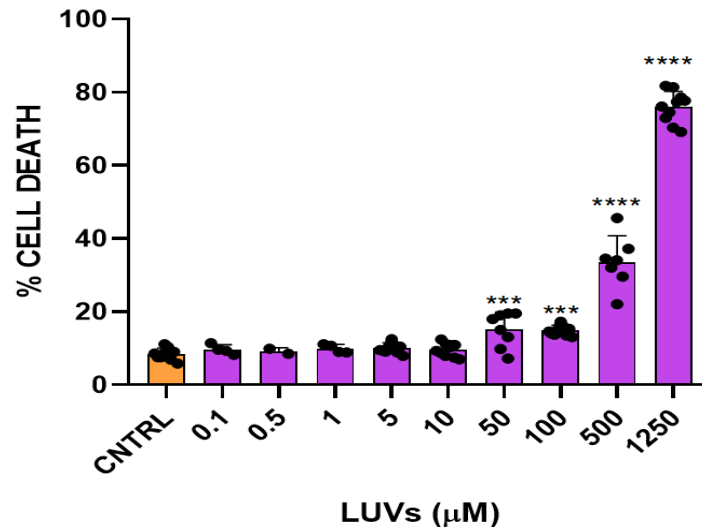


Figura 18. Dosis-respuesta de LUVs no conjugados sobre células JURKAT. A. Se sembraron 30000 células por pocillo y se incubaron con las concentraciones de LUVs indicadas durante 24 horas. Tras la incubación se determinó la muerte celular por tinción con 7-AAD (FL3H; eje de las x) y AnexinaV-FITC (FL1H; eje de las y). B. Cuantificación del porcentaje de muerte de las células JURKAT inducida por las diferentes concentraciones de LUVs. Se muestra como diagrama de barras los resultados del experimento. Los resultados se expresan como % de muerte celular (suma de los cuadrantes Q1, Q2 y Q3) y son la media \pm SD de tres determinaciones diferentes en el mismo experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales indicadas (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de tres muestras independientes analizadas por duplicado.

Las concentraciones más altas (1250 y 500 μM) provocan un aumento significativo en la muerte celular, probablemente debido a efectos inespecíficos como alteraciones en la membrana plasmática, agregación lipídica o interferencias en el equilibrio osmótico celular, fenómenos que han sido descritos previamente en formulaciones liposomales con carga superficial no neutra o en exceso de vesículas en otros estudios [69], donde observaron que ciertas composiciones o concentraciones podían inducir efectos citotóxicos no deseados.

Sin embargo, a partir de 100 μM , la toxicidad disminuye notablemente. Este comportamiento permite establecer un rango seguro en el que los LUVs no ejercen efectos tóxicos por sí mismos.

4.5. UNIÓN DE GRNLY Y scFv-5E5 A LOS LUV

Se realizaron titulaciones mezclando las proteínas junto con los LUVs resuspendidos en PBS en eppendorf de 1.5 mL a concentraciones de proteína: 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 μM (**Figura 19**). Se incubaron a 800 rpm y 37°C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron en Microfuge 22R Centrifuge (*Beckman Coulter, California, EE. UU.*) a 14000 rpm y 4°C durante 5 horas. Una vez pasado el tiempo de centrifugación se recogieron 30 μL del sobrenadante (SN) y se incorporaron a otro eppendorf. En los eppendorf con el pellet se resuspendieron con 30 μL de PBS. Finalmente, se realizó una electroforesis con las muestras y se analizaron por inmunoblot usando anticuerpos anti-HisTag.

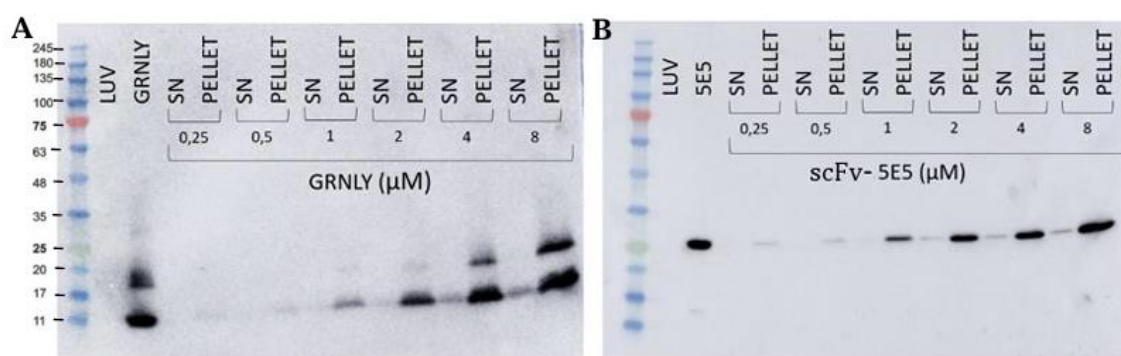


Figura 19. Titulaciones de A. GRNLY y B. scFv-5E5 con los nanoliposomas. Las proteínas GRNLY (A) o scFv-5E5 (B) se incubaron a las concentraciones señaladas con LUVs. Tras la incubación se separaron los LUVs (pellet) del sobrenadante (SN) por centrifugación y posteriormente se analizó la presencia de las proteínas en ambas fracciones por inmunoblot usando un anticuerpo anti-HisTag.

La granulicina se incorpora correctamente a los nanoliposomas, como lo demuestra su presencia en la fracción del pellet tras la centrifugación. A las concentraciones más altas, se observa la presencia de granulicina en el sobrenadante, lo que sugiere una posible saturación. Sin embargo, en todas las concentraciones se sigue observando una mayor cantidad de proteína en el pellet cuando se aumenta la concentración. Se observa una posible formación de dímeros de granulicina ya que parte de la proteína parece migrar con un tamaño aparentemente mayor del esperado de 9 kDa.

En el caso de scFv-5E5 se observa una saturación similar. La proteína se incorpora eficazmente a los nanoliposomas con la mayor parte de la proteína retenida en la fracción de pellet tras la centrifugación. Se observa una presencia mínima de proteína en el sobrenadante a las concentraciones más altas, lo cual sugiere una cierta saturación, pero la cantidad de proteína asociada a los LUV sigue aumentando a medida que se aumenta su concentración.

Teniendo en cuenta estos datos de asociación de proteínas con los LUV y de saturación, se eligió para el resto de los ensayos generar LUV con una concentración de 4 μ M de scFv-5E5 y de 4 y 8 μ M de GRNLY.

4.6. UNIÓN DE LOS INMUNOLIPOSOMAS A LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Seguidamente, se evaluó la capacidad de unión de los inmunoliposomas funcionalizados con GRNLY, scFv-5E5, y ambos, a dos líneas celulares tumorales: MDA-MB-231 (negativa para el antígeno Tn) y JURKAT (positiva para Tn). Además, se realizaron ensayos de competición para comprobar la especificidad de la unión mediada por el scFv-5E5, así como comprobación de la unión de la GRNLY a las membranas celulares ya que este es su mecanismo de acción [33][44].

En las células MD-MB-231 la unión de scFv-5E5 o de los liposomas que contenían scFv-5E5 fue residual (**Figura 20 A**, panel derecho). Sin embargo, la GRNLY sí que se une a sus membranas (**Figura 20 A**, panel izquierdo) de forma que la unión de liposomas que contienen solamente GRNLY o de los que contienen scFv-5E5-GRNLY ha de ser atribuida a la GRNLY (**Figura 20 A**).

En las células JURKAT, al contrario, scFv-5E5 da una señal elevadísima, ya sea en solitario o asociado a los LUV, demostrando la elevada expresión de este antígeno en las células JURKAT (**Figura 20 B**, panel derecho). Además, esto demuestra que el anticuerpo scFv-5E5 sigue reconociendo a su antígeno cuando está asociado a los liposomas. La GRNLY también se une a las membranas de las células JURKAT (**Figura 20 B**, panel izquierdo), pero esta unión se ve aumentada cuando se usa un liposoma que lleva asociado tanto a la GRNLY como a scFv-5E5.

Finalmente, se realizó un ensayo de competición sobre células incubadas previamente con scFv-5E5. En el caso de las células MDA-MB-231, la unión de scFv-5E5 es residual y solamente se observa unión de liposomas que contengan GRNLY (**Figura 21**). En el caso de las células JURKAT, la competición de scFv-5E5 con los liposomas LUV-scFv-5E5 o con los LUV-GRNLY-scFv-5E5 produce una disminución acusada del marcaje, de alrededor del 90%, indicando que el scFv-5E5 unido a los liposomas sigue siendo funcional y desplaza a scFv-5E5 (**Figura 21**).

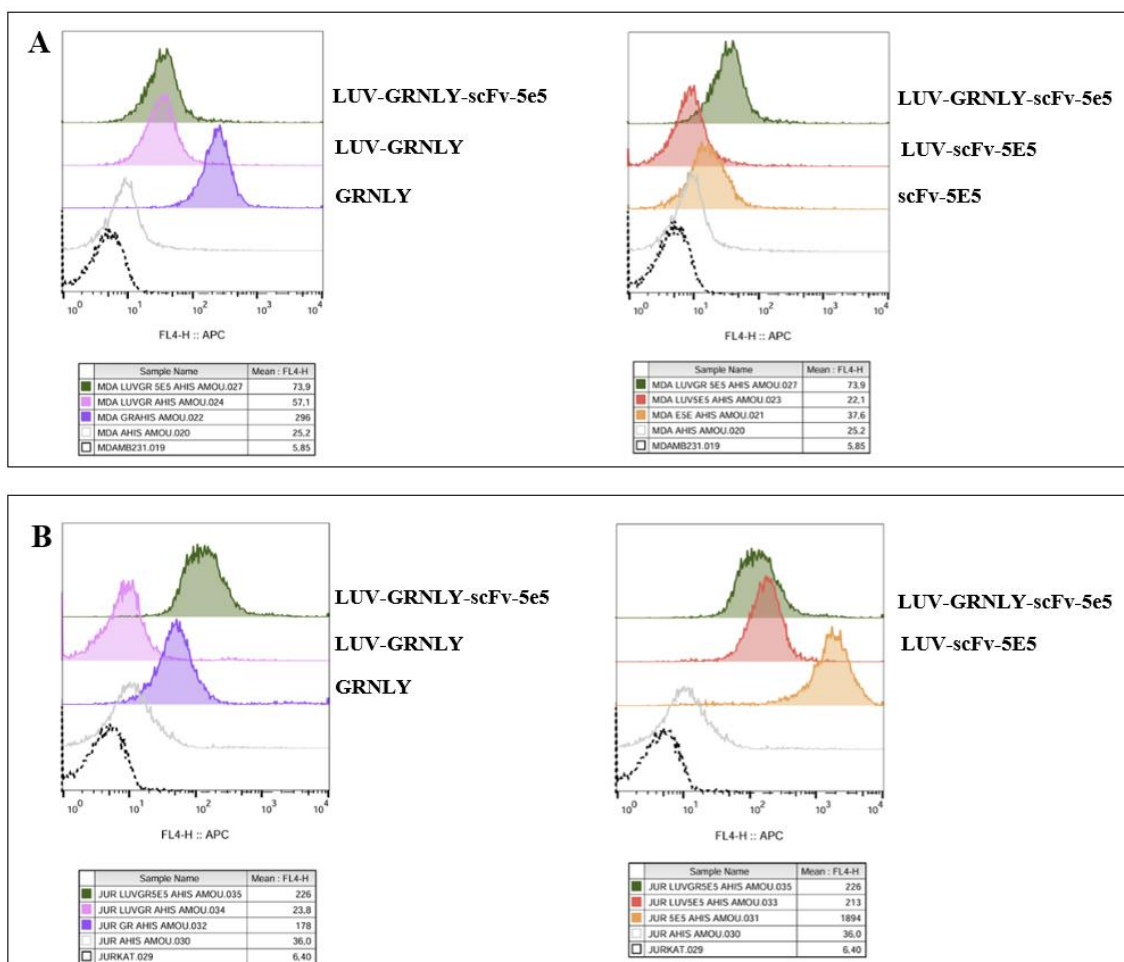


Figura 20. Estudio de unión de los inmunoliposomas a dos líneas celulares tumorales. Se añadieron las proteínas purificadas, scFv-5E5 y GRNLY, y los inmunoliposomas en las células **A. MDA-MD-231** y **B. JURKAT**, se dejó durante 30 minutos a 4°C, seguido de un anticuerpo anti-HisTag de ratón y de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con APC y se analizó la fluorescencia unida a las células por citometría de flujo. El control negativo (histograma discontinuo) corresponde a las células marcadas de igual manera, pero en ausencia de las proteínas y de los inmunoliposomas.

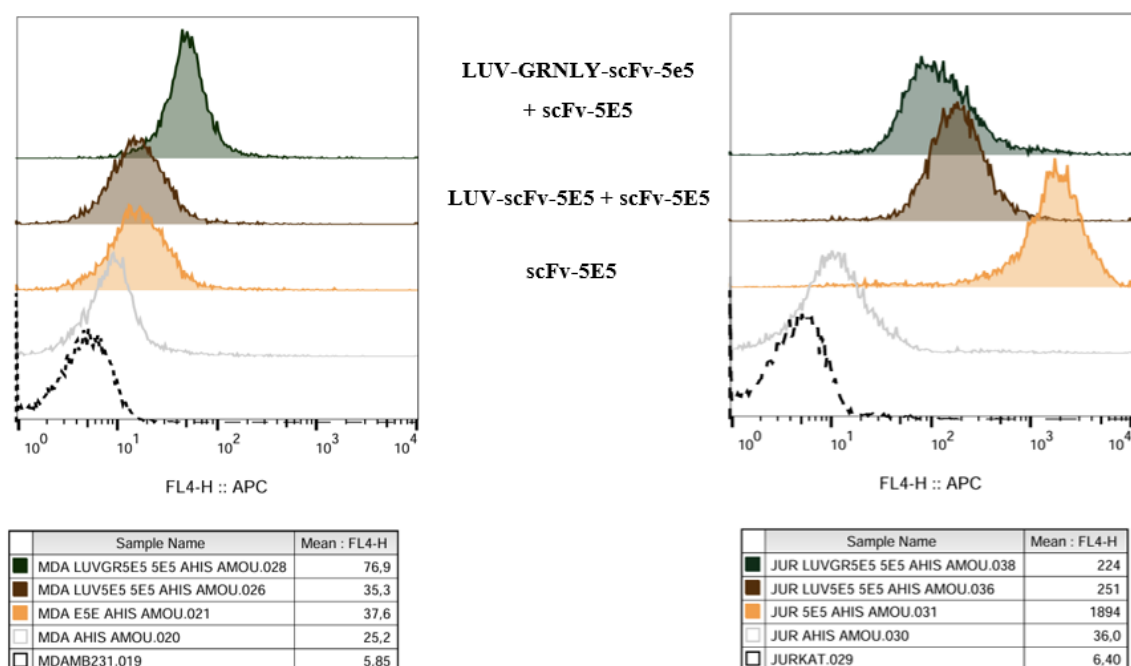


Figura 21. Estudio de competición de scFv-5E5 con los inmunoliposomas a dos líneas celulares tumorales. Se añadieron en primer lugar los inmunoliposomas en las células **A.** MDA-MD-231 y **B.** JURKAT, y, en segundo lugar, se añadió la proteína scFv-5E5 purificada, se dejó durante 30 minutos a 4°C, seguido de un anticuerpo anti-HisTag de ratón y de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con APC y se analizó la fluorescencia unida a las células por citometría de flujo. El control negativo (histograma discontinuo) corresponde a las células marcadas de igual manera, pero en ausencia de las proteínas y de los inmunoliposomas.

Estos resultados confirman que el sistema liposomal diseñado presenta una unión altamente específica hacia células tumorales que expresan el antígeno Tn, gracias a la funcionalización con scFv-5E5. La baja unión observada en la línea negativa MDA-MB-231 demuestra que no existe interacción inespecífica del inmunoliposoma, mientras que la competencia con la proteína libre valida que la unión observada en JURKAT depende en gran medida de la interacción dirigida del anticuerpo.

4.7. CITOTOXICIDAD DE LOS INMUNOLIPOSOMAS CONTRA LINEAS CELULARES TUMORALES

Se evaluó la eficacia citotóxica de los inmunoliposomas frente a las líneas celulares tumorales de adenocarcinoma de páncreas, Capan-2 y del carcinoma de pulmón, A549. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C con las proteínas scFv-5E5 y GRNLY individualmente, o en combinación en los inmunoliposomas, en concentraciones de 1 y 2 μ M y de 2 y 4 μ M, respectivamente (**Figura 22**). Tras las incubaciones, se trataron con tripsina para separar las células del fondo y se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo utilizando doble marcaje con AnexinaV-FITC y 7-AAD, lo que permitió distinguir entre apoptosis temprana, apoptosis tardía/necrosis y células viables.

En las células CAPAN-2, los resultados muestran un claro efecto dosis-dependiente en los tratamientos con GRNLY, tanto en su forma libre como vehiculizada. Los LUVs-GRNLY a estas mismas concentraciones también muestran un efecto citotóxico, aunque no parece superior al de la proteína libre. Curiosamente, la combinación de 5E5 + GRNLY, tanto libre como en LUVs, produce niveles más altos de citotoxicidad. En cualquier caso, la citotoxicidad se obtuvo con la concentración más elevada de GRNLY unida a los LUV junto con scFv-5E5. Por otra parte, los LUV con GRNLY 2 μ M y scFv-5E5 1 μ M son significativamente más citotóxicos que los LUV con GRNLY 2 μ M, sugiriendo una cierta mejora al direccionar los LUV con el anticuerpo (**Figura 22, A**).

En la línea A549, aunque la citotoxicidad es menor en comparación con las células CAPAN-2, los LUVs funcionalizados presentan una clara tendencia al aumento de la citotoxicidad en comparación con las proteínas libres. En los liposomas combinados con GRNLY 4 μ M + 5E5 2 μ M se observa un claro aumento de la citotoxicidad, que también es mayor que el ejercido por la GRNLY asociada en solitario a los liposomas, demostrando una mayor eficacia de los LUVs funcionalizados (**Figura 22, B**).

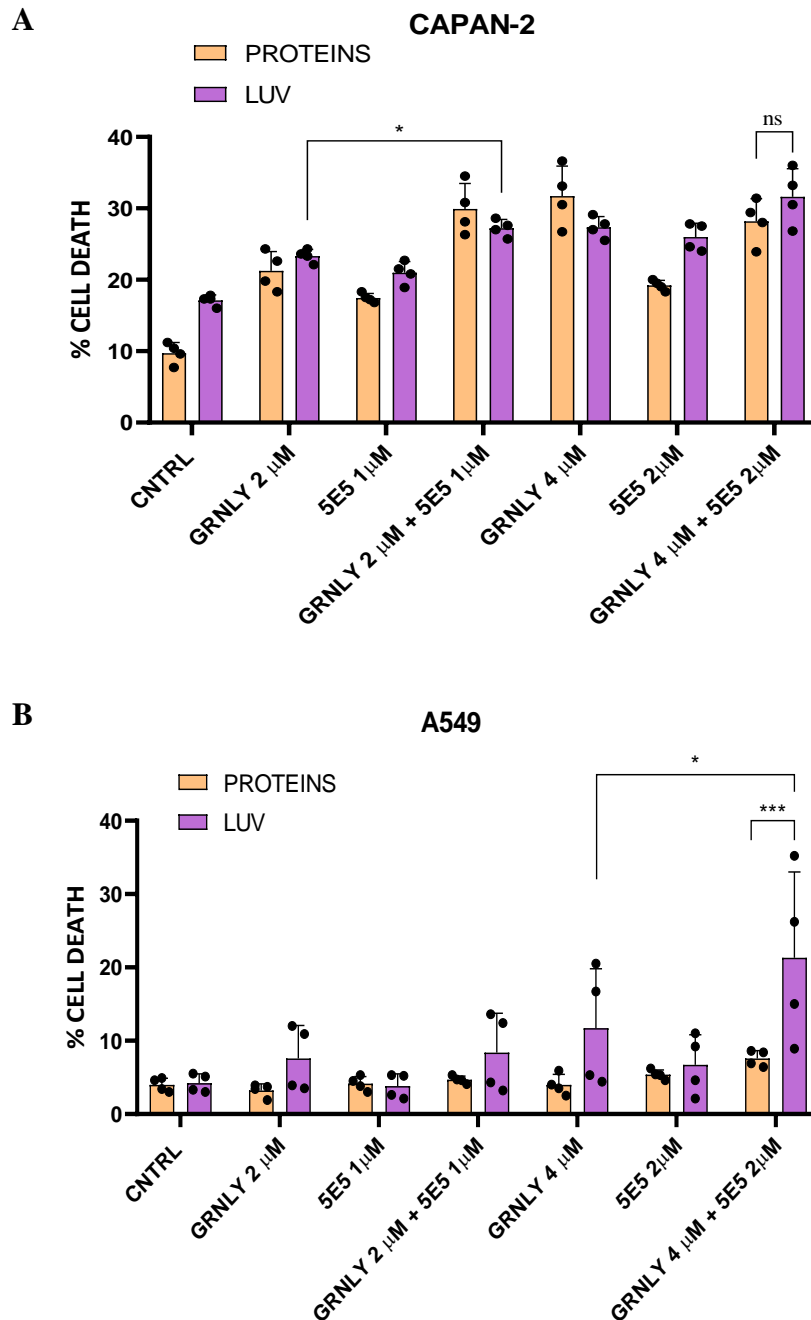


Figura 22. Cuantificación del porcentaje de muerte de las células tumorales inducida por las diferentes concentraciones de scFv-5E5 y GRNLY y de los liposomas conjugados. Se sembraron 20000 células CAPAN-2 (A) o A549 (B) por pocillo y se añadieron las proteínas purificadas, scFv-5E5 y GRNLY, solas o en combinación, a las concentraciones indicadas, en fase soluble (barras naranja) o asociadas a los LUVs (barras violeta). Se dejaron 24 horas a 37°C, se separaron del fondo con tripsina y tras la incubación se determinó la muerte celular por tinción con 7-AAD y AnexinaV-FITC. Se muestra como diagrama de barras los resultados del experimento. Los resultados se expresan como porcentaje de muerte celular y son la media \pm SD de dos experimentos independientes analizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales indicadas (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de los datos de dos muestras independientes analizadas por duplicado.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido analizar el comportamiento de las proteínas recombinantes scFv-5E5 y granulicina, así como su funcionalización en sistemas liposomales. En primer lugar, se ha comprobado que el uso del tampón TES (Tris, EDTA y sacarosa) en la lisis de *Escherichia coli* favorece una mejor purificación del scFv-5E5 y menor cantidad de proteínas indeseadas en las fracciones purificadas, ya que se obtiene mayor concentración y pureza de la proteína.

Se ha evaluado la funcionalización de liposomas mediante la conjugación individual o combinada de scFv-5E5 y granulicina. La conjugación es eficiente en concentraciones iguales o inferiores a 8 μ M y permite mantener la estabilidad del sistema. Los ensayos de unión a células han demostrado que los liposomas funcionalizados con scFv-5E5 presentan especificidad hacia células que expresan el antígeno MUC1/Tn (JURKAT, Capan-2, A549, MCF7), sin mostrar afinidad por células negativas como MDA-MB-231, lo cual respalda la eficacia del sistema de direccionamiento.

Los estudios de citotoxicidad muestran que la funcionalización con granulicina confiere actividad lítica a los liposomas, y que esta actividad se incrementa cuando se combina con el scFv-5E5. Se ha observado en experimentos in vitro que los LUV con GRNLY y scFv-5E5 son más citotóxicos que los LUV con GRNLY en solitario sobre las células de adenocarcinoma de páncreas Capan-2 y sobre las células de carcinoma de pulmón A549. Estos resultados sugieren efecto mejorado al combinar ambas proteínas y una cierta mejora al direccionar los LUV funcionalizados.

En conjunto, la funcionalización selectiva de liposomas con scFv-5E5 y granulicina ha mostrado resultados positivos en cuanto a especificidad de unión y eficacia citotóxica en células diana, al menos in vitro, y se espera poder confirmar estos resultados en ensayos preclínicos in vivo.

5. CONCLUSIONES

- La purificación del anticuerpo scFv-5E5 ha resultado más eficaz con el protocolo basado en tampón TES, en comparación con el método por sonicación.
- Los fragmentos scFv-5E5 se unen con éxito a su antígeno Tn, como se ha podido comprobar en los ensayos de unión donde mostró una unión específica a distintas líneas celulares tumorales que expresan este antígeno, como JURKAT o Capan-2.
- Se ha confirmado que tanto scFv-5E5 como GRNLY pueden unirse eficazmente a los LUVs a concentraciones iguales o inferiores a 8 μ M, lo que demuestra la viabilidad del proceso de conjugación y la estabilidad de las proteínas en el sistema liposomal.
- Los ensayos *in vitro* evidenciaron que los LUVs funcionalizados con scFv-5E5 o GRNLY-scFv-5E5 presentan afinidad específica hacia células tumorales que expresan el antígeno Tn.
- En ensayos de citotoxicidad se ha visto que los LUVs funcionalizados inducen un mayor porcentaje de muerte celular en comparación con las proteínas en solución.

6. CONCLUSIONS

- The purification of the scFv-5E5 antibody was more effective using the TES buffer-based protocol compared to the sonication method.
- The scFv-5E5 fragments successfully bind to their Tn antigen, as demonstrated in binding assays where specific interaction was observed with various tumor cell lines expressing this antigen, such as JURKAT or Capan-2.
- It was confirmed that both scFv-5E5 and GRNLY effectively bind to LUVs at concentrations equal to or lower than 8 μ M, demonstrating the feasibility of the conjugation process and the stability of the proteins within the liposomal system.
- *In vitro* assays showed that LUVs functionalized with scFv-5E5, or GRNLY-scFv-5E5 display specific affinity toward tumor cells expressing the Tn antigen.
- In cytotoxicity assays, functionalized LUVs induced a higher percentage of cell death compared to proteins in solution.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunología celular y molecular. 10ª ed. Barcelona: *Elsevier*. 2022
3. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015;27(4):450–461
4. June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med.* 2018;379(1):64–73
5. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol.* 2014;192(12):5451–5458
6. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines.* 2019;4:7
7. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet.* 2009;373(9668):1033–1040
8. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2021;124(2):359–367
9. Zhang Z, et al. Efficacy of CTLA-4 checkpoint therapy is dependent on IL-21 signaling to mediate cytotoxic reprogramming of PD-1⁺CD8⁺ T cells. *Nat Immunol.* 2025;25(1):85–96
10. Li F, et al. The association between CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and the clinical outcome of cancer immunotherapy: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2021;41:101134
11. Lin, Y., Song, Y., Zhang, Y. et al. New insights on anti-tumor immunity of CD8⁺ T cells: cancer stem cells, tumor immune microenvironment and immunotherapy. *J Transl Med.* 2025;23(1):123
12. Kumar S, Singh SK, Rana B, Rana A. Tumor-infiltrating CD8⁺ T cell antitumor efficacy and exhaustion: molecular insights. *Drug Discov Today.* 2021;26(3):693–703
13. Huang S, Qin Z, Wang F, Kang Y, Ren B. A potential mechanism of tumor immune escape: Regulation and application of soluble natural killer group 2 member D ligands (Review). *Oncol Rep.* 2024;41(5):2235–2245
14. Mohamed JS, et al. Natural killer cell-mediated immune surveillance in cancer: Role of tumor microenvironment. *Pathology - Research and Practice.* 2024;220:154567
15. Meza Guzman LG, Keating N, Nicholson SE. Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):952
16. Cornel AM, Mimpfen IL, Nierkens S. MHC Class I Downregulation in Cancer: Underlying Mechanisms and Potential Targets for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1760
17. Groh V, et al. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) shedding modulates immune surveillance. *Br J Cancer.* 2017;116(4):511–520
18. Li F, Liu S. Focusing on NK cells and ADCC: A promising immunotherapy approach for HER2-positive breast cancer. *Front Immunol.* 2022;13:123456

19. Laskowski TJ, Biederstädt A, Rezvani K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2022;22(1):557–572
20. Zhang M, et al. IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(46):E10824–E10833
21. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann KW, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):1969–1974
22. Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):S61–S70
23. Anel A, Gallego-Lleyda A, de Miguel D, Naval J, Martínez-Lostao L. Role of Exosomes in the Regulation of T-cell Mediated Immune Responses and in Autoimmune Disease. *Cells*. 2019;8(2):154
24. Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis y el sistema inmunitario. *British Medical Bulletin*. 1997;53(3):591–603
25. Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:781–828
26. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516
27. Schworer SA, Smirnova II, Kurbatova I, Bagina U, Churova M, Fowler T, et al. Toll-like receptor mediated down-regulation of the deubiquitinase cylindromatosis (CYLD) protects macrophages from necroptosis in wild-derived mice. *J Biol Chem*. 2014;289(24):16894–16906
28. O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2008;18(6):572–585
29. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M. et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2016;23(8):1421–1430
30. Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M, Cocca C, Martín G, Cricco G et al. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell*. 2005;29(2):149–161
31. Lavrik, I., Krammer, P. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):36–41
32. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H, FADD/MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2. *Immunity*. 2000;12(6):599–609
33. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5047–5056
34. Pardo, J., et al. Granzyme B-induced cell death. *Immunological Reviews*. 2009;231(1):68–78
35. Trapani, JA, & Smyth, MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(10):735–747
36. Anel A, Gamen S, Alava MA, Schmitt-Verhulst AM, Piñeiro A, Naval J. Inhibition of CPP32-like proteases prevents granzyme B- and Fas-, but not granzyme A-based cytotoxicity exerted by CTL clones. *J Immunol*. 1997; 159(9): 4686–4696

37. Barman H, Walch M, Latinovic-Golic S, Dumrese C, Dolder M, Groscurth P, Ziegler U. Cholesterol in negatively charged lipid bilayers modulates the effect of the antimicrobial protein granulysin. *J Membr Biol*. 2006; 212(1): 29–39
38. Krensky, AM, & Clayberger, C. Granulysin: a novel host defense molecule. *American Journal of Transplantation*. 2009; 9(6): 1295–1301
39. Dotiwala F, Lieberman J. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes. *Curr Opin Immunol*. 2019; 60: 19–26
40. Munford RS, Sheppard PO, O'Hara PJ: Las proteínas similares a la saposina (SAPLIP) desempeñan diversas funciones en una estructura principal común. *Journal of Lipid Research*. 1995; 36(8): 1653–1663
41. Peña SV, Krensky AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol*. 1997;9(2):117–125
42. Barman H, Walch M, Latinovic-Golic S, Dumrese C, Dolder M, Groscurth P, Ziegler U. Cholesterol in negatively charged lipid bilayers modulates the effect of the antimicrobial protein granulysin. *J Membr Biol*. 2006;212(1):29–39
43. Anderson DH, Sawaya MR, Cascio D, Ernst W, Modlin R, Krensky A, Eisenberg D. Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *J Mol Biol*. 2003;325(2):355–365
44. Clayberger C, Krensky AM. Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant*. 2006 ;6(3):462–466
45. Aporta A, Catalán E, Galán-Malo P, Ramírez-Labrada A, Pérez M, Azaceta G, et al. Granulysin induces apoptotic cell death and cleavage of the autophagy regulator Atg5 in human hematological tumors. *Biochem Pharmacol*. 2014;92(2):403–411
46. Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, Sugawara H, Majima T, Kawarabayashi N, et al. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(8):1322–1327
47. Pardo J, Pérez-Galán P, Gamen S, Marzo I, Monleón I, Kaspar AA, Susín SA, Kroemer G, Krensky AM, Naval J, Anel A. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol*. 2001;167(3):1222–1229
48. Ibáñez, R. Inmunotoxina anti-CEA basada en la granulisin como una nueva terapia antitumoral. *Universidad de Zaragoza. Tesis doctoral*. 2021
49. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998;282(5386):121–125
50. Ogawa K, Hirata S, Yamamoto S, et al. Expression of granulysin in cytotoxic lymphocytes is a prognostic factor in colorectal cancer. *Oncology*. 2005;68(2–3):205–213
51. Leko V, Rosenberg SA. Rosenberg, Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based. *Immunotherapy of Solid Tumors*. 2020;38(4):454–472
52. Ju T, Otto VI, Cummings RD. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(8):1770–1791.
53. Guerrero-Ochoa P, Aguilar-Machado D, Ibáñez-Pérez R, Macías-León J, Hurtado-Guerrero R, Raso J, Anel A. Production of a Granulysin-Based, Tn-

- Targeted Cytolytic Immunotoxin Using Pulsed Electric Field Technology. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):8957
54. Verdú, M. MUC1 (Glicoproteína de transmembrana Mucina-1). *Histopat laboratoris*. 2014;11(1):8–14
 55. Posey, AD, Schwab, RD, Boesteanu, AC, Steentoft, C, Mandel, U, Engels, B, & June, CH. Engineered CAR T cells targeting the cancer-associated Tn-glycoform of the membrane mucin MUC1 control adenocarcinoma. *Immunity*. 2016;44(6):1444–1454
 56. Gong Y, Klein Wolterink RGJ, Gulaia V, Cloosen S, Ehlers FAI, Wieten L, Graus YF, Bos GMJ, Germeraad WTV. Defucosylation of Tumor-Specific Humanized Anti-MUC1 Monoclonal Antibody Enhances NK Cell-Mediated Anti-Tumor Cell Cytotoxicity. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5426
 57. Ortega-Galindo AS, Díaz-Peralta L, Galván-Hernández A, Ortega-Blake I, Pérez-Riascos A, Rojas-Aguirre Y. Los liposomas en nanomedicina: del concepto a sus aplicaciones clínicas y tendencias actuales en investigación. *Mundo nano*. 2023;16(1):1–25
 58. Mansoori Agrawal MAM, Jawade S, Khan S, I M. A review on liposome. *Int J Adv Res Pharm Amp Bio Sci*. 2012;2(4):453–464
 59. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:975–999
 60. Soler-Agesta R, Guerrero-Ochoa P, Marco-Brualla J, Ibáñez-Pérez R, Marzo I, Martínez-Lostao L, Anel A. Conjugation of the 9-kDa Isoform of Granulysin with Liposomes Potentiates Its Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):9863
 61. Al-Wasaby S, de Miguel D, Aporta A, Naval J, Conde B, Martínez-Lostao L, Anel A. In vivo potential of recombinant granulysin against human tumors. *Oncoimmunology*. 2015;4(3):e984651
 62. Al-Wasaby S, Guerrero-Ochoa P, Ibáñez-Pérez R, Soler R, Conde B, Martínez-Lostao L, Anel A. In vivo potential of recombinant granulysin against human melanoma. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;28:100415
 63. Ibáñez-Pérez R, et al. Anti-tumoral potential of a human granulysin-based, CEA-targeted immunotoxin. *Oncoimmunology*. 2019;8(7):e1596007
 64. Guerrero-Ochoa P, Ibáñez-Pérez R, Berbegal-Pinilla G, Aguilar D, Marzo I, Corzana F, Minjárez-Sáenz M, Macías-León J, Conde B, Raso J, Hurtado-Guerrero R, Anel A. Preclinical Studies of Granulysin-Based Anti-MUC1-Tn Immunotoxins as a New Antitumoral Treatment. *Biomedicines*. 2022;10(11):2701
 65. Barenholz Y. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012;160(2):117–134
 66. Marco-Brualla J, de Miguel D, Martínez-Lostao L, Anel A. DR5 Up-Regulation Induced by Dichloroacetate Sensitizes Tumor Cells to Lipid Nanoparticles Decorated with TRAIL. *J Clin Med*. 2023;12(2):407
 67. Daly R, Hearn MT. «Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production». *J. Mol. Recognit*. 2005;18(2):119–138
 68. Abyntek Biopharma. *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas [Internet]. Bilbao: *Abyntek Biopharma*. 2024 [citado 2025 may 30]

69. Inglut CT, Sorrin AJ, Kuruppu T, Vig S, Cicalo J, Ahmad H, Huang HC. Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(2):190

