

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 090**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2015 PCT/EP2015/052744**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118167**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2015 E 15703778 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3105319**

54 Título: **Uso de moduladores MCOLN-1 para regular la migración celular**

30 Prioridad:

10.02.2014 EP 14305172

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT CURIE (50.0%)
26, rue d'Ulm
75248 Paris Cedex 05, FR y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LENNON-DUMENIL, ANA-MARIA;
VARGAS, PABLO y
BRETOU, MARINE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 796 090 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de moduladores MCOLN-1 para regular la migración celular

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a al área de la medicina, en particular a la oncología, y a los tratamientos de las enfermedades autoinmunes.

Antecedentes de la invención

10 La activación inmune induce a la activación y a la maduración de las células dendríticas. Las células dendríticas (DC) son una parte del sistema inmune que actúa como células presentadoras de antígeno. Procesan el material antigénico y lo presentan en su superficie celular. El material antigénico puede provenir de organismos microbianos, como los virus o las bacterias, o de los propios antígenos.

Las DC inmaduras se activan después de detectar a un antígeno microbiano. La proteína antigénica es degradada por las DC y los fragmentos se presentan en su superficie junto con moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC). Tras la activación, las DC migran a los ganglios linfáticos y presentan estos antígenos a los linfocitos T. Este es el primer paso de la respuesta inmune adaptativa.

15 La inmunoterapia contra el cáncer tiene como objetivo provocar una respuesta inmune dirigida contra antígenos tumorales. Un enfoque consiste en la vacunación mediante la provisión de un antígeno junto con un adyuvante para estimular la generación de células T terapéuticas in vivo. Las DC se han utilizado en este contexto debido a sus altas propiedades de generación de antígenos, lo que las convierte en agentes naturales apropiados para la administración de antígenos asociados a tumores. En particular, las DC generadas ex vivo pueden cargarse con antígenos y volverse a infundir en el paciente. Alternativamente, los antígenos pueden reconocer las DC in vivo sin necesidad de manipulaciones celulares ex vivo. (Palucka y Bachereau, Nat Rev Cancer, 2012, 12, 265; Tacke et al., Nat Rev Immunol, 2007, 7, 790). Sin embargo, una limitación es que las DC inyectadas en los pacientes migran de manera ineficiente a los órganos linfoides, un proceso requerido para desencadenar la inmunidad antitumoral.

25 Las DC tienen varias funciones en los procesos de inmunidad innata y adaptativa. En particular, hay cada vez más pruebas de que las DC inducen cierta falta de respuesta o tolerancia específica del antígeno en los órganos linfoides centrales y en la periferia. En particular, las DC inmaduras inducen una determinada tolerancia a través de la eliminación de células T o induciendo la expansión de células T reguladoras y / o supresoras. En consecuencia, tienen propiedades tolerogénicas que pueden usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la diabetes, la artritis y la miocarditis autoinmune (Steinman et al., Annu. Rev. Immunol., 2003, 21, 685-711; Xiao et al., J. Immunother., 2006, 29, 465-471; van Duivenvoorde et al., J. Immunol., 2007, 1506-1515; Valaperti et al., Vaccine, 2013, 31, 4802-4811; Tbarozzi et al., Clin. Exp. Immunol., 2012, 171, 135-146). Por lo tanto, en este contexto, podría ser ventajoso mejorar la migración de DC a los ganglios linfáticos, en particular la migración de DC inmaduras.

Las DC no son las únicas células para las cuales la migración es esencial. De hecho, la migración celular es un proceso central para el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y la metástasis.

35 La comprensión del mecanismo por el cual las células migran puede conducir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para controlar, por ejemplo, las células tumorales invasivas. Por ejemplo, la invasión al sistema linfático permite el transporte de células tumorales a los ganglios linfáticos regionales y distantes y, en última instancia, a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas pueden difundirse hacia los ganglios linfáticos, cerca del tumor primario, y luego diseminarse. Esta es la ruta más común de la metástasis para los carcinomas. Por lo tanto, podría ser ventajoso disminuir o prevenir la migración de células cancerosas para evitar la metástasis. Sin embargo, los intentos de prevenir la propagación del cáncer al inhibir la migración celular no han tenido éxito hasta ahora.

40 Curiosamente, las células cancerosas comparten propiedades de migración con las células DC. Más particularmente, los podosomas o invadosomas son cilíndricos, estructuras ricas en actina que muestran un patrón polarizado de distribución en las células migratorias. Su propósito principal está relacionado con la motilidad celular y su invasión. Muchas células especializadas diferentes exhiben estas estructuras dinámicas, como las células cancerosas invasivas, y ciertas células inmunes como las DC (Gimona et al., Current Opinion in Cell Biology, 20 (2): 235-41). El documento WO 99/62537 describe el uso de la modulación de la migración de células dendríticas para producir vacunas contra el cáncer, así como su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Compendio de la presente invención

50 Los inventores descubrieron un papel inesperado de los lisosomas en la regulación de la migración de DC. Descubrieron que la activación de DC aumenta su migración y persistencia al desencadenar la formación de un parche de cables de actina ubicados en la parte posterior de DC, y que los lisosomas están fuertemente adheridos a estas estructuras de actina en las DC migratorias, demostrando que tienen un papel en la regulación de la dinámica de actina y la migración de DC. De hecho, al bloquear la biogénesis y la secreción lisosómica (silenciando el TFEB, un factor de transcripción que controla la biogénesis del lisosoma), observaron un defecto en la migración de DC

asociado con la pérdida de la polimerización de actina en la parte posterior de las DC, lo que sugiere que la función y / o secreción del lisosoma controla la organización de la distribución de actina y la migración de DC. Más particularmente, descubrieron que el canal de calcio lisosómico Mcoln-1 controla la migración de DC, ya sea ex vivo o in vivo, es decir, la migración de DC disminuye cuando Mcoln-1 se inhibe y, por el contrario, aumenta cuando Mcoln-1 se activa; en particular en DC inmaduras. Se requiere Mcoln-1 para la polimerización de actina en la parte posterior de la célula y para una migración de DC rápida y persistente.

La presente invención se refiere a una molécula que modula Mcoln-1 para su uso en la modulación de la migración celular.

En un primer aspecto, la molécula moduladora es un activador de Mcoln-1 que, como consecuencia, mejora la migración celular. Preferiblemente, las células son DC.

El activador de Mcoln-1 puede usarse en la vacunación; en particular, en la vacuna antitumoral (en particular, con DC maduras), o para tratar una enfermedad autoinmune (en particular, con DC inmaduras) y para tratar la infección (en particular, con DC maduras).

Concretamente, la molécula que modula Mcoln-1 puede ser un activador seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra Mcoln-1 y que tiene una actividad agonista, o una molécula pequeña o un péptido que activa Mcoln-1 como ML-SA1, SF-22 y SF-51.

En un segundo aspecto, la molécula moduladora es un inhibidor de Mcoln-1, lo que dificulta la migración celular. Preferiblemente, las células son células tumorales.

Por lo tanto, el inhibidor de Mcoln-1 puede usarse para tratar el cáncer, en particular para prevenir o disminuir la metástasis.

En particular, la molécula que modula Mcoln-1 es un inhibidor o bloqueador que se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra Mcoln-1 y que tiene una actividad antagonista, un oligonucleótido que inhibe o disminuye la expresión de Mcoln-1; tal y como siRNA o shRNA antisentido, un aptámero específico para Mcoln-1 y que tiene una actividad antagonista, un bloqueador de los canales de calcio específico para Mcoln-1, un péptido o una molécula pequeña que inhibe o bloquea a Mcoln-1, tal y como ML-SI1, ML-SI2 y ML-SI3, Esfingomielinas o verapamilo.

Finalmente, la presente invención se refiere a un método para identificar o detectar una molécula capaz de modular la migración celular, que comprende determinar el efecto de una molécula sobre la actividad de Mcoln-1 y seleccionar la molécula si aumenta o disminuye la actividad de Mcoln-1. Opcionalmente, puede comprender además una etapa de determinar el efecto de la molécula seleccionada sobre la migración o velocidad celular y seleccionar la(s) molécula(s) que aumentan o disminuyen la velocidad o migración celular.

Descripción detallada de la invención

Mcoln-1 también se denomina actualmente mucolipin-1 o TRPML-1 (Canal de cationes del receptor de potencial transitorio, subfamilia de mucolipina). Es un canal de Ca^{2+} localizado en endosomas y lisosomas tardíos. Pertenece a la pequeña familia de los canales TRPML (incluye 3 miembros), un subgrupo de la gran familia de proteínas de los canales iónicos TRP. La deficiencia de Mcoln-1 causa mucopolidosis tipo IV.

Mcoln-1 se describe en varias bases de datos, a saber, UniProt ID No Q9GZU1 y Gene ID No 57192. Las secuencias de referencia se describen en Genbank con la referencia NM_020533 para ARNm y NP_065394 para la proteína.

Brevemente, los inventores identificaron a Mcoln-1 como un factor clave para el control de la migración celular; en particular, la migración de DC. Más específicamente, la migración celular disminuye cuando se inhibe Mcoln-1 y, por el contrario, aumenta cuando se activa Mcoln-1; en particular, en DC inmaduras. Demostraron que se requiere Mcoln-1 para la polimerización de actina en la parte posterior de la célula y para la migración rápida y persistente de DC. También demuestran la capacidad del inhibidor de Mcoln-1 para disminuir la migración de las células tumorales.

Por lo tanto, Mcoln-1 es una buena diana terapéutica para controlar la migración celular. Además, debido a que Mcoln-1 se localiza en los lisosomas, sus dominios lumenales son directamente accesibles a los compuestos extracelulares. En consecuencia, no existe ninguna necesidad absoluta de que los moduladores Mcoln-1 sean permeables a las células. Finalmente, como las mutaciones disruptivas de Mcoln-1 causan mucopolidosis de tipo IV, que es una enfermedad de almacenamiento lisosómico no letal, los tratamientos con moduladores de Mcoln-1 tendrán una toxicidad limitada o nula.

Como consecuencia, la presente invención se refiere a un modulador de Mcoln-1 para usar en la modulación de la migración celular, al uso de un modulador de Mcoln-1 para la preparación de un fármaco que module la migración celular, o un método para modular la migración celular, en el que el modulador de Mcoln-1 se administra a un sujeto. En una realización preferida, el modulador de Mcoln-1 puede ser selectivo con respecto a Mcoln-1. Eso significa que

el modulador de Mcoln-1 tiene una mayor eficacia en TRPML-1 en comparación con TRPML-2 y / o TRPML-3 (por ejemplo, por un factor de al menos 10, 100 ó 1000).

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un activador de Mcoln-1 que es capaz de aumentar o mejorar la migración celular in vivo. En este contexto, la presente invención se refiere a un activador de Mcoln-1 para ser usado en el aumento o la mejoría de la migración celular, al uso de un activador de Mcoln-1 para la preparación de un fármaco que aumente o mejore la migración celular, o a un método para aumentar o mejorar la migración celular, en el que se administra un activador de Mcoln-1 a un sujeto; preferiblemente, en una cantidad terapéuticamente efectiva del mismo.

10 El activador de Mcoln-1 puede usarse para tratar cualquier enfermedad o trastorno que pueda tener algún beneficio terapéutico por una migración celular aumentada o mejorada. Por "aumento" o "mejoría" se pretende hacer referencia a una migración celular que se incrementa en al menos 10, 20, 30, 40 o 50% en comparación con una migración celular medida en ausencia del activador de Mcoln-1. Por migración celular puede entenderse la velocidad celular deseada, el porcentaje de células migratorias o una combinación de estos dos criterios. La migración celular puede determinarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia; por ejemplo, mediante un método que utilice microcanales como se detalla en Faure-Andre et al. para medir la velocidad (Faure-Andre et al., 15 2008, Science, 322, 1705-10).

En un aspecto preferido, la célula es una célula DC. En un aspecto muy específico, puede ser una DC inmadura. De hecho, los inventores demuestran claramente que los activadores de Mcoln-1 pueden dar a las DC inmaduras la capacidad de migrar de manera similar a las DC maduras, al tiempo que mantienen su estado inmaduro.

20 Como las DC son centinelas del sistema inmune y se usan en muchos protocolos de vacunación; en particular, en el contexto de la vacunación antitumoral, la migración de DC podría incrementarse tratando las células con un activador de Mcoln-1. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un activador de Mcoln-1 para su uso en vacunación; en particular, para la vacunación antitumoral, o para el uso de un activador de Mcoln-1 para la preparación de una vacuna; preferiblemente, una vacuna antitumoral. Debido a la capacidad de los activadores de Mcoln-1 para aumentar la migración de DC, estos pueden superar la limitación admitida de la migración de DC 25 ineficiente al órgano linfóide durante la vacunación antitumoral.

La presente invención se refiere a un activador de Mcoln-1 para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con una vacuna antitumoral o al uso de un activador de Mcoln-1 para la fabricación de un fármaco para tratar el cáncer en combinación con una vacuna antitumoral. En particular, dicha vacuna antitumoral comprende antígenos tumorales; especialmente, DC cargados con antígenos tumorales o que codifican antígenos tumorales. También se refiere a un activador de Mcoln-1 que mejora la eficacia terapéutica de la vacuna antitumoral.

Esto es particularmente cierto en el contexto de la vacunación antitumoral. En este contexto, se administran antígeno(s) tumoral(es) al paciente. Pueden cargarse previamente en DC ex vivo o administrarse directamente.

35 Los antígenos tumorales útiles para la vacunación antitumoral son habituales en la técnica. Una lista no exhaustiva de los mismos incluye antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE (es decir, 1, 2, 3 o 12), BAGE, GAGE, NY-ESO-1, SSX, Gp100, Melan-A / Mart-1, Tirosinasa, Mammaglobin-A, p53, antígeno prostático específico (PSA), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2 / neu), livin, sruvivin, alfa-fetoproteína (AFP), antígeno de cáncer o antígeno de carbohidrato (CA 125, CA 15-3 y CA 19-9), β -catenina-m, β -actina / 4 / m, miosina / m, HSP70-2 / m, HLA-A2-R170J y mucina-1 (MUC-1). Además, los lisados tumorales o los restos apoptóticos pueden usarse como antígenos. Para su revisión, Even-Desrumeaux et al., 2011, Cancers, 3, 2554-2596; Buonaguro et al., 2011, Clin 40 Vaccine Immunol, 18, 23-34.

Se han desarrollado varias estrategias de vacuna y se podrían resumir en los siguientes grupos: administración directa de antígenos tumorales (opcionalmente, fusionados a un receptor DC), administración de antígenos tumorales cargados en DC, o administración de DC transfectadas por ácidos nucleicos que codifican antígenos tumorales. Las vacunas basadas en DC representan una de las estrategias más prometedoras. Para su revisión, Tacken et al., 2007, Nature Review Immunology, 7, 790-802.

En un aspecto particular, las DC son DC autólogas del paciente a tratar. Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende DC autólogas tratadas con un activador de Mcoln-1 o a un kit que comprende DC y un activador de Mcoln-1. Opcionalmente, puede comprender además un adyuvante de vacuna.

50 En otro aspecto particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un antígeno tumoral y un activador de Mcoln-1 o a un kit que comprende un antígeno tumoral y un activador de Mcoln-1. Opcionalmente, puede comprender además un adyuvante de vacuna.

En un uso terapéutico distinto, un activador de Mcoln-1 se puede usar para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno autoinmune. De hecho, a medida que un activador de Mcoln-1 aumenta o mejora la migración de DC, 55 mientras no regula las moléculas coestimuladoras, puede ser interesante inducir cierta tolerancia en el contexto de la inmunidad. De hecho, se ha demostrado, por ejemplo, que la inyección de DC en ratones diabéticos inhibe la autoinmunidad (Richer et al, PLoS One, 7, e31153). Del mismo modo, se han observado resultados alentadores en

diabetes, artritis y miocarditis autoinmune (Steinman et al., Annu. Rev. Immunol., 2003, 21, 685-711; Xiao et al., J. Immunother., 2006, 29, 465-471; van Duivenvoorde et al., J. Immunol., 2007, 1506-1515; Valaperti et al., Vaccine, 2013, 31, 4802-4811; Tbarozzi et al., Clin. Exp. Immunol., 2012, 171, 135-146). Por lo tanto, el tratamiento con un activador de Mcoln-1 puede aumentar las propiedades migratorias de las DC inmaduras, lo que induce a cierta tolerancia y reduce o previene las reacciones autoinmunes.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un activador de Mcoln-1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmune, o para el uso de un activador de Mcoln-1 para la preparación de un fármaco en el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmune. También se refiere a un método para tratar una enfermedad o trastorno autoinmune que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un activador de Mcoln-1.

Por ejemplo, la enfermedad o trastorno autoinmune se selecciona del grupo no exhaustivo que comprende diabetes tipo I, artritis reumatoide, miocardiopatía autoinmune, encefalomiелitis diseminada aguda, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome de Barth, enfermedad de Crohn, enfermedad de Graves, enfermedad hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica inmune idiopática (PTI), enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso sistémico, poliangitis microscópica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miositis, enfermedad inflamatoria de la pelvis, pénfigo, polimialgia reumática, cirrosis biliar primaria; colangitis esclerosante primaria, psoriasis, fiebre reumática, sarcidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, tiroiditis, colitis ulcerosa, trastorno linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome de poliendocrina autoinmune, dermatitis progesterona autoinmune, urticaria autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad de Behçet, enfermedad celíaca, enfermedad de aglutinina fría, dermatomiositis, fascitis eosinofílica, penfigoide gastrointestinal, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain Barre, encefalopatía de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad mixta del tejido conectivo, polimiositis, artritis psoriásica, síndrome de Reiter y vasculitis, tales como el síndrome de Churg-Strauss, poliangeítis microscópica y granulomatosis de Wegener. En un aspecto particular, la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo I, artritis reumatoide y cardiomiopatía autoinmune.

La presente invención también se refiere a un activador de Mcoln-1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa, o al uso de un activador de Mcoln-1 para la preparación de un fármaco para tratar una enfermedad infecciosa. También se refiere a un método para tratar una enfermedad infecciosa que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un activador de Mcoln-1. La enfermedad puede ser una infección viral o una infección bacteriana.

En un aspecto más general, la presente invención se refiere a un activador de Mcoln-1 para su uso como fármaco o al uso de un activador de Mcoln-1 para la fabricación de un fármaco, o una composición farmacéutica que comprende un activador de Mcoln-1. El activador de Mcoln-1 se puede usar en combinación con un fármaco de adición.

El activador de Mcoln-1 puede ser cualquier molécula capaz de aumentar la actividad de Mcoln-1. La actividad de Mcoln-1 se puede determinar mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia y, por ejemplo, en (Shen et al., 2012, Nat. Comm., 3: 731). Preferiblemente, un activador de Mcoln-1 es una molécula capaz de aumentar la actividad de Mcoln-1 en al menos 10, 20, 30, 40 o 50% en comparación con la actividad en ausencia de la molécula. Los términos "activador" y "agonista" pueden usarse y son intercambiables. La actividad se puede medir, por ejemplo, midiendo la permeabilidad al calcio.

El activador de Mcoln-1 puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra Mcoln-1 y que tiene una actividad agonista, y una molécula pequeña o péptido que activa Mcoln-1, como ML-SA1, SF-22 y SF-51.

Las moléculas pequeñas se refieren en particular a moléculas orgánicas pequeñas con una masa molecular <1000 Da. Se pueden obtener fácilmente moléculas pequeñas y otros candidatos a fármacos, por ejemplo, de bibliotecas de productos combinatorios y naturales y utilizando métodos conocidos en la técnica, o métodos de selección para su actividad agonizante de Mcoln-1. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente en varias compañías, incluidas Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), Comgenex (Princeton, N. J.), Brandon Associates (Merrimack, N.H.) y Microsource (New Milford, Conn.). Las bibliotecas combinatorias están disponibles o se pueden preparar de acuerdo con técnicas sintéticas conocidas. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles, por ejemplo, de Pan Laboratories (Bothell, Washington) y MycoSearch (NC), o son fácilmente producibles por métodos habituales en la técnica. Además, las bibliotecas de péptidos aleatorios, que consisten en todas las combinaciones posibles de aminoácidos, unidas a una fase sólida o en solución, también pueden usarse para identificar péptidos que actúan como agonistas.

Los activadores se pueden seleccionar del grupo que consiste en ML-SA1 (Sigma-Aldrich N^o. cat. SML0627; Tocris Bioscience N^o. cat. 4746), SF-22 (5-cloro-N-(2-piperidin-1-ilfenil)tiofeno-2-sulfonamida) y SF-51 (2-[2-oxo-2-(2,2,4-trimetilquinolin-1-il)etil]isoindol-1,3-diona).

El anticuerpo dirigido contra Mcoln-1 y que tiene una actividad agonista puede prepararse, por ejemplo, mediante el siguiente método que comprende inmunizar un mamífero no humano con una composición que comprende Mcoln-1 humano o un fragmento inmunogénico del mismo; opcionalmente seleccionando un anticuerpo que se une a Mcoln-1 o al fragmento inmunogénico del mismo, y seleccionando un anticuerpo que aumenta la actividad de Mcoln-1. La preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales es habitual en la técnica, y se puede usar cualquiera de una gran cantidad de técnicas disponibles (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96; en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos contra los polipéptidos deseados. Además, se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos, tal y como otros mamíferos para expresar los anticuerpos humanizados, quiméricos o modificados de manera similar. Alternativamente, la tecnología de presentación de fagos puede usarse para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unan específicamente a los antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10: 779 -783 (1992)).

Tal y como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" tienen el mismo significado y se usan indistintamente en la presente invención. El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina; es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Los anticuerpos incluyen cualquier tipo de anticuerpos, preferiblemente monoclonales. Pueden ser, por ejemplo, IgG (inmunoglobulina G) o VHH (anticuerpo de dominio variable de cadena pesada de camélidos). Los fragmentos de anticuerpos o derivados de los mismos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Más en general, la presente invención se refiere además a un método para seleccionar o identificar una molécula adecuada para aumentar o mejorar la migración celular, en particular la migración de DC, que comprende determinar el efecto de una molécula sobre la actividad de Mcoln1 y seleccionar la molécula si aumenta actividad de Mcoln1. El método puede comprender además un paso para determinar el efecto de la molécula seleccionada en la migración de DC, y seleccionar la molécula si aumenta la migración de DC. Tal método de detección se describe para Mcoln-1 en el documento US2003 / 064363. Además, los métodos para seleccionar moduladores del canal catiónico se han descrito y los expertos en la técnica pueden adaptarlos fácilmente a Mcoln-1, especialmente para TRPM4b en el documento WO 2004/039941; para TRPM5 en el documento WO 2004/076632; para TRPM7 en el documento WO2007/041687 y en el documento WO2011/072275; para TRPM4 en el documento WO2007/140308; para TRPM8 en el documento WO2006/029142.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un inhibidor o bloqueador de Mcoln-1 que es capaz de disminuir la migración celular in vivo. En este contexto, la presente invención se refiere a un inhibidor o bloqueador de Mcoln-1 para ser usado en la disminución de la migración celular, al uso de un inhibidor o bloqueador de Mcoln-1 para la preparación de un fármaco que disminuya la migración celular, o un método para disminuir la migración celular, en el que se administre un inhibidor o bloqueador Mcoln-1 a un sujeto, preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva del mismo.

El inhibidor de Mcoln-1 se puede usar para tratar cualquier enfermedad o trastorno que pueda tener un beneficio terapéutico de una disminución de la migración celular. Por "disminución" se entiende una migración celular que se reduce al menos un 10, 20, 30, 40 o 50% en comparación con una migración celular medida en ausencia del inhibidor o bloqueador de Mcoln-1. Por migración celular puede entenderse la velocidad celular deseada, el porcentaje de células migratorias o una combinación de estos dos criterios. La migración celular puede determinarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, mediante un método que utilice microcanales, como se detalla en Faure-Andre et al para medir la velocidad (Faure-Andre et al., 2008, Science, 322, 1705-10). Los términos "inhibidor", "bloqueador" y "antagonista" pueden usarse y son intercambiables.

En un aspecto preferido, la célula es una célula cancerosa o tumoral. De hecho, las metástasis derivadas del cáncer son altamente migratorias. Como las células cancerosas comparten propiedades de migración con los leucocitos y, en particular, con las DC, se puede usar un inhibidor de Mcoln-1 para prevenir la metástasis y la diseminación del cáncer.

En este contexto, la presente invención se refiere a un inhibidor de Mcoln-1 para usar en el tratamiento del cáncer; en particular, para prevenir la metástasis y la diseminación del cáncer, o al uso de un inhibidor de Mcoln-1 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer; en particular, para prevenir la metástasis y la diseminación del cáncer. Se refiere además a un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficiente de un inhibidor de Mcoln-1, evitando así la metástasis y la diseminación del cáncer.

El inhibidor de Mcoln-1 puede usarse en combinación con un fármaco de adición. Por consiguiente, la presente invención se refiere a

- una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Mcoln-1 y, opcionalmente, a un vehículo farmacéuticamente aceptable; en particular, para su uso en el tratamiento del cáncer; en particular, para prevenir la metástasis; opcionalmente, en combinación con un agente de radioterapia o antitumoral;

5 - un inhibidor de Mcoln-1 y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer; en particular, para prevenir la metástasis; opcionalmente, en combinación con un agente de radioterapia o antitumoral;

- el uso de un inhibidor de Mcoln-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer; en particular, para prevenir la metástasis; opcionalmente, en combinación con un agente de radioterapia o antitumoral;

10 - un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesite; en particular, para prevenir la metástasis, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Mcoln-1 y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- una preparación, producto o kit combinado que contiene (a) un inhibidor de Mcoln-1 y (b) un agente antitumoral como una preparación combinada para un uso simultáneo, separado o secuencial; en particular, en el tratamiento del cáncer; en particular, para prevenir la metástasis;

15 - un método para tratar el cáncer; en particular, para prevenir la metástasis en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Mcoln-1, y una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral; y,

20 - un método para tratar un cáncer; en particular, para prevenir la metástasis en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Mcoln-1 en combinación con radioterapia.

En una realización particular, el cáncer se selecciona entre un carcinoma, un sarcoma, una leucemia, un linfoma, un blastoma y un melanoma, preferiblemente un sarcoma, carcinoma y melanoma. El cáncer es preferiblemente un tumor sólido o una neoplasia hematopoyética. Por ejemplo, el cáncer se puede seleccionar de la lista no exhaustiva que comprende leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva al cromosoma Filadelfia (Ph+ ALL), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, células naturales asesino sinonasales, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) o leucemia linfocítica crónica. Más preferiblemente, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma, cáncer de colon y / o recto, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer de cuello uterino / ovario.

35 En una realización preferida, el cáncer es un cáncer con alta probabilidad o riesgo de metástasis. En particular, podría ser un cáncer primario asociado con la invasión de ganglios linfáticos por las células tumorales.

En un aspecto más general, la presente invención se refiere a un inhibidor de Mcoln-1 para su uso como fármaco o al uso de un inhibidor de Mcoln-1 para la fabricación de un fármaco, o una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de Mcoln-1.

40 Dentro del contexto de la invención, el término "tratamiento" denota un tratamiento curativo, sintomático y preventivo. Las composiciones y preparaciones farmacéuticas de la invención se pueden usar en seres humanos con cáncer o tumor(es) existente(s); preferiblemente, en etapas tardías de la progresión del cáncer. Las composiciones y preparaciones farmacéuticas de la invención no curarán necesariamente al paciente con cáncer, sino que retrasarán o retardarán la progresión de la enfermedad o evitarán una mayor progresión de ésta, mejorando así la condición de los pacientes. En particular, las composiciones y preparaciones farmacéuticas de la invención reducen el desarrollo de tumores y / o previenen la aparición de metástasis y la recaída en el cáncer. En el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.

45 Por "cantidad efectiva" se entiende la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que previene, elimina o reduce los efectos nocivos del cáncer en mamíferos, incluidos los seres humanos. Se entiende que la dosis administrada puede ser adaptada por los expertos en la técnica de acuerdo con el paciente, la patología, el modo de administración, etc. Más particularmente, por "cantidad terapéuticamente eficiente de un inhibidor de Mcoln-1" se entiende la cantidad que es suficiente para disminuir la aparición de la metástasis.

55 El inhibidor de Mcoln-1 puede ser cualquier molécula capaz de inhibir o disminuir la actividad de Mcoln-1. La actividad de Mcoln-1 se puede determinar mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia y, por ejemplo, en (Shen et al., 2011, Nat. Com., 3, 731). Preferiblemente, un inhibidor de Mcoln-1 es una molécula capaz de disminuir la actividad de Mcoln-1 en al menos 10, 20, 30, 40 o 50% en comparación con la actividad en ausencia

de la molécula. Los términos "inhibidor", "bloqueador" y "antagonista" pueden usarse y son intercambiables. La actividad se puede medir, por ejemplo, midiendo la permeabilidad al calcio de los lisosomas.

El inhibidor de Mcoln-1 se puede seleccionar del grupo que consiste en un anticuerpo dirigido contra Mcoln-1 y que tiene una actividad antagonista, un oligonucleótido que inhibe o disminuye la expresión de Mcoln-1, como siRNA o shRNA antisentido, un aptámero específico de Mcoln-1 y que tiene una actividad antagonista, un bloqueador de los canales de calcio específicos para Mcoln-1, un péptido o una molécula pequeña que inhibe o bloquea a Mcoln-1, tal como ML-SI1, ML-SI2 y ML-SI3, esfingomielinas o verapamilo.

En una realización preferida de la invención, el inhibidor de Mcoln-1 es una molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la expresión de Mcoln-1, disminuyendo o suprimiendo así la expresión de esta proteína. Tales ácidos nucleicos se detallan más ampliamente a continuación. Preferiblemente, este ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en un ARNi, un ácido nucleico antisentido o una ribozima. Dicho ácido nucleico puede tener una secuencia de 15 a 50 nucleótidos, preferiblemente de 15 a 30 nucleótidos. Por "disminución" en la expresión se entiende, por ejemplo, una disminución del 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% o 95% del producto de expresión génica.

El término "ARNi" o "ARN interferente" significa cualquier ARN que sea capaz de regular a la baja la expresión de la proteína diana. Abarca el ARN interferente pequeño (siRNA), el ARN bicatenario (dsRNA), el ARN monocatenario (ssRNA), el micro-ARN (miRNA) y las moléculas de ARN de horquilla corta (shRNA). La interferencia de ARN designa un fenómeno por el cual dsRNA suprime específicamente la expresión de un gen diana a nivel postraduccional. En condiciones normales, la interferencia del ARN es iniciada por moléculas de ARN bicatenarias (ARNds) de varios miles de pares de bases. In vivo, el dsRNA introducido en una célula se escinde en una mezcla de moléculas de dsRNA cortas llamadas siRNA. La enzima que cataliza la escisión, Dicer, es una endo-RNasa que contiene dominios de RNasa III (Bernstein et al., 2001). En las células de mamíferos, los siARN producidos por Dicer tienen una longitud de 21-23 pb, con una secuencia dúplex de 19 o 20 nucleótidos, salientes 3' de dos nucleótidos y extremidades 5'-trifosfato (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Zamore et al., 2000). Varias patentes y solicitudes de patentes han descrito, en términos generales, el uso de moléculas de siARN para inhibir la expresión génica, por ejemplo, los documentos WO 99/32619, US 20040053876, US 20040102408 y WO 2004/007718.

El inhibidor Mcoln-1 puede ser un oligonucleótido silenciador tal como siRNA o un shRNA, por ejemplo, un siRNA o un shRNA disponible comercialmente (es decir, Qiagen N.º. cat. SI00126861, SI00126868, SI030577474, SI0500768, SI05010775, SI03095148; Sigma-Aldrich N.º. cat. Sigma-Aldrich N.º. cat.). En una realización particular, el siRNA puede seleccionarse del grupo que consiste en TRPML1 si3 (SEQ ID NO 1) o TRPML1 si5 (SEQ ID No 2).

El ácido nucleico antisentido también se puede usar para regular negativamente la expresión de Mcoln-1. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a todo o parte de un ácido nucleico sentido que codifica Mcoln-1, por ejemplo, complementario a la cadena codificante de una molécula de ADNc bicatenario o complementario a una secuencia de ARNm, y se cree que interfiere con la traducción del ARNm diana. Preferiblemente, el ácido nucleico antisentido es una molécula de ARN complementaria a un ARNm diana que codifica Mcoln-1.

El inhibidor de Mcoln-1 puede ser una molécula pequeña. Las moléculas pequeñas se refieren en particular a moléculas orgánicas pequeñas con una masa molecular <1000 Da. Se pueden obtener fácilmente moléculas pequeñas y otros candidatos a fármacos, por ejemplo, a partir de bibliotecas de productos combinatorios y naturales y utilizando métodos conocidos en la técnica, o métodos de selección para su actividad antagonista de Mcoln-1. Además, las bibliotecas de péptidos al azar, que consisten en todas las combinaciones posibles de aminoácidos, unidas a una fase sólida o en solución, también pueden usarse para identificar péptidos que actúan como antagonistas.

Por ejemplo, el inhibidor de Mcoln-1 también puede seleccionarse de la lista no exhaustiva que comprende ML-SI1, ML-SI2 y ML-SI3 (Samie et al., 2013, Developmental Cell, 26, 511-524), esfingomielinas (Shen et al., 2011, Nat. Comm., 3, 731) y verapamilo.

El inhibidor de Mcoln-1 puede ser un péptido; en particular, un fragmento peptídico del inhibidor de Mcoln-1 que tiene un efecto inhibidor.

El anticuerpo dirigido contra Mcoln-1 y que tiene una actividad antagonista puede prepararse, por ejemplo, mediante el siguiente método que comprende inmunizar un mamífero no humano con una composición que comprende Mcoln-1 humano o un fragmento inmunogénico del mismo; opcionalmente seleccionando un anticuerpo que se una a Mcoln-1 o al fragmento inmunogénico del mismo, y seleccionando un anticuerpo que disminuya la actividad de Mcoln-1.

Para aptámeros y Spiegelmers, se pueden utilizar métodos similares para seleccionar aptámeros y Spiegelmers. Estos métodos son habituales para el experto en la materia. Como se usa en este documento, el término "aptámero" significa una molécula de ácido nucleico o un péptido capaz de unirse a Mcoln-1. Se refiere a una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse mediante la evolución sistemática

de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., Science, 1990, 249 (4968): 505-10. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., Clin. Chem., 1999, 45 (9): 1628-50.

Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo constreñida conformacionalmente mostrada por una proteína de plataforma, como la tiorredoxina A de E. coli que se seleccionan de bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos (Colas et al., Nature, 1996, 380, 548-50). Spiegelmers se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 98/08856. Son moléculas similares a los aptámeros. Sin embargo, los spiegelmers consisten completa o principalmente en L-nucleótidos, en lugar de D-nucleótidos, en contraposición a los aptámeros. De otra forma, y particularmente con respecto a las posibles longitudes de spiegelmers, lo mismo se aplica a los spiegelmers que se describen en relación con los aptámeros.

Más en general, la presente invención se refiere además a un método para seleccionar o identificar una molécula adecuada para disminuir o prevenir la migración celular; en particular, la migración de DC, que comprende determinar el efecto de una molécula respecto a la actividad de Mcoln1 y seleccionar la molécula si disminuye o bloquea la actividad de Mcoln1. El método puede comprender además un paso para determinar el efecto de la molécula seleccionada con respecto a la migración o velocidad de DC, y seleccionar la molécula si disminuye o bloquea la migración o velocidad de DC. Tal método de detección se describe para Mcoln-1 en el documento US2003 / 064363. Además, se han descrito métodos para seleccionar moduladores del canal catiónico y todo experto en la técnica puede adaptarlos fácilmente a Mcoln-1, especialmente para TRPM4b en el documento WO 2004/039941; para TRPM5 en el documento WO 2004/076632; para TRPM7 en el documento WO2007 / 041687 y en el documento WO2011 / 072275; para TRPM4 en el documento WO2007 / 140308; para TRPM3 en el documento WO2010 / 149614; para TRPM8 en el documento WO2006 / 029142.

El inhibidor de Mcoln-1 se puede usar en combinación con otros tratamientos antitumorales. El agente antitumoral puede ser un agente de quimioterapia antitumoral, inmunoterapia o terapia hormonal. Como se usa en el presente documento, el término "quimioterapia" se refiere a un tratamiento terapéutico contra el cáncer que usa sustancias químicas o bioquímicas; en particular que usa uno o varios agentes antineoplásicos. El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento terapéutico contra el cáncer con anticuerpos terapéuticos. En particular, los anticuerpos se dirigen contra antígenos específicos como los antígenos inusuales que se presentan en las superficies de los tumores. Como ejemplo ilustrativo, se puede citar el anticuerpo Trastuzumab o Herceptin dirigido contra HER2 y aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama. Preferiblemente, los anticuerpos terapéuticos funcionan para agotar las células tumorales en un paciente. En particular, los anticuerpos terapéuticos se unen específicamente a los antígenos presentes en la superficie de las células tumorales, p. ej. los antígenos específicos tumorales presentes, predominante o exclusivamente, en células tumorales. Alternativamente, los anticuerpos terapéuticos también pueden prevenir el crecimiento tumoral al bloquear receptores celulares específicos. La expresión "terapia hormonal" se refiere a un tratamiento contra el cáncer que tiene el propósito de bloquear, agregar o eliminar hormonas. Por ejemplo, en el cáncer de mama, las hormonas femeninas estrógenos y progesteronas pueden promover el crecimiento de algunas células en el cáncer de mama. Por lo tanto, en estos pacientes, se administra terapia hormonal para bloquear a los estrógenos; una lista no exhaustiva de medicamentos de uso común incluye: tamoxifeno, Fareston, Arimidex, Aromasin, Femara, Zoladex / Lupron, Megace y Halotestin.

La composición farmacéutica que comprende la molécula está formulada de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar (Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York) conocida por los expertos en la materia.

Para la administración oral, la composición puede formularse en formas de dosificación oral convencionales tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos y preparaciones líquidas tales como jarabes, elixires y gotas concentradas. Se pueden usar vehículos o diluyentes sólidos no tóxicos que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, magnesio, carbonato, etc. Para las tabletas comprimidas, también son necesarios aglutinantes, que son agentes que imparten cualidades cohesivas a los materiales en polvo. Por ejemplo, el almidón, la gelatina, los azúcares como la lactosa o la dextrosa y las gomas naturales o sintéticas se pueden usar como aglutinantes. Los desintegrantes también son necesarios en las tabletas para facilitar la ruptura de la tableta. Los desintegrantes incluyen almidones, arcillas, celulosas, algas, gomas y polímeros reticulados. Además, también se incluyen lubricantes y agentes deslizantes en las tabletas para evitar la adhesión del material de la tableta a las superficies en el procedimiento de fabricación y para mejorar las características de flujo del material en polvo durante la fabricación. El dióxido de silicio coloidal se usa más comúnmente como agente deslizante y compuestos, como el talco o los ácidos esteáricos, se usan más comúnmente como lubricantes.

Para la administración transdérmica, la composición puede formularse en forma de ungüento, crema o gel y podrían usarse penetrantes o detergentes apropiados para facilitar la permeación, tales como dimetilsulfóxido, dimetil acetamida y dimetilformamida.

Para la administración transmucosa, se pueden usar aerosoles nasales, supositorios rectales o vaginales. El compuesto activo se puede incorporar en cualquiera de las bases de supositorios conocidas por métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales bases incluyen manteca de cacao, polietilenglicoles (carboceras), monoestearato de polietileno sorbitano y mezclas de estos con otros materiales compatibles para modificar el punto de fusión o la velocidad de disolución.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para liberar el fármaco activo sustancialmente inmediatamente después de la administración o en cualquier momento o período de tiempo predeterminado después de la administración.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden comprender una o más moléculas de la presente invención asociadas con excipientes y / o vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes y / o vehículos se eligen de acuerdo con la forma de administración como se describió anteriormente.

Otros aspectos y ventajas de esta invención se describen en la siguiente sección experimental, que debe considerarse como ilustrativa y no limitativa del alcance de esta solicitud.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Las DC inactivas de TRPML1 (Mcoln-1) muestran cierta motilidad y persistencia alteradas

La motilidad de las DC inmaduras o maduras (tratadas con LPS) se analizó mediante imágenes de lapso de tiempo. El análisis de la velocidad celular se muestra en (A), y las variaciones de velocidad en (B). Las células TRPML1 KO inmaduras son menos móviles que sus contrapartes TRPML1 WT (la velocidad celular se reduce en aproximadamente un 20%). Se observó la misma tendencia para las células activadas por LPS, donde las células TRPML1 KO LPS fueron un 20% menos móviles que sus contrapartes WT LPS. La maduración inducida por LPS aumenta la velocidad celular en las células TRPML1 WT y KO (30% para TRPML1 WT LPS en comparación con TRPML1 WT; 20% para TRPML1 KO LPS en comparación con TRPML1 KO). Juntos, estos resultados indican que se requiere TRPML1 para fases de motilidad rápida. Las células TRPML1 KO tratadas con LPS muestran variaciones de velocidad similares a las células TRPML1 WT inmaduras, lo que indica que estas células son menos persistentes en comparación con su contraparte TRPML1 WT LPS. (Diagramas de cuadros que indican medianas y percentiles 10-90; de 200 a 300 células por condiciones, un experimento representativo de 3; *** P <0,0001, prueba de Kruskal-Wallis). (C) El análisis de citometría de flujo muestra que las células TRPML1 KO se activan con el tratamiento con LPS (niveles de CD86).

Figura 2: Las CD inactivas de TRPML1 (Mcoln-1) muestran cierta motilidad y persistencia alteradas

(A) identificación de qPCR de siARN de TRPML1 que conduce a una eliminación eficaz (KD) de TRPML1. Todos los resultados se normalizaron a los niveles de GAPDH. Se seleccionaron tanto TRPML1 si3 como 5 (reducción de la expresión del gen TRPML1 en aproximadamente un 60%). (B) La nucleofección no activa las células ni previene la maduración inducida por LPS. Se muestran los niveles CD86 de control negativo All-Star (AS) y células TRPML1 si5, inmaduras o maduras (tratadas con LPS). El análisis de velocidad de las células nucleadas por siRNA se muestra en (C) y en (D) sus variaciones de velocidad. Las células TRPML1 KD se comportan de manera similar a las células TRPML1 KO (ver figura 1, C y D). (Gráficos de cajas que indican medianas y percentiles 10-90; de 100 a 300 células por condiciones, grupo de dos experimentos independientes; *P = 0,05, ***P <0,0001, prueba de Kruskal-Wallis).

Figura 3: TRPML1 regula la dinámica de actina en DC activadas

(A) Mapas de densidad de actina polimerizada en células inmaduras o maduras que expresan AS (control) y en células TRPML1 si5 inmaduras o maduras. (B) Fracción del tiempo que pasan las células con actina en el frente. Tanto en el control como en las células inmaduras silenciadas con TRPML1, la actina polimerizada se encuentra principalmente en el frente de DC (aproximadamente el 70% del tiempo para ambos). Las células de control maduras muestran cierta polimerización de actina en el centro de la célula / parte posterior de la célula (la actina podría detectarse solo un 30% del tiempo en el frente de la célula); se ha demostrado que dicha polimerización de actina en el centro de la célula / parte posterior de la célula es necesaria para una motilidad rápida en las DC maduras. Esta polimerización de actina en el centro / parte posterior de la célula se observó menos en las células TRPML1 si5 LPS, la actina todavía se polimeriza en el frente de la célula (50% del tiempo). (Los mapas de densidad y la cuantificación se realizaron en aproximadamente 20 células por condición, un experimento representativo de 2, **P = 0,005, prueba de Kruskal-Wallis).

Figura 4: la activación de TRMPL1 a través de MLSA1 en células inmaduras aumenta la motilidad celular

El tratamiento con MLSA1 de células inmaduras aumenta tanto la velocidad celular (A) como la persistencia (B), a un nivel similar al de las células LPS maduras. El tratamiento de células maduras (DC LPS) con este compuesto no aumenta aún más la velocidad celular o su persistencia. (C) El tratamiento con MLSA1 no activa a las células inmaduras, ni previene la maduración inducida por LPS. Los niveles de CD86 de células inmaduras y de células maduras con LPS se muestran en ausencia o presencia de dos dosis de MLSA1 (5 o 10 μ M).

(D) Mapas de densidad de actina polimerizada en DC inmaduras tratadas o no con MLSA1, y en células maduras tratadas con LPS. (E) Fracción del tiempo que pasan las células con actina en el frente. El tratamiento con MLSA1 de DC inmaduras induce parcialmente la polimerización de actina en el centro celular / parte posterior de la célula. La fracción t del tiempo que pasan las DC con actina en su frente disminuye en comparación con las DC de control inmaduras, lo que sugiere que la activación de TRPML1 induce el reclutamiento de actina en la parte posterior de la célula. (Los mapas de densidad y la cuantificación se realizaron en aproximadamente 60 células por condición, un experimento representativo de 2, *P = 0,05, ***P <0,0001, prueba de Kruskal-Wallis).

Figura 5: Se requiere TRPML1 para la migración eficiente de DC activadas a los ganglios linfáticos

(A) Las CD TRPML1 WT y KO LPS marcadas con fluorescencia se inyectaron conjuntamente en la almohadilla del pie de ratones receptores C57BL/6. Los ganglios linfáticos poplíteos se recogieron y analizaron aproximadamente 16 h después de la inyección de la almohadilla del pie. La presencia de DC migratorias se muestra como un porcentaje del total de células LN (cada punto representa un ratón, dos experimentos independientes, ***P <0,0001). (B) Ejemplo de un análisis de citometría de flujo de ganglios linfáticos, que muestra TRPML1 WT LPS marcado con CMTMR y TRPML1 KO LPS marcado con CFSE. Se encontraron números más bajos de DC de LPS con deficiencia de TRPML1 KO en comparación con las células WT LPS en el ganglio linfático de los ratones receptores (aproximadamente dos veces menos).

Figura 6: Modelo de trabajo

TRPML1 es un canal transmembrana de Ca^{2+} , que se encuentra principalmente en los lisosomas, lo que permite la liberación de Ca^{2+} desde los lisosomas al citosol. En las DC maduras con LPS, la motilidad rápida está vinculada con la polimerización de actina mediada por formina en el centro de la célula / parte posterior de la célula (Vargas et al. En preparación). Los cables de actina generados por estas forminas están modificados con miosina II, lo que permite una mayor movilidad de las células maduras. Se presume que la liberación de Ca^{2+} desde los lisosomas conduce a un aumento local de Ca^{2+} , que, por lo tanto, (1) favorece la polimerización de actina mediada por formina en la parte posterior de la célula, y (2) aumenta la contractilidad celular a través de la activación de la miosina II.

Figura 7: Ensayo de degradación de gelatina fluorescente, efecto del silenciamiento de MCOLN1

EJEMPLOS

Resultados

Las células dendríticas de TRPML1, deficientes en Mcoln-1 o silenciadas, muestran cierta motilidad y persistencia alteradas

Para investigar si TRPML1 desempeñaba un papel en la migración de células dendríticas (DC), los inventores diferenciaron las DC de la médula ósea en ratones deficientes y no deficientes en TRPML1 y analizaron su capacidad para migrar a lo largo de microcanales (5x5 μ m) antes y después de un tratamiento con LPS. Observaron que las DC activadas por LPS mostraban una mayor velocidad y persistencia de migración (Fig. 1A y B), de acuerdo con los hallazgos anteriores de los inventores. Sorprendentemente, la velocidad de TRPML1 eliminó las CD y disminuyó su persistencia de migración, lo que indica que este canal de calcio lisosómico es necesario para que las CD alcancen su velocidad máxima y migren direccionalmente. Es importante destacar que no se observó ningún efecto de TRPML1 en la maduración de DC como se muestra por los niveles normales de expresión de CD86 de superficie (Fig. 1C). Se obtuvieron resultados equivalentes al analizar la migración de DC silenciadas por TRPML1 en microcanales (Fig 2). Además, la transferencia del control TRPML1 y la eliminación de DC en la almohadilla del pie de los receptores de tipo salvaje mostró una llegada deficiente de las células deficientes en TRPML1 desde la almohadilla del pie al ganglio linfático poplíteo después de 24 h (Fig 3). Los inventores concluyen que la deficiencia de TRPML1 conduce a una migración de DC deteriorada ex vivo e in vivo.

TRPML1 (Mcoln-1) regula la dinámica de actina en las células dendríticas activadas

Para investigar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la migración de DC por TRPML1, los inventores lo silenciaron en DC derivadas de ratones transgénicos LifeAct (Riedl et al., 2010, Nat. Methods, 7, 168-169) y analizaron su dinámica de actina durante la migración. Como se observó anteriormente, los inventores descubrieron que la actina polimerizada se enriquecía principalmente en el frente de la célula en DC inmaduras, mientras que se concentraba en la parte posterior de la célula en DC activadas (Fig. 4A y B). De forma notable, el TRPML1 silencia la localización de actina modificada en DC activadas de tipo salvaje, que exhibían la mayor parte de su actina en su frente. Los inventores concluyen que TRPML1 promueve la migración de DC activadas al permitir o estabilizar la polimerización de actina en su parte posterior, necesario para su propia locomoción rápida y persistente.

La activación de TRMPL1 a través de MLSA1 en células inmaduras aumenta la motilidad celular

Para fortalecer estos resultados, los inventores analizaron la migración de DC en microcanales después del tratamiento con el medicamento MLSA1, que demostró que activaba TRPML1 (Shen et al., 2012, Nat. Com., 3: 731).

Sorprendentemente, MLSA1 aumentaba la velocidad y la persistencia de las DC inmaduras en los niveles medidos en las células activadas, lo que indica que este canal de calcio lisosómico es probablemente el responsable de su mejor locomoción (Fig 5A y B). No se observó ningún efecto de MLSA1 sobre la maduración de DC (Fig. 5C). Además, el análisis de la dinámica de la actina en las DC inmaduras tratadas con MLSA1 mostró que la actina se enriquecía en su parte posterior, de acuerdo con su característico fenotipo migratorio rápido y persistente (Fig 5D y E). Por lo tanto, TRPML1 facilita la migración de DC al promover el enriquecimiento de la actina polimerizada en su parte posterior de la célula pero sin alterar su maduración (ver modelo en la Figura 6).

Ensayo de degradación de gelatina fluorescente: Efecto del silenciamiento de MCOLN1

Un 40,2% de MDA-MB-231 degradó la gelatina FITC cuando se trató con el siRNA de control (NT), mientras que solo un 2,4% de MDA-MB-231 degradó la gelatina FITC cuando se trató con el siRNA MT1-MMP (MT1-MMP es la enzima responsable de la degradación). Cuando las células se trataban con ARNip MCOLN1, el 24,3% de MDA-MB-231 degradó la gelatina FITC. Este resultado sugiere que el silenciamiento de MCOLN1 inhibe el 40% de las capacidades degradativas de MDA-MB-231, lo que ilustra la capacidad del inhibidor de MCOLN1 para prevenir o disminuir la migración de células tumorales.

15 Materiales y métodos

Anticuerpos y reactivos

Los siguientes reactivos se usaron para experimentos de visualización de imágenes: WGA AlexaFluor-647 y Hoechst (ambos de Life Technologies). Los microcanales se recubrieron con fibronectina (Sigma). La activación celular se realizó con LPS (Sigma). Para la citometría de flujo se usaron los siguientes anticuerpos: anti-CD86 (clon GL1, 553692) y un control de isotipo de IgG_{2a,k} de rata (553930) de BD Biosciences.

Ratones

Los ratones knock-in Lifeact-GFP (denominados Lifeact) y los ratones knock-out TRPML1 se han descrito previamente (Riedl et al., 2010, Nat. Methods, 7, 168-169, Chandra et al., Gastroenterology, 2011, 140, 857-867).

Células

Se cultivaron células de médula ósea de ratón durante 10-12 días en medio suplementado con suero fetal de ternera y sobrenadante con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos obtenido de células J558 transfectadas, como se describió previamente (Faure-Andre et al., 2008, Science, 322, 1705-10). Para los ensayos de migración o mapeo (ver a continuación), las células en los días 10-12 se activaron con 100 ng / ml de LPS (células maduras, LPS DC), durante 30 minutos, luego se enjuagaron 3 veces con medio completo y se colocaron en los canales. Las células inmaduras homólogas para estos experimentos se trataron en las mismas condiciones, pero en ausencia de LPS.

Electroporación

Para el silenciamiento génico mediado por siRNA, las células Lifeact se cultivaron durante 7 días y luego se transfectaron con un siRNA dirigido contra TRPML1 de ratón (Mm_Mcoln1_3 denominado TRPML1 si3 (secuencia diana 5'-CACCATCCACTTCCAGCTGAA-3' (SEQ ID No 1) o Mm_Mcoln1_5, denominado TRPML1 si5 (secuencia diana: 5'-TACAAGAACCTCACACTGAAA-3' (SEQ ID No 2))) o un control siRNA all-star no diana (todos de Qiagen GmbH).

La electroporación se realizó con el kit de nucleofector de células dendríticas de ratón Amaxa (VPA-1011), de acuerdo con el protocolo del fabricante (Lonza). Brevemente, las células derivadas de médula ósea (3×10^6) se resuspendieron en 100 μ l de tampón suplementado con Amaxa con 1 μ M de siARN y se nucleofectaron usando el programa Y-001 (Amaxa Nucleofector, Lonza). Las células se transfirieron inmediatamente a placas de 6 pocillos con medios precalentados. Las células se usaron para experimentos 3 días después de la nucleofección.

qPCR

Las células dendríticas (al menos 1×10^6 células) se recogieron antes de los experimentos, y el ARNm total se extrajo según el protocolo del fabricante (Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel). El ADN complementario se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN total, utilizando el kit de inverso superscript vilo (Invitrogen). Las QPCR se realizaron utilizando la mezcla maestra de expresión de genes Taqman, y el mejor iniciador de cobertura establece Mm00522550_m1 y Mm99999915_g1 para TRPML1 y GAPDH, respectivamente (todos de Applied Biosystems, Life Technologies). Todos los experimentos se realizaron en un ciclador óptico de Roche (Roche). Los niveles de expresión del gen TRPML1 se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, y usando los niveles de expresión de GAPDH como control endógeno.

Análisis de citometría de flujo

Las células se resuspendieron en tampón de tinción (PBS BSA 2%) y se tiñeron 30 minutos a 4°C con los anticuerpos indicados. Las células se lavaron 3 veces y se resuspendieron en tampón de tinción. Todos los experimentos de Facs se llevaron a cabo en un citómetro de flujo Accuri (BD Biosciences).

5 Preparación de microcanales.

Se prepararon microcanales como se ha descrito previamente (Faure-Andre et al., 2008, Science, 322, 1705-10; Heuze et al., 2011, Methods Mol. Biol., 769, 415-434). Se incubaron con 10 µg / ml de fibronectina sola durante 1 hora y se lavaron con PBS.

Ensayo de migración

10 Para el ensayo de migración, las células se cargaron en microcanales (sección 5 * 5 µm) y se tomaron imágenes al menos durante 16 horas en un microscopio Nikon TiE de video-microscopio de epifluorescencia equipado con una cámara CCD enfriada (HQ2, fotometría) con un objetivo 10X, una imagen de la fase de transmisión tomada cada 2 minutos. La extracción de Kymograph y el análisis de velocidades instantáneas se realizaron utilizando un programa casero como se describió anteriormente (Faure-Andre et al., 2008, Science, 322, 1705-10).

15 Ensayo de mapeo

Las células dendríticas Lifeact (nucleotransfectadas o no) se incubaron durante 30 minutos en medio que contenía 200 ng / l de Hoechst, se lavaron 3 veces, se cargaron 10⁵ células por pocillo y se incubaron de 4 horas a una noche para permitir su entrada en los microcanales (la sección fue de 8x5 µm). Después de la entrada, se tomaron imágenes de las células al menos durante 16 horas en un microscopio Nikon TiE de video-microscopio de epifluorescencia equipado con una cámara CCD enfriada (HQ2, fotométrica) con un objetivo 20X. Las imágenes fueron adquiridas cada 3 minutos. El procesamiento de imágenes se realizó con el software ImageJ (ref: Rasband WS. ImageJ, Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., Bethesda, Maryland, EE. UU., imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012). Las células que se movían en los microcanales se segmentaron mediante un método de umbral automático (Triángulo) en el canal de actina. Para cada punto de tiempo, se definió el rectángulo más pequeño que contenía la célula y se recortaron las imágenes. Luego, las imágenes recortadas se normalizaron por tamaños y se calculó la imagen media de actina de cada célula (intensidad de píxel promedio para todos los puntos de tiempo). Todas las imágenes medias de actina se normalizaron por intensidad y se promediaron para obtener la distribución media de actina polimerizada del experimento. Además, para cada célula, se midieron las coordenadas espaciales de los núcleos y se calculó la relación entre la densidad media de actina en el frente y en la parte posterior del núcleo. Las velocidades de las células se estimaron de acuerdo con estas coordenadas espaciales.

Migración de células dendríticas desde la almohadilla del pie hacia el ganglio linfático

Los experimentos se realizaron como se ha descrito anteriormente (Faure-Andre et al., 2008, Science, 322, 1705-10).

Degradación fluorescente de gelatina

35 La línea celular de adenocarcinoma de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se transfectó con 50 nM de control siRNA NT, siRNA MCOLN1 (Smart pool siRNA de Dharmacon, L-006281-00-0010, ON-TARGETplus Human MCOLN1 (57192) siRNA- SMARTpool, 10nmol. SiRNA J-006281-05 + siRNA J-006281-06 + siRNA J-006281-07 + siRNA J-006281-08, Secuencias diana de SEQ ID Nos. 3-5) o MT1-MMP siRNA usando reactivo Lullaby (OZ Biosciences). 72 h después del tratamiento, las células se incubaron durante 5 h en gelatina reticulada conjugada con FITC (Invitrogen) como se describió anteriormente (Sakurai-Yageta et al., 2008, J. Cell. Biol., 181, 985-998) y luego se fijaron y tiñeron para F-actina y cortactina. Se tomaron imágenes de las células con un objetivo 63x de un microscopio de campo amplio (DM6000 B / M; Leica) y la cuantificación de la degradación de la gelatina se logró usando MetaMorph como se describió anteriormente (Monteiro et al. 2013, J. Cell. Biol., 203, 1063-1079).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Institut Curie et al

5 <120> Uso de moduladores MCOLN-1 para regular la migración celular
 <130> B1770PC
 <160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> TRPML1 si3

20 <400> 1
 caccatccac ttccagctga a 21
 <210> 2
 <211> 21
 25 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> TRPML1 si5

30 <400> 2
 tacaagaacc tcacactgaa a 21
 <210> 3
 35 <211> 19
 <212> RNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia diana Mcoln-1
 <400> 3
 gaccuucgcc gucgucuca 19

45 <210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia diana Mcoln-1
 <400> 4
 55 ugaucacguu ugacaacaa 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> Secuencia diana Mcoln-1
 <400> 5

ES 2 796 090 T3

caacgacaca uuugacauu 19

<210> 6
<211> 19
5 <212> RNA
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia diana Mcoln-1

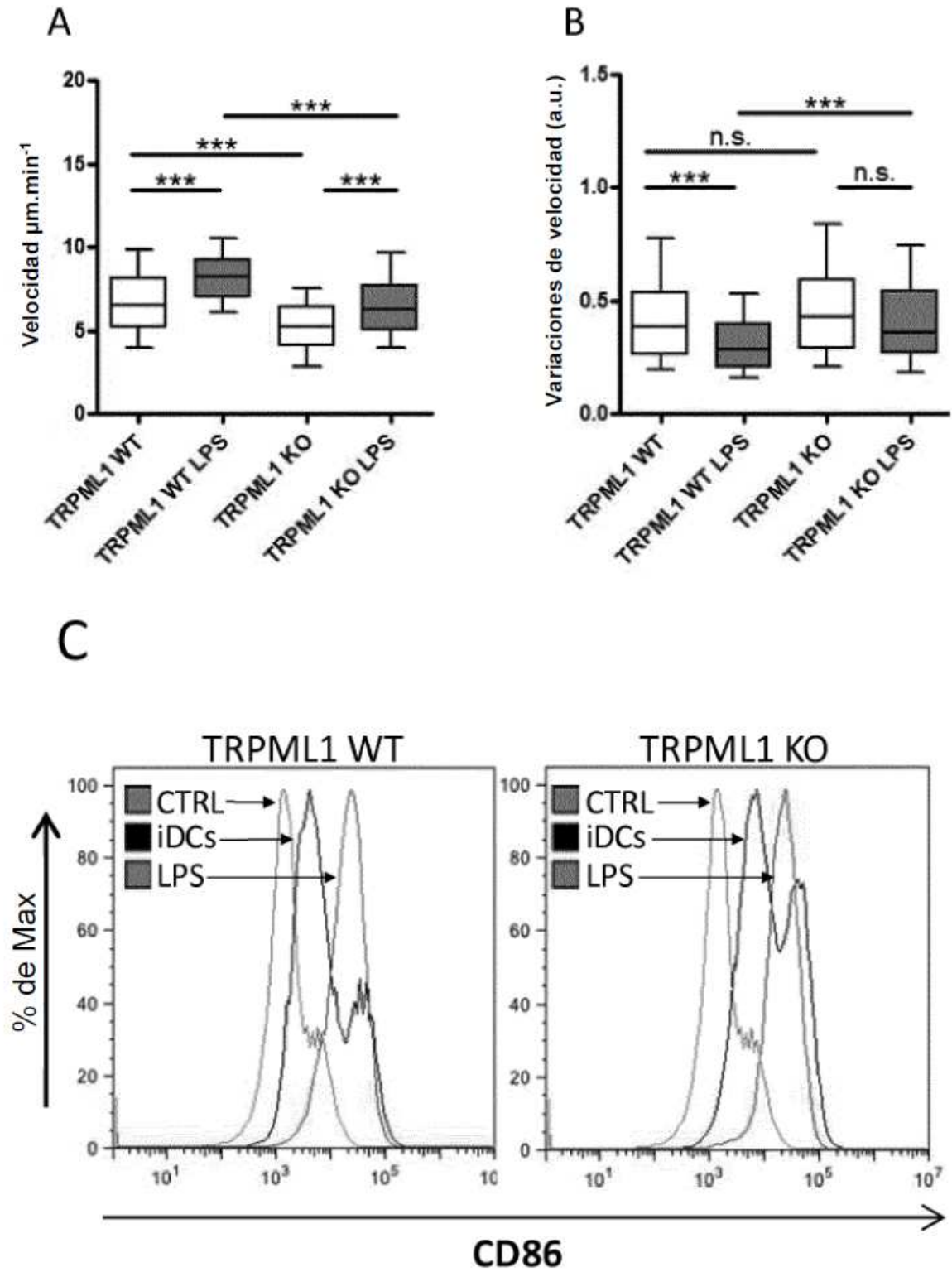
<400> 6
gaucucacccc ucuuggaaa 19

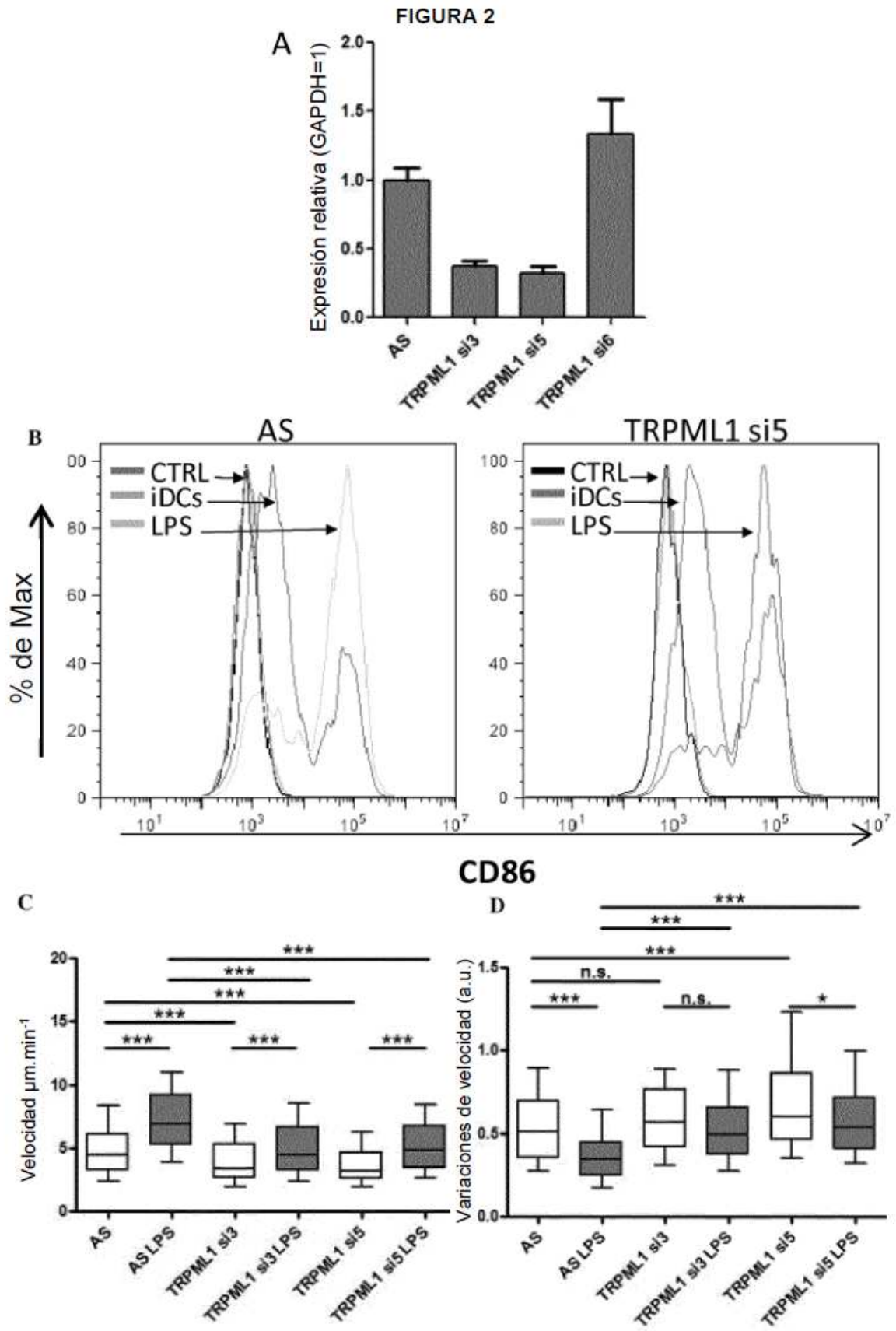
15

REIVINDICACIONES

1. Una molécula que activa directamente Mcoln-1 para su uso en la mejora de la migración de células dendríticas en la vacunación, especialmente la vacunación antitumoral, o para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, en el que la molécula se selecciona del grupo que consiste en ML-SA1 y SF-51.
- 5 2. La molécula para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula es ML-SA1.
3. La molécula para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que las células son células dendríticas inmaduras.
4. La molécula para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la vacunación es una vacuna antitumoral.
- 10 5. La molécula para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la enfermedad infecciosa es una infección viral o bacteriana.
6. Un método para identificar una molécula capaz de activar directamente Mcoln-1 y mejorar la migración de células dendríticas, comprendiendo el método:
- 15 - determinar el efecto de una molécula sobre la actividad de Mcoln1 y seleccionar la molécula si aumenta la actividad de Mcoln1; y
- determinar el efecto de la molécula seleccionada sobre la migración o la velocidad de las células dendríticas y seleccionar la molécula si aumenta la velocidad o la migración de las células dendríticas.
7. Una molécula de ácido nucleico que inhibe directamente a Mcoln-1 al disminuir o suprimir la expresión de la proteína Mcoln-1 para usar en la inhibición de la migración de las células tumorales en el tratamiento del cáncer, en la que la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en un ARNip o un shRNA antisentido, disminuyendo o suprimiendo así la expresión de la proteína Mcoln-1.
- 20 8. La molécula para usar de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en la prevención o disminución de la metástasis.
9. Molécula para usar según la reivindicación 7 u 8, en la que la molécula de ácido nucleico es un siARN.
- 25 10. La molécula para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el siARN se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
11. Un método para identificar una molécula capaz de disminuir la migración celular, comprendiendo el método:
- determinar el efecto de una molécula sobre la actividad de Mcoln1 y seleccionar la molécula si disminuye la actividad de Mcoln1; y
- 30 - determinar el efecto de la molécula seleccionada sobre la migración o la velocidad de las células dendríticas y seleccionar la molécula si disminuye la velocidad o la migración de las células dendríticas.

FIGURA 1





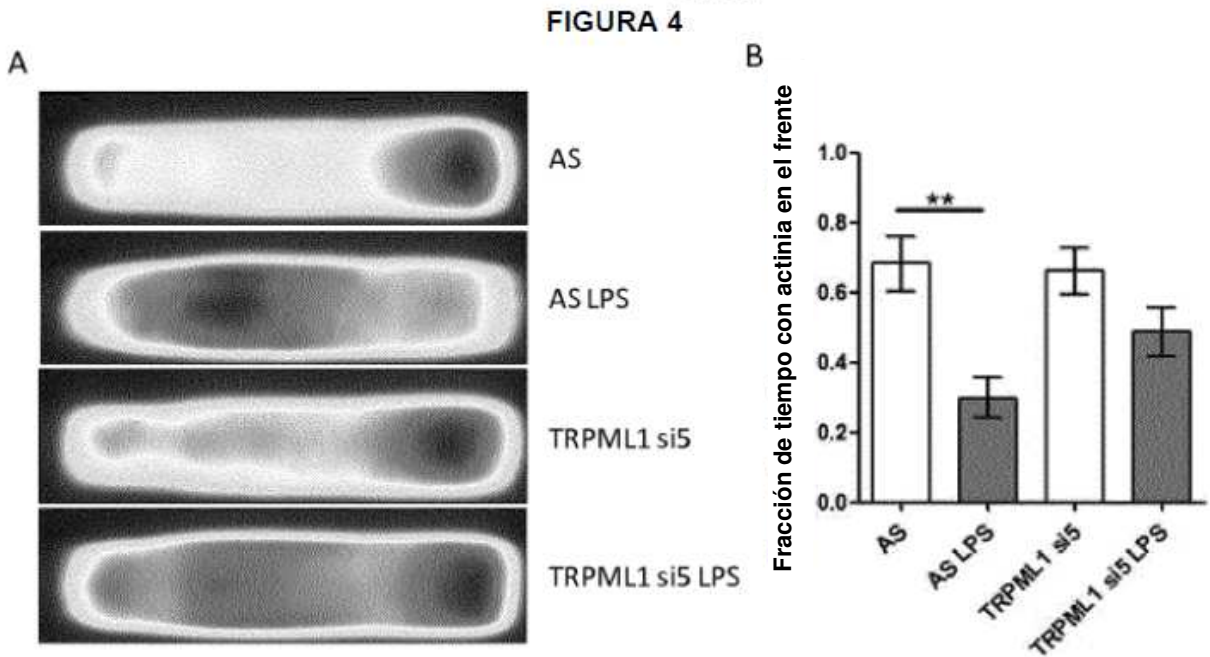
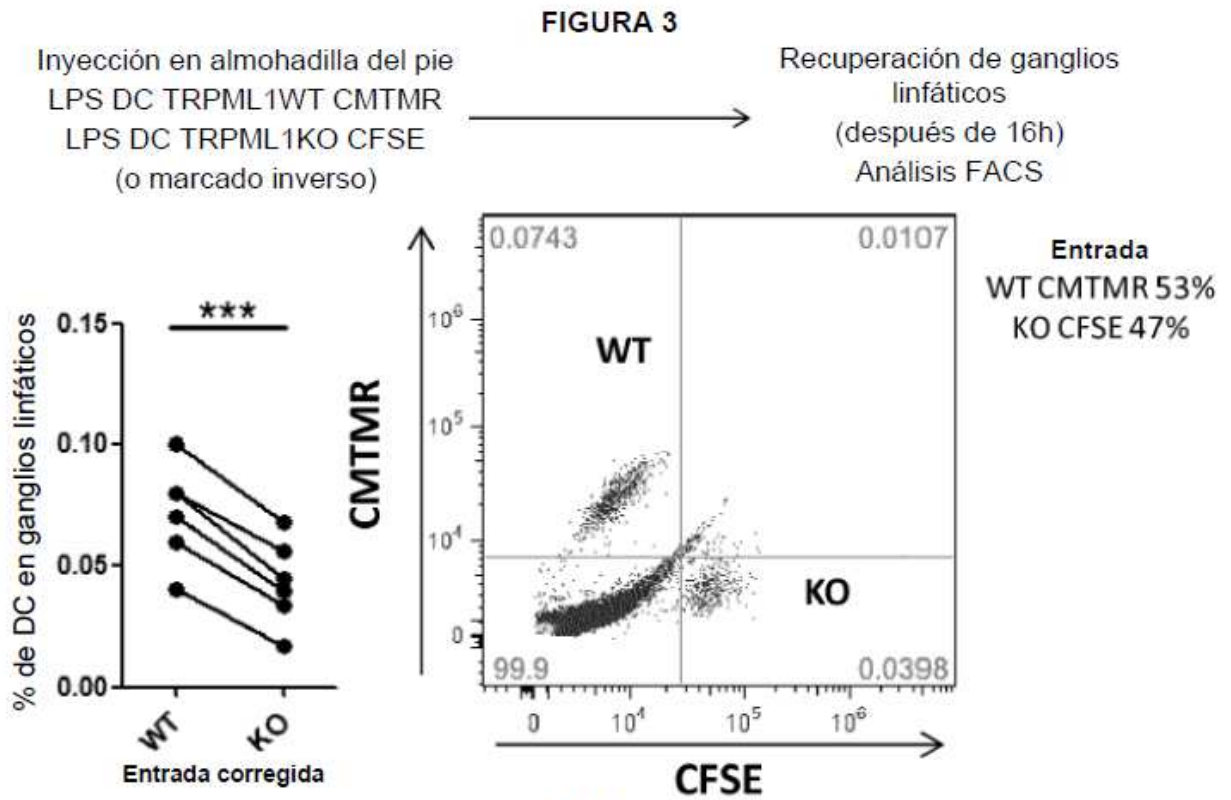
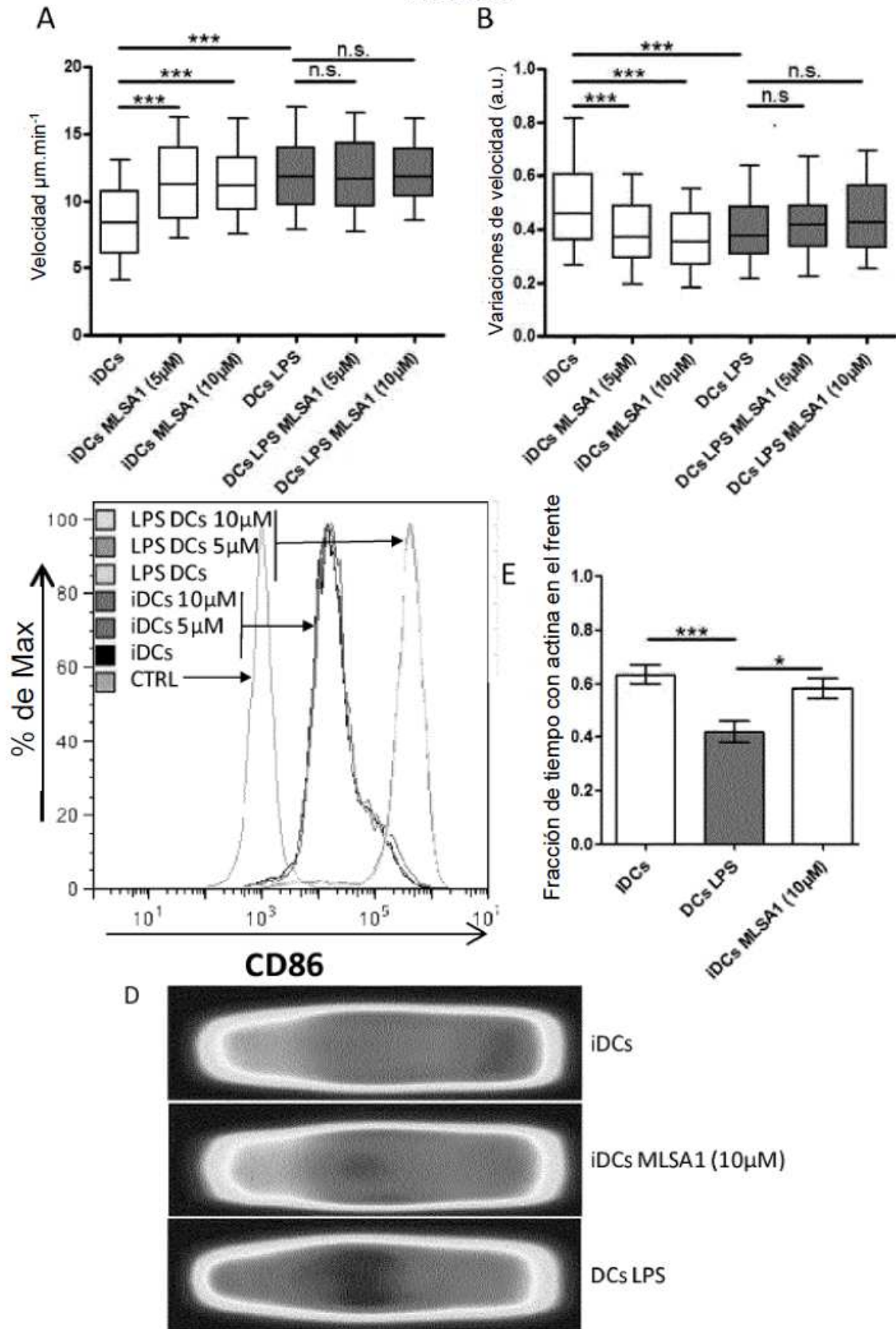
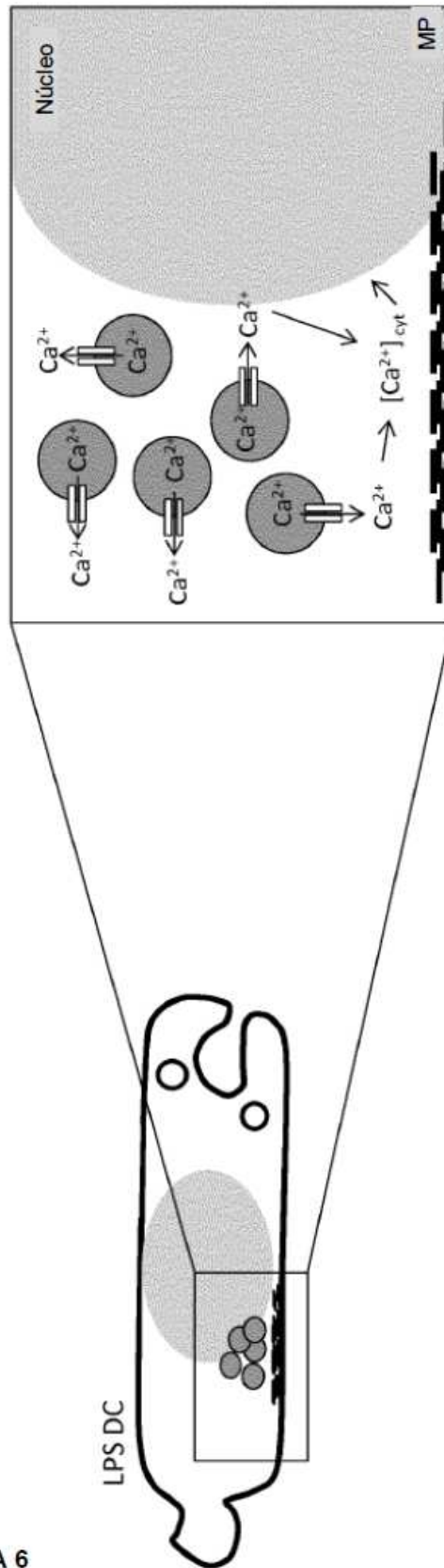


FIGURA 5





La polimerización de actina y el aumento de la capacidad de contracción en las células activadas con LPS podría basarse en la liberación de Ca^{2+} desde los lisosomas

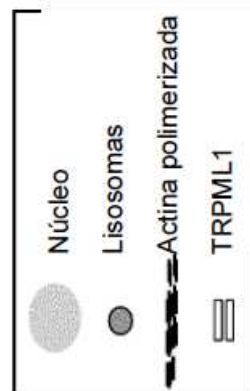


FIGURA 6

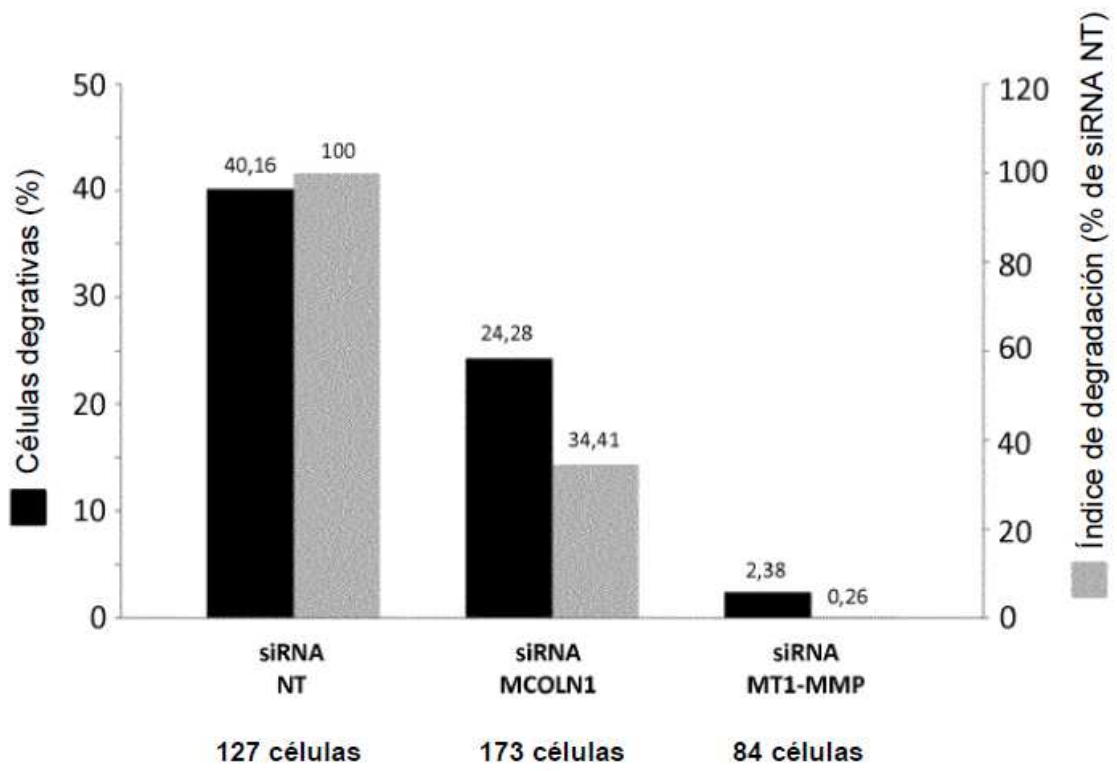


FIGURA 7