

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Abril de 2008 (03.04.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/037835 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01K 67/033 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)

Campus De Cantoblanco, E-28049 Cantoblanco (ES).
CULI ESPIGUL, Joaquín [ES/ES]; Instituto De Biología
Molecular Eladio Viñuela, Facultad De Ciencias. Uam
Campus De Cantoblanco, E-28049 Cantoblanco (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2007/070164

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de Septiembre de 2007 (27.09.2007)

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200602497
30 de Septiembre de 2006 (30.09.2006) ES

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante e

(72) Inventor: **GUERRERO VEGA, Isabel** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela, Facultad De Ciencias. Uam Campus De Cantoblanco, E-28049 Cantoblanco (ES).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **CALLEJO DE PRADO, Ainhoa Itziar** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela, Facultad De Ciencias. Uam

(54) Title: NON-HUMAN ANIMAL MODEL WHICH CAN BE USED TO IDENTIFY PHARMACEUTICAL COMPOUNDS WHICH REGULATE THE HEDGEHOG PATHWAY, AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Título: MODELO ANIMAL NO HUMANO ÚTIL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FARMACÉUTICOS REGULADORES DE LA VÍA HEDGEHOG Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The present invention describes a non-human animal model which can be used to identify pharmaceutical compounds which regulate the formation, diffusion and reception of lipoproteic particles using hedgehog. These pharmaceutical compounds which regulate the formation, diffusion and reception of lipoproteic particles using hedgehog can be used to make a medicament for treating human diseases, preferably cancer.

(57) Resumen: La presente invención describe un modelo animal no humano útil para la identificación de compuestos farmacéuticos que regulan la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh. Estos compuestos farmacéuticos reguladores de la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh se pueden utilizar para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas, preferentemente el cáncer.

WO 2008/037835 A1

TÍTULO

MODELO ANIMAL NO HUMANO ÚTIL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FARMACÉUTICOS REGULADORES DE LA VÍA HEDGEHOG Y SUS APLICACIONES

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

Identificación de compuestos farmacéuticos mediante modelos animales no humanos, en particular en *Drosophila*. Sector biotecnológico y farmacéutico.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

La activación de la vía de señalización de la proteína Hedgehog (Hh) es clave en la inducción de patrones morfogénéticos y en los procesos de proliferación celular y modula y promueve la oncogénesis y otras enfermedades en humanos (Torroja et al., 2005, *J Neurobiol*, 64, 334-356). Por otro lado, la señalización o transmisión de señales mediante la proteína Hedgehog (Hh) se relaciona con los lípidos de diferentes maneras. La proteína Hh es sintetizada a partir de un precursor que sufre un proceso autoproteolítico, siendo doblemente modificada tanto por la adición de un grupo colesterol en su extremo C-terminal y por palmitoilación en su extremo N-terminal (Figura 1, ver Mann and Culi, 2005). La secreción de Hh modificada por lípidos tiene lugar por la mediación de una proteína transmembrana denominada Dispatched (Disp) (Burke et al., 1999, *Cell* 99(7), 803-815). Esta proteína tiene un dominio sensible a esterol (SSD) al igual que el receptor de Hh, la proteína Patched (Ptc), y otras proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos y colesterol y en el tráfico vesicular. Por otro lado, las modificaciones lipídicas de Hh son esenciales para la interacción entre Hh y los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs) para controlar la

actividad de difusión y señalización de morfogenos (Callejo et al., 2006, *Development* 133, 471-483).

Recientemente, las partículas lipoproteicas han sido propuestas como transportadoras de ligandos modificados con
5 lípidos desde la superficie celular, actuando de esta manera como vehículos de transporte de un amplio rango de elementos (Eaton, 2006, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 17-22). Desde este punto de vista los lípidos pueden ser necesarios para cargar la proteína Hh a estas partículas (Panakova et
10 al., 2005, *Nature* 435, 30-33; Despande and Schell, 2005, *Developmental Cell* 9, 629-638). La proteína Hh modificada por lípidos y cargada en partículas lipoproteicas interactúa con la proteína Shifted, un nuevo componente de la matriz extracelular que colabora con HSPGs para la
15 estabilización y difusión a través de la matriz extracelular. (Gorfinkiel et al., 2005, *Developmental Cell* 8, 241-253; Glise et al., 2005, *Developmental Cell* 8, 255-266). Las modificaciones lipídicas en la proteína Hh se requieren además para la óptima interacción y
20 reconocimiento de Ptc durante su recepción intracelular (Callejo et al., 2006, *Development* 133, 471-483). Por otro lado, se ha sugerido que el receptor LDLR pudiera estar asociado al receptor Ptc (Eaton, 2006, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 17-22).

25 En ausencia del ligando Hh la proteína Ptc inhibe a la proteína Smoothened (Smo) y no hay señales de activación de esta vía. La unión covalente de colesterol a Hh facilita la unión de ésta a la membrana y permite el reconocimiento a Ptc lo que permite que la proteína Smo se libere y pueda
30 dar la señal para su activación. Recientemente, se ha observado que los esteroides podrían mediatizar la inhibición de Smo al mismo tiempo que se ha sugerido la enzimas para la biosíntesis de colesterol pudieran estar implicadas en la regulación de la inhibición de Smo por Ptc

(Biljsma et al., 2006, PLOS Biology 4(8), 1397-1410). Es mas, se ha observado que dependiendo de que tipo de lípidos se trate, estos pueden actuar de agonistas o antagonista de la señalización de Hh pero su mecanismo de acción permanece sin resolver.

En este sentido, el incremento del conocimiento de la modulación de los lípidos en la interacción de la proteína Hh con sus receptores de membrana o intracelulares o con la proteína Smo permitiría avanzar en el desarrollo de herramientas útiles para el diagnóstico y tratamiento de tumores humanos, u otras patologías humanas en las que jugara un papel etiopatogénico.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Descripción Breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un modelo animal no humano útil para la identificación de compuestos farmacéuticos reguladores de la vía hedgehog, en adelante modelo animal de la invención, caracterizado porque permite la identificación compuestos que regulan la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención que presenta una incapacidad de sintetizar esteroides provocada por una ausencia de las enzimas implicadas, necesidad que es reemplazada de forma artificial en la dieta del animal, y en el puede determinarse la señalización de la vía Hh y Smo. Esta incapacidad de sintetizar esteroides está provocada por la ausencia evolutiva de las enzimas biosintéticas de estos compuestos.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención que presenta una modificación genética en, al menos, un gen de la vía de

señalización de Hedgehog que participa en la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, perteneciente a título ilustrativo y sin que limite la invención, al siguiente grupo: Ptc y Smo que bloquean o
5 estimulan la vía de señalización de la proteína Hh.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del modelo animal de la invención, en adelante uso de la invención, para la identificación de compuestos farmacéuticos reguladores de la formación, difusión y
10 recepción de partículas lipoproteicas con Hh.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la invención que comprende las siguientes etapas:

i) adición a la dieta del animal del compuesto candidato a determinar su acción sobre la señalización de
15 Hh,

ii) una etapa, opcional, de inducción del gen de interés relacionado con la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, cuando éste no sea constitutivo,

20 iii) determinación de una modificación del fenotipo o parámetro biológico característico de un normal o alterado funcionamiento de las partículas lipoproteicas con Hh, inducido en ii), e

iv) identificación de un compuesto regulador, ya sea
25 inductor o bloqueante, si se produce la modificación del fenotipo en iii).

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso de los compuestos farmacéuticos reguladores de la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas
30 con Hh para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas, preferentemente el cáncer o cualquier otra donde estuviera implicada esta regulación.

Descripción Detallada

Así, para demostrar la importancia de los lípidos en la señalización de la proteína Hh, se ha manipulado genéticamente la actividad de las enzimas que controlan la producción de lípidos en el disco imaginal de *Drosophila*. En este sentido, es conocido que SREBP (Sterol-regulatory element binding protein) es un factor de transcripción que controla múltiples genes implicados en el metabolismo lipídico, como el gen de la HMGCoA reductasa o del receptor LDL. Recientemente, se ha sugerido que la HMGCoA reductasa regula la señalización por Hh (Despande and Schell, 2005, *Developmental Cell* 9, 629-638).

La presente invención se basa en la demostración de la importancia de la adecuada interacción de la proteína Hh, con lípidos y con lipoproteínas y la consiguiente formación de partículas lipoproteicas para la correcta liberación y difusión a la matriz extracelular de Hh y su posterior internalización y/o regulación de las proteínas Ptc y Smo en las células receptoras, llevada a cabo en distintos modelos de señalamiento de Hh (ver Ejemplos). En primer lugar, se ha encontrado que la proteína Hh en el entorno extracelular se estabiliza tras la sobreproducción de lípidos mediante la sobreexpresión del factor de transcripción SREBP o de la enzima HMGCoA reductasa. En línea con lo anterior, la disminución de los niveles de los productos de estos genes rescata el fenotipo causado por el incremento de la producción de Hh (Figura 3, 4, 6 y 9, ver Ejemplo 1).

Además, se ha estudiado el papel de las lipoforinas (Lp), las lipoproteínas de *Drosophila*, en la señalización de Hh en el disco imaginal del ala, un tejido que no expresa Lp pero que la obtiene de la hemolinfa (Ejemplo 1.4). La lipoforina es la principal lipoproteína transportadora de lípidos en insectos. La lipoforina

transporta en su núcleo hidrofóbico lípidos neutros como esteroides, ácidos grasos y azúcares (Arrese et al., 2001, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 7-17). Para ello, se inhibió la Lp mediante RNA de interferencia, reduciendo así el aporte de la hemolinfa; y mediante la sobreexpresión del receptor 2 de lipoforina (LpR2), el principal receptor de Lp expresado en las células del disco, con objeto de incrementar su endocitosis y reducir así la cantidad de Lp libre en la matriz extracelular de los discos. Bajo estas condiciones la proteína Hh secretada no es estable en la matriz extracelular, sugiriendo que la proteína Hh precisa ser empaquetada con Lp, formando partículas lipoproteicas, en las células productoras para una correcta difusión y estabilización de la proteína Hh en la matriz extracelular.

Además, se ha testado la implicación de los receptores LDL (megalina) en la señalización de la proteína Hh y se ha encontrado, sorprendentemente, que la mesalina no está implicada en la señalización e internalización de la proteína Hh (Figura 5) y que ésta es capaz de internalizarse en las células sin necesidad de este receptor (Figura 8).

Por otro lado, se observó que la proteína Patched (Ptc) y la lipoproteína lipoforina son capaces de co-inmunoprecipitar, detectándose la forma de lipoforina 75 Kda (Figura 11, ver Ejemplo 3). Finalmente, y como resultado sorprendente de la presente invención se ha demostrado que el receptor de Hh, la proteína Patched (Ptc), es un nuevo receptor de lipoproteínas, siendo capaz de internalizar activamente lipoproteínas (lipoforina en insectos) al compartimento endocítico, que serían capaces de transportar lípidos al interior de la célula donde regularían la actividad de la proteína Smo (Figura 8 y 11), en una vía independiente de Hh. Sin embargo, utilizando

distintos mutantes de Ptc se observó que la internalización de Lp no juega un papel principal en la transducción de señal de Hh aunque si parece que lo tiene en la difusión de Hh.

5 Como conclusión, en la presente invención se propone que la proteína Ptc actúa no solo como un receptor de Hh sino además como un transportador de lípidos al interior de la célula, los cuales podrían modular la actividad de Smoothened (Smo) y convertirse así en potenciales
10 compuestos farmacéuticos útiles para el tratamiento de enfermedades humanas, como por el cáncer (Pasca di Magliano, M. & Hebrok, M. (2003) Nat Rev Cancer 3, 903-11) o cualquier otra en la que se encontrara esta proteína Smo implicada.

15 Basado en los resultados de la invención que indican que los esteroides y otros lípidos son necesarios para el correcto funcionamiento de la vía de Hedgehog y de la actividad Smo y dada ciertas características de la mosca *Drosophila melanogaster* se puede desarrollarse un modelo
20 animal útil no humano (mosca) para la identificación de compuestos farmacéuticos reguladores de la vía Hedgehog y Smo, más concretamente, para hacer un rastreo de compuestos que participen en la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh y que pudieran modular
25 dichas vías, por ejemplo esteroides, y ácidos grasos. Pudiéndose llevar a cabo desde varias aproximaciones en función del punto de regulación de la señalización de Hh analizado, tanto genéticamente como mediante administración de drogas o compuestos candidatos a medicamentos. Otra
30 ventaja del presente modelo es que la vía de Hedgehog es fundamental para la morfogénesis de todas las estructuras de la mosca, por lo que representa un modelo muy versátil.

 En primer lugar, este modelo animal no humana se basaría en la inhibición del gen o genes implicados en la

síntesis de lípidos, por ejemplo, el gen de la proteína SREBP ó HMGCóA reductasa, entre otros. Es decir, mediante la mutación del gen que impide la expresión de las proteínas necesarias para la síntesis de lípidos en los animales mutados (*Drosophila*). Además, como la mosca silvestre no es capaz de sintetizar esteroides, este tipo de compuestos los tiene que obtener de la dieta. Ya que el colesterol es clave para su supervivencia, la mosca debe tener un sistema eficiente de incorporación de compuestos lipídicos. Para este rastreo se puede proponer que los compuestos lipídicos a ensayar (a título ilustrativo, oxysteroides, Vitamina D3, Colesterol, Ergosterol, etc.) se disuelvan en los botes que contienen la papilla en la que normalmente se cultiva *Drosophila*. Los huevos de *Drosophila* son depositados por la madre en la papilla y una vez terminado su desarrollo embrionario, estos eclosionan del huevo y comienzan a moverse, comer y desarrollarse en este medio durante todo el periodo larvario.

Las estructuras adultas de la mosca adulta (patas, ojos alas, antenas, genitalia, etc.) se desarrollan durante el periodo larvario, dentro de la larva, a partir de los discos imaginales que son estructuras que contienen las células embrionarias precursoras de las estructuras adultas. Es, por tanto, durante el desarrollo larvario cuando se puede alterar mediante drogas el desarrollo morfogénico de la mosca adulta, las cuales se añadirían a dicha papilla. Estas manipulaciones pueden dar como resultado una alteración morfogénica que se manifiesta en la mosca adulta y que puede ser identificada fácilmente por un técnico en la materia, es decir, en biología del desarrollo.

Las construcciones genéticas y vectores necesarios para llevar a cabo el desarrollo del modelo animal de la invención pueden obtenerse por un experto medio mediante el

empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook et al. "Molecular cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Sping Harbor Laoratory Press, N.Y., 1989 vol 1-3).

5 El modelo de Drosophila mutante para el gen SREBP, por ejemplo, el modelo Drosophila HLH106line52 descrito en la presente invención (Ejemplo 1), es incapaz de sintetizar ácidos grasos por lo que no solo el colesterol sino los ácidos grasos tienen que ser suministrados en la dieta para
10 la supervivencia de estas moscas mutantes SREBP, pudiéndose definir la composición de distintas dietas de lípidos que analizando de forma conjunta su implicación en la actividad de la vía Hh permitiría identificar qué lípido en concreto regula, inhibiendo o induciendo, dicha vía, el cual se
15 convertía en un principio activo de una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades humanas, como el cáncer.

Por otro lado, como segundo modelo animal no humano de la invención útil para la identificación de compuestos
20 reguladores de Hh, se pueden desarrollar nuevos modelos de mosca en los que la manipulación genética (por ejemplo, utilizando el sistema UAS-Gal4 de levadura, cruzando moscas con distintas mutaciones) permite obtener moscas en las que se han alterado genes de la vía de Hedgehog que, como se
25 acaba de demostrar en la invención, están regulados por compuestos en la participan en la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, y que con promotores específicos de tejido solo se expresarían en las células precursoras de alguna estructura del cuerpo, sin
30 afectar al resto, posibilitando su viabilidad y facilitando el uso del mismo. En los experimentos de la presente invención, por ejemplo, se ha manipulado la expresión de forma específica en el disco del ala de la mosca, aunque para un técnico en la materia, es decir, en biología del

desarrollo y que utilice la mosca *Drosophila* como modelo de trabajo, desarrollar modelos en otros tejidos distintos basados en esta invención no representa una complicación.

En este sentido, como otro ejemplo, se puede obtener moscas que sobreexpresen elementos de la vía de Hedgehog en otros tejidos, por ejemplo, los ojos, y como consecuencia de esta expresión anómala obtener un fenotipo en los ojos y no en otra parte del cuerpo de la mosca. Así, sobreexpresando Patched (receptor de la vía de Hedgehog) tal como se ha hecho en la presente invención (ver Ejemplo 3) con un promotor específico de ojo se obtendrían moscas con ojos muy reducidos, ya que Patched bloquea constitutivamente la vía de Hedgehog, impidiendo el desarrollo normal del ojo. Por el contrario, la sobreexpresión de Smoothened (Smo) que actúa de modulador positivo de la vía de Hedgehog daría lugar a moscas con ojos aberrantemente grandes (Martín V, Carrillo G, Torroja C, Guerrero I. The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothened activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol.* 2001 Apr 17; 11(8):601-7). En este sentido, también podrían utilizarse formas mutadas de estos genes como los utilizados en la presente invención (ver ejemplo 3, entre otros, la forma mutada PtcSSD) que constitutivamente activados pueden bloquear o inducir la vía de Hedgehog. Como es durante el desarrollo larvario cuando tiene lugar la morfogénesis del ojo, sería posible encontrar un compuesto que regulará la vía de Hh, positiva o negativamente, suministrándolo en el medio de cultivo. Si algún compuesto fuera capaz de modular los fenotipos causados por la sobreexpresión de los elementos de la vía de Hedgehog podríamos identificarlos como posibles drogas terapéuticas.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un modelo animal no humano útil para la identificación de

compuestos farmacéuticos reguladores de la vía hedgehog, en adelante modelo animal de la invención, caracterizado porque permite la identificación compuestos que regulan la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención que presenta una incapacidad de sintetizar lípidos provocada por una anulación genética de las enzimas implicadas, necesidad que es reemplazada de forma artificial en la dieta del animal, y en el puede determinarse la señalización de la vía Hh y Smo.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención que presenta una modificación genética en, al menos, un gen de la vía de señalización de Hedgehog que participa en la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, perteneciente a título ilustrativo y sin que limite la invención, al siguiente grupo: Ptc y Smo que bloquean o estimulan la vía de señalización de la proteína Hh.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención en el que los compuestos farmacéuticos reguladores de la vía hedgehog son útiles para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas, preferentemente el cáncer.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención que presenta una incapacidad de sintetizar lípidos provocada por la anulación genética, al menos, de una proteína perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: factor de transcripción SREBP y HMGCoA reductasa.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención que presenta una modificación genética, en al menos un gen de la vía de señalización de Hedgehog que participan en la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, que induce la sobreexpresión de, al menos, uno de ellos, perteneciente a título ilustrativo y sin que limite la invención, al siguiente grupo: Ptc y Smo que bloquea o estimula la vía de señalización de la proteína Hh.

10 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención donde el animal pertenece al siguiente grupo: mosca *Drosophila megalobaster*, ratón, pollo y pez cebra.

15 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención donde la modificación genética es específica de tejido mediante el uso de promotores de expresión específicos de tejido o célula.

20 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención donde el compuesto objeto de identificación pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: lípidos, esteroides, ácidos grasos y azúcares. Entre los esteroides podrían analizarse por ejemplo, oxysteroides, Vitamina D3, colesterol, ergosterol, etc. y derivados de los mismos

25 Una realización más particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención donde el modelo es *Drosophila megalobaster* con una modificación genética consistente en la sobreexpresión de Ptc, específica del disco del ala u ojo del animal, y bloqueante de la señalización de la proteína Hh.

Otra realización más particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención

donde el modelo es *Drosophila megalobaster* con una modificación genética consistente en la sobreexpresión de Smo, específica del disco del ala u ojo del animal, e inductora de la señalización de la proteína Hh.

5 Otra realización más particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención donde el modelo es *Drosophila megalobaster* con una modificación genética consistente en la sobreexpresión de una forma mutada de Ptc, por ejemplo, PtcSSD, específica
10 del disco del ala u ojo del animal, e inductora de la señalización de la proteína Hh.

Otra realización más particular de la presente invención lo constituye el modelo animal de la invención donde el modelo es *Drosophila megalobaster* con una
15 modificación genética consistente en la anulación o mutación genética del factor de transcripción SREBP, y más particularmente, el mutante de *Drosophila* HLH106 (HLH106line52).

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del
20 modelo animal de la invención, en adelante uso de la invención, para la identificación de compuestos farmacéuticos reguladores de la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh.

Otro objeto particular de la invención lo constituye
25 el uso de la invención que comprende las siguientes etapas:

i) adición a la dieta del animal del compuesto candidato a determinar su acción sobre la señalización de Hh,

ii) una etapa, opcional, de inducción del gen de
30 interés relacionado con la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, cuando éste no sea constitutivo,

iii) determinación de una modificación del fenotipo o parámetro biológico característico de un normal o alterado

funcionamiento de las partículas lipoproteicas con Hh, inducido en ii), e

iv) identificación de un compuesto regulador, ya sea inductor o bloqueante, si se produce la modificación del fenotipo en iii).

Otra realización particular de la invención lo constituye el uso de la invención en el que el fenotipo ó parámetro biológico determinado en iii) pertenece al siguiente grupo: determinación del desarrollo del disco imaginal del ala y tamaño del ojo de una mosca.

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso de los compuestos farmacéuticos reguladores de la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas, preferentemente el cáncer o cualquier otra donde estuviera implicada esta regulación.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Esquema de producción, transporte e interacciones de la proteína Hh.

Figura 2.- Se describe un esquema de las proteínas que comparten el motivo transmembrana Sterol Sensing Domain (SSD). Las proteínas NPC1, HMG CoA reductasa y SCAP están involucradas en el transporte de esteroides, tráfico y metabolismo, mientras que Patched, receptor de la proteína Hh, y Dispatched, proteína que secreta a Hh, participan en la señalización de Hh.

Figura 3.- Rescate del señalamiento de Hh en moscas *Drosophila* mutantes para la proteína *shifted* (shf^{EY}) que sobreexpresan la enzima HMGCoA reductasa en el disco imaginal del ala (shf^{EY} ; $apGal4/UAS-hmgcr$).

Figura 4.- Rescate del señalamiento de Hh mediante la sobreexpresión de HMGCoA reductasa (shf^2 ; $UAS-HMG CoA/Hh-$

Gal4) en un modelo mutante *shifted* del ala de *Drosophila* en el compartimiento posterior del ala (*shf*²).

Figura 5.- El receptor de LDL, α -megalina no es un co-receptor para la proteína Hh en *Drosophila*. Estudio de la pérdida de la función en los clones *Drosophila* mutantes *dor*, con proteína fluorescente (FRT18*dor*8/FRT18*arm*LacZ; apGal4/UAS-HhGFP); sin colesterol (FRT18*dor*8/FRT18*arm*LacZ; apGal4/UAS-HhNGFP) y sin ácido palmítico (FRT18*dor*8/FRT18*arm*LacZ; apGal4/UAS-HhC85SGFP).

Figura 6.- Los fenotipos de ganancia de función de Hh se rescatan mediante la disminución de la síntesis de lípidos. Hh^{Mrt}; HLH106line52, mosca mutante.

Figura 7.- Gradiente de glicerol (30-15%) para la detección de la proteínas α -Hh y α -lipoforina. Una vez precipitadas, las fracciones fueron testadas mediante Western blots para detectar la presencia de las proteínas α -Hh y α -Lipoforina usando anticuerpos específicos.

Figura 8.- La proteína Hh se internaliza en ausencia del receptor megalina/LPR2. 8.a) doble mutante *dor*-; megalina. Hh, Hh normal; HhN, Hh sin colesterol. 8.b) Esquema de la estructura proteica de los miembros de la familia de los receptores de lipoproteínas: LDLR, VLDLR, ApoER2, LRP1, Mesalina y LRP5/6.

Figura 9.- Efecto de la disminución de la síntesis de lípidos en los niveles extracelulares de la proteína Hh. Imágenes de disco imaginal del ala en *Drosophila* control (wild-type, hhGal4; UAS-HhGFP/TM6b)) y en *Drosophila* mutantes HLH106 (hhGal4; UAS-HhGFP/HLH106line52).

Figura 10.- La proteína Patched (Ptc) es capaz de internalizar la lipoproteína lipoforina (Lp) tan eficazmente como lo lleva a cabo el receptor de lipoforina (LpR). apGal4/UAS-PtcWt (control), apGal4/UAS-Ptc14 (forma mutada de Ptc) y apGal4/UAS-LpR.

Figura 11.- La proteína Patched (Ptc) interacciona con la Lipoforina (Lp) e induce su internalización. A) Disco imaginal del ala de *Drosophila* hh-Gal4/UAS-Hh-GFP teñido por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Ptc (azul) y anti-ApoLI-II (rojo) que muestra la colocalización en el borde del compartimento A/P de Hh-GFP (verde), Ptc, y ApoL en estructuras punteadas apicales. B) Disco imaginal de larvas ApGal4/UAS-PtcWT-GFP; TubGal80ts (incubado durante 24 horas a temperatura restrictiva) acumula Lp (ApoLI-II) (rojo), Ptc-GFP (verde) y Hh (azul), las flecha amarillas indican la co-localización en estructuras punteadas). C) Co-localización de Ptc (verde) y Lp (ApoLI-II) (rojo) con un marcador del compartimento endocítico temprano Hrs (azul) en un disco imaginal del mismo genotipo que en B. D) Disco imaginal ApGal4/UAS-Rab7-GFP; TubGal80ts/UAS-PtcWT mostrando la co-localización de las proteínas Lp (ApoLI-II) (rojo) y Ptc (azul) usando anticuerpos específicos contra estas proteínas con Rab7-GFP (verde) (marcador de compartimento endocítico temprano, indicad por puntas de flecha en la figura). E) Disco imaginal de genotipo ApGal4/UAS-PtcS2-GFP; TubGal80ts (después de 24 horas a temperatura restrictiva) teñido por inmunofluorescencia con anticuerpos contra Hh (azul) y contra-ApoLI-II (rojo). Observar que PtcS2-GFP (verde) también acumula Lp (ApoLI-II) y Hh, (PtcS2 tiene una mutación puntual en el SSD). F) Disco imaginal de genotipo ApGal4/UAS-Ptc14-GFP; TubGal80ts (24 horas a temperatura restrictiva) que sobreexpresa la proteína mutante Ptc14-GFP, que es defectiva en internalización, se puede observar que no puede internalizar ni Lp (ApoLI-II) (rojo) ni Hh (azul). (G) Ensayos de inmunoprecipitación (IP) y Western blot. Mw: marcador de peso molecular; carril IP1: inmunoprecipitación de un extracto de proteína de larvas de genotipo UAS-PtcWT-GFP; AB1Gal4 usando un anticuerpo α -GFP (ratón) y

desarrollado con un anticuerpo α -ApoLI-II (conejo). Se observa una banda de más de 200kDa (punta de flecha) que se corresponde con la subunidad ApoLI de mayor peso molecular; carril input: inmunoprecipitación de una fracción del mismo lisado. Se observan dos bandas, una de 200kDa (Apo-LI) y otra de 75kDa (Apo-LII), que se corresponden con cada uno de los dos monómeros de lipoforina; carril IP2: inmunoprecipitación de un extracto de proteína de larvas UAS-PtcWT-GFP; AB1Gal4 utilizando α -GFP (ratón) y Western Blot usando α -GFP (conejo). Se observa una banda cercana a los 200kDa que se coresponde con Ptc-GFP; carril IPC (control negativo): inmunoprecipitación de un extracto de proteína Ptc salvaje de glándulas salivares utilizando un anticuerpo α -GFP de ratón y detectado con un anticuerpo α -ApoLI-II. Las bandas de aproximadamente 55kDa en los carriles IP1, IP2 y IPC se corresponden con IgG.

Figura 12.- La reducción sistémica de Lp disminuye los niveles de Hh en el disco imaginal del ala. A, B) Hibridación in situ usando una sonda antisense-ApoLI-II en el disco del ala (A) y en el cuerpo gordo (B) de larvas control. C) Células del cuerpo gordo teñidas con el anticuerpo anti-ApoLI-II. Nótese la acumulación de la proteína ApoLI-II en estructuras vesiculares (inset). D-I) Expresión de Lp (D, E), Hh (F, G) y Ptc (H, I) en discos imaginales del ala de los controles (D, F y H) y de larvas HS-Gal4; UASLpRNAi después de dos golpes de calor antes de la disección (E, G y I). Nótese la disminución de los niveles de Hh y Ptc. J) representación gráfica de los niveles de Hh en los discos control y de larvas HS-Gal4; larvas UAS- LpRNAi (media de 6 discos, la barra de error representa las desviaciones estándar). K) Gráfico mostrando la intensidad de fluorescencia de Ptc a lo largo de del eje A/P de discos control (línea azul) o de larvas HS-Gal4; UAS- LpRNAi (línea rosa).

Figura 13.- LpR2 Ectópico incrementa la internallización de Lp en los discos imaginales de las alas y reduce los niveles de Hh extracelular. A) Inmunotinción de discos de alas de apGal4; TubGal80ts/UAS-LpR2-HA (24 horas de temperatura restrictiva) mediante un anticuerpo anti-HA para mostrar la expresión ectópica de LpR2 (verde) y un anticuerpo anti-ApoLI-II en rojo y gris. La caja superior muestra la acumulación de ApoLI-II en estructuras punteadas en el compartimiento dorsal. Secciones transversales muestran la localización de ApoLI-II en regiones apicales, laterales y basales de las células y de las vesículas endocíticas. B) Inmunotinción de un disco parecido con anticuerpo anti-HA (LpR2, verde) y anti-Hh (rojo y gris). Obsérvese la reducción de los niveles de Hh en el compartimiento dorsal-posterior (cabeza de flecha). C) Tinción extracelular de un disco parecido con un anticuerpo anti-Hh mostrando un sorprendente disminución de Hh extracelular (rojo y gris) causado por LpR2 ectópico (anti-HA, verde). Las cabezas de flecha marcan el compartimiento posterior-dorsal. D) Gráfico representativo de la intensidad de inmunofluorescencia Hh del compartimiento ventral (control) versus el dorsal de discos de alas de moscas UAS-LpR2-HA/apGal4; TubGal80ts. E) Discos de alas de moscas TubGal80ts/hh-Gal4, con Hh-GFP (24 horas de temperatura restrictiva) inmunoteñidos con un anticuerpo anti-Ptc (rojo y gris). Obsérvese que un gradiente de Hh-GFP (verde y gris) existe en el compartimiento A (barra blanca). F) Discos de alas de moscas TubGal80ts; hh-Gal4, Hh-GFP/ UAS-LpR2-HA teñidos con un anticuerpo anti-Ptc (rojo) y anti-HA para detectar la expresión de LpR2 (azul). Nótese que los niveles de Hh en el compartimiento P, el gradiente de Hh (barra blanca) y la expresión de Ptc están reducidas en comparación con lo observado en E. G) Tinción con anticuerpo anti-Ptc (rojo) de discos de ala de moscas

TubGal80ts /UAS-HhC85S-GFP, hh-Gal4, las cuales sobreexpresan una forma de Hh (verde y gris) sin ácido palmítico. H) Tinción con un anticuerpo anti-HA (LpR2, azul) y anti-Ptc (rojo) de discos de ala de moscas TubGal80ts; UAS-HhC85S-GFP, hh-Gal4/ UAS-LpR2-HA. Obsérvese que la sobreexpresión de LpR2 no alteró los niveles de HhC85S-GFP (verde y gris) en el compartimiento no modificó su gradiente en el compartimiento A. Sin embargo, la banda de expresión de Ptc es más estrecha cuando UAS-LpR2 es sobreexpresado, probablemente debido a que LpR2 reduce los niveles endógenos de Hh. I) Gráfico que muestra la variación en la intensidad de fluorescencia de Ptc a lo largo de eje A/P en discos de ala de moscas TubGal80ts; hh-Gal4, Hh-GFP (una media de discos, línea azul), en discos de ala de moscas TubGal80ts; hh-Gal4, Hh-GFP/ AS-LpR2-HA (una media de 10 discos, línea rosa) y en moscas TubGal80ts; h-Gal4/ UAS-LpR2-HA (una media de 5 discos, línea amarilla).

20 EJEMPLOS DE LA INVENCION

Ejemplo 1.- Regulación del rescate de la señalización de Hh mediante lípidos y su transporte en forma de partículas lipoproteicas.

1.1.- Rescate de la señalización de Hh en moscas *Drosophila* mutantes para la proteína *shifted* que sobreexpresan la enzima HMGC0A reductasa en el disco imaginal del ala (Figura 3).

El disco imaginal del ala de *Drosophila* es un modelo relativamente simple y conocido para el estudio de las relaciones y actividades de la proteína Hh. Los niveles de la proteína Hh en la superficie celular se encuentran reducidos en los mutantes *shifted* (Gorfinkiel et al., 2006, *Developmental Cell* 8, 241-253). La sobreexpresión de HMGC0A reductasa en un modelo mutante *shifted* en el compartimiento

posterior del ala provoca el rescate de la señalización de Hh (Figura 4). Los niveles de la proteína Hh en el disco imaginal del mutante que sobreexpresa la enzima HMGCoA reductasa (shf^{EY} ; $apGal4/UAS-hmgcr$) son similares a los observados en el grupo control (comparar tinción por inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-Hh en un disco silvestre) (Figura 3). Además, se observa que la señalización de Hh se recupera en estos discos (ver tinción por inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-Ptc).

10

1.2.- Los fenotipos de ganancia de función de Hh se rescatan mediante la disminución de la síntesis de lípidos (Figura 6).

En este caso se analiza el rescate de la función Hh en los mutantes de ganancia de función de Hh (Hh^{Mrt}) que muestra una expresión ectópica de Hh en la región dorsoventral del disco imaginal de ala. La reducción "one dose" de la expresión del gen SREBP (HLH106line52) en estos mutantes de Hh (Hh^{Mrt}) conlleva la obtención de un fenotipo prácticamente idéntico al que se observa en la mosca control (wild-type). Este resultado nos indica que el contenido total de lípidos de la mosca controlados por el gen SREBP es importante para la señalización de Hh, ya que disminuyendo a la mitad la función de SREBP se rescatan los fenotipos de ganancia de función de Hh.

Por otra parte, los mutantes en SREBP (HLH106line52) son letales larvarios en homocigosis, sin embargo se pueden rescatar esta letalidad administrando ácido oleico en la papilla (Kunte AS, Matthews KA, Rawson RB. Fatty acid auxotrophy in *Drosophila* larvae lacking SREBP. *Cell Metab.* 2006 Jun; 3(6):439-48). Estas moscas mutantes sobreviven sin ninguna síntesis de lípidos en su organismo pero adquiriendo de la dieta colesterol y ácido oleico como única fuente lipídica. Por ello, son una herramienta

30

importante para controlar que lípidos suministrados en su dieta sería capaces de alterar la vía de Hh una vez rescatada la letalidad con dosis bajas de colesterol y ácido oleico.

5

1.4.- Las lipoproteínas de la mosca (lipoforinas, Lp) forman partículas lipoproteicas con la proteína Hh que permite su difusión por la matriz extracelular.

Para analizar los requerimientos de Lp para el transporte de la proteína Hh en el disco imaginal de las alas, se redujo inicialmente, el suplemento de Lp mediante la expresión de RNAi frente ApoLI and ApoLII en el cuerpo graso (que es el el hígado de la mosca), que provocó la viabilidad de las larvas (datos no mostrados). Para resolver este problema se expresaron de forma transitoria iRNAs utilizando un promotor sensible al calor (heat-shock). Dos pulsos de expresión de RNAi frente a Lp antes de la disección del disco provocaron una disminución de los niveles de Lp en el disco imaginal (Figura 12E) y redujo además los niveles de Hh en el compartimiento P del disco imaginal de las alas (Figura 12G, comparado con la Figura 12F y Figura 12J), afectando además el rango de todas las respuestas de Hh (Figura 12I comparada con Figura 12H y 12K). Estos resultados están en desacuerdo con los publicados por Panakova et al., 2005 (Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C. & Eaton, S. (2005) Nature 435, 58-65) ya que este grupo no observa una disminución de los niveles de Hh al disminuir los niveles de Lp.

Para estudiar más en detalle los requerimientos de Lp de las células del disco imaginal, se indujo la sobreexpresión ectópica del receptor Lp2 (LpR2), uno de los dos LpR en la mosca, para eliminarla del espacio extracelular. Sin embargo, esta expresión de LpR2 indujo apoptosis (datos no mostrados). Para evitar esto último se

30

utilizó el sistema Gal4/Gal80ts. Un pulso a temperatura restrictiva inactiva la proteína represora Gal80, permitiendo que la proteína Gal4 active UAS-LpR2. Cuando LpR2 fue transitoriamente expresada durante 24 horas en el compartimiento dorsal de los discos del ala, no se observó la expresión de Caspasa 3 activada, un marcador de apoptosis (datos no mostrados). Como era de esperar la sobreexpresión de LpR2 incrementó la endocitosis de Lp, indicado por la acumulación de vesículas intracelulares conteniendo Lp (Figura 13A). Interesantemente, este LpR2 ectópico causó además una disminución de la cantidad total de Hh (Figura 13B y 13D), como se había observado previamente mediante RNAi (Figura 12D-K), principalmente a nivel extracelular (Figura 13C). Estos resultados sugieren que Lp es requerida para la estabilización de Hh en la matriz extracelular, probablemente permitiendo el empaquetamiento de Hh en las partículas de lipoproteínas. Además, si este fuera el caso, se podría esperar que las colas lipídicas de Hh fueran esenciales para mediar este efecto. De hecho, la expresión de LpR2 no desestabilizó la proteína Hh-GFP no modificada por lípidos cuando esta forma de Hh se co-expresó en el compartimiento P (Figura 13G y H).

Por el contrario, una forma proteica de Hh-GFP completamente lipídica respondió a la sobreexpresión de LpR2 como la Hh endógena, mostrando niveles disminuidos en el compartimiento P (Figura 13E y 13F) y una disminución del gradiente de Hh-GFP en el compartimiento A (Figura 13E, 13F, 13I). Ya que se sabe que las modificaciones lipídicas de Hh eran esenciales para que Hh interaccionara con los HSPG de la matriz extracelular (Callejo et al., 2006), estos datos sugieren que las modificaciones lipídicas de Hh son necesarias para el empaquetamiento de

Hh con Lp y su posterior interacción con los componentes de la matriz extracelular.

Para investigar si los niveles alterados de Lp podían afectar a la recepción de la señal de Hh y no sólo a su secreción, se sobreexpresó LpR2 exclusivamente en las células receptoras usando el vehiculizador *ptc-Gal4*. De esta forma se observó que el gradiente de Hh estaba ligeramente expandido comparando con los discos normales. Por tanto, se puede concluir que la sobreexpresión de LpR2 en las células receptoras probablemente disminuye la endocitosis de Hh por su receptor *Ptc*, incrementando así el rango del gradiente de Hh.

Ejemplo 2.- El receptor de LDL, α -megalina no es un co-receptor para la proteína Hh en *Drosophila*.

A continuación se procedió a analizar el papel del receptor de LDL, Megalin, como posible co-receptor de Sonic-Hh, propuesto en la literatura mediante el estudio de la pérdida de la función en los clones mutantes de *Drosophila deep orange (dor)*. La proteína Dor está involucrada en la maquinaria celular de degradación lisosomal. En los clones mutantes *dor*, la proteína Hh, y sus formas mutadas (HhN sin colesterol, y C85S sin el ácido palmítico), se acumularon en el compartimiento endocítico posterior (Figura 5). Se observa además que la proteína Megalina se incrementa en el interior de estos clones mutantes, y se colocaliza con Hh.

Se ha estudiado la internalización de la proteína Hh en los dobles clones mutantes *dor* y *megalina* (α -megalina). Se observó la acumulación de las proteínas Hh y HhN (forma de Hh sin colesterol) dentro del clon *Drosophila* doble mutante, debido a la internalización de la proteína Hh y a pesar de la ausencia del receptor megalina/LPR2 (receptor de lipoforina de *Drosophila*) (Figura 8). Este

mismo experimento se realizo con otros miembros de la familia de receptores LDL obteniendo resultados similares a los de Megalin (datos no mostrados). Por tanto, podemos concluir que ningún miembro de la familia de Receptores LDL
5 esta implicado directamente en la endocitosis de Hh.

Ejemplo 3.- La proteína Patched (Ptc) es capaz de internalizar la lipoproteína lipoforina (Lp) tan eficazmente como lo lleva a cabo el receptor de lipoforina
10 (LpR) (Figura 11).

Como Hh es transportado en partículas lipoproteicas es razonable pensar que un miembro de la familia LDLR pudiera modular la respuesta a Hh o interactuar con Ptc. El candidato para estudiar fue el receptor de lipoforina
15 (LpR). Ya que LDLR parece no estar involucrado en la recepción de Hh (Ejemplo 1), se analizó si la proteína Ptc por si misma era capaz de interactuar directamente con las partículas de lipoproteínas. Para investigar esta posibilidad se expresó de forma transitoria y ectópica Ptc
20 en el compartimiento dorsal del disco imaginal del ala usando el sistema Gal80ts/Gal4. Después de 24 horas y a temperaturas restrictivas se observó que la sobreexpresión de Ptc internalizaba activamente Lp (Figura 11B). Además, se encontró un alto porcentaje de colocación de Hh, Ptc
25 y ApoLs en vesículas endocíticas (Figura 11A y B) cuando se marcaron los endosomas con anticuerpo anti-Hrs (Lloyd T.E., A. R., Wu M.N., Zhou Y., Pennetta G., Bellen H.J. (2002) Cell 108(2), 261-9) (Figura 11c), o con el marcador Rab7-GFP (Entchev, E. V., Schwabedissen, A. & Gonzalez-Gaitan,
30 M. (2000) Cell 103 (6), pp. 981-991) (Figura 11D), marcador ambos del compartimento endocítico). Sin embargo, esta capacidad de Ptc para internalizar Lp es independiente de la presencia de Hh, como se ha visto por la endocitosis de Lp en células alejadas del límite del compartimento A/P,

donde no existe Hh. Sin embargo, en discos que no sobreexpresan, se observó todavía una fuerte colocalización de ApoL, Hh y Ptc en las vesículas endocíticas de las células del compartimento anterior, especialmente en el dominio más apical, donde se acumulan los endosomas tempranos (Figura 11E). Ya que Ptc internalizaba eficazmente Lp, entonces se quiso valorar si una interacción molecular era posible entre Ptc y ApoLI-II con estudios de inmunoprecipitación. Así, se observó que la proteína ApoLI fue inmunoprecipitada por Ptc en la glándulas salivares sobreexpresando Ptc-GFP (Figura 11G), lo que confirma la interacción entre ambas proteínas.

Para comprobar que la internalización de Lp era importante para la regulación de Smo se utilizaron dos mutantes de Ptc. PtcS2 contiene una mutación en su SSD que, por analogía con otras proteínas que contienen este mismo SSD, provoca que la proteína sea insensible a la modulación por esteroides (Kuwabara & Labouesse (2002) Trends Genet. 18, 193-201). Este mutante no puede reprimir la función de Smo pero es capaz de internalizar Hh. Después de la expresión ectópica de PtcSSD (PtcS2) se observó la internalización de Lp en un grado mayor que cuando se usó la forma salvaje PtcWT (Figura 11E). Por lo tanto, ambas formas de Ptc tanto la salvaje, que bloquea la vía Hh, como la mutada PtcSSD, que activa de forma constitutiva la vía Hh, internalizan Lp, indicando que esta es una propiedad de Ptc independiente de su función en la transducción de la señal Hh. El segundo mutante utilizado de Ptc fue Ptc14, que regula Smo en respuesta a Hh pero es defectivo en la endocitosis de Hh (Torroja, C., Gorfinkiel, N. & Guerrero, I. (2004) Development 131, 2395-408). Así, se encontró que la forma Ptc14 no fue capaz de internalizar Lp (Figura 11F), indicando que la internalización de Lp por Ptc no se requiere de forma absoluta para la regulación normal de

Smo, por lo que la internalización de Lp juega un papel menor en la transducción de señales de Hh.

MATERIAL Y MÉTODOS

- 5 Experimentos de sobreexpresión y generación de clones:
Se utilizó las siguientes *Drosophila*: UAS-LpRNAi obtenida de IMP Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC), Fat-body-Gal4 (Gronke, S., Beller, M., Fellert, S., Ramakrishnan, H., Jackle, H. & R.P., K. (2003) *Current*
10 *Biology*, 13 (7), , pp. 603-606), UAS-HhGFP (Torroja, C., Gorfinkiel, N. & Guerrero, I. (2004) *Development* 131, 2395-408) y UAS-HhC85S-GFP (Callejo, A., Torroja, C., Quijada, L. & Guerrero, I. (2006) *Development* 133, 471-83). Para desarrollar el transgén UAS-LpR2, el cDNA completo de LpR2
15 (EST line GH26833, obtenido de BDGP) se fusionó con el C-terminal HA tag y se clonó en el vector pUAST. Para la expresión transitoria de las construcciones UAS se usó Ap-Gal4 (o Ptc-Gal4); Tub Gal80ts se obtuvieron manteniendo los cruces a 18°C e inactivando el represor Gal80ts durante
20 16 a 24 horas a una temperatura restrictiva (29°C).
- Clones Mutantes: Los clones se generaron por recombinación mitótica mediada por FLP. Las larvas de cada correspondiente genotipo se incubaron a 37°C, durante una hora, 24- 48 horas después de la deposición de huevos por
25 las hembras (AEL). Los genotipos utilizados fueron: FLP; FRT 42D, ptc16 /FRT 42D, arm-lacZ and FLP; FRT 82, dispS037707/ FRT 82, ubi-GFP.
- Flip-Out clones: El transgén *ubx>f+>Gal4*, UAS-βgal (De Celis, J. F. (1998) *Int J Dev Biol* 42, 335-43) fue
30 utilizado para generar clones de expresión ectópica de las líneas UAS. Las larvas de los correspondientes genotipos se incubaron a 37°C durante 15 minutos para inducir recombinación mediada por HSFLP.

REIVINDICACIONES

- 1.- Modelo animal no humano útil para la identificación de compuestos farmacéuticos reguladores de la vía Hedgehog caracterizado porque permite la identificación compuestos
5 que regulan la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con la proteína Hh (Hh).
- 2.- Modelo animal según la reivindicación 1 caracterizado porque presenta una incapacidad de sintetizar lípidos provocada por la anulación genética de, al menos, de una
10 proteínas implicada, necesidad que es reemplazada de forma artificial en la dieta del animal, y en el puede determinarse la señalización de la vía Hh y Smo.
- 3.- Modelo animal según la reivindicación 1 caracterizado porque presenta una modificación genética, en al menos un
15 gen de la vía de señalización de Hedgehog que participan en la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, perteneciente a título ilustrativo y sin que limite la invención, al siguiente grupo: Ptc y Smo que bloquean o estimulan la vía de señalización de la
20 proteina Hh.
- 4.- Modelo animal según la reivindicación 1 caracterizado porque los compuestos farmacéuticos reguladores de la vía hedgehog son útiles para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas,
25 preferentemente el cáncer.
- 5.- Modelo animal según la reivindicación 2 caracterizado porque las proteínas anuladas genéticamente pertenecen al siguiente grupo: factor de transcripción SREBP y HMGCoA reductasa.
- 30 6.- Modelo animal según la reivindicación 3 caracterizado porque presenta una modificación genética en, al menos, un gen de la vía de señalización de Hedgehog que participa en la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, que induce la sobreexpresión de al

menos uno de ellos, perteneciente al siguiente grupo: Ptc y Smo que bloquea o estimula la vía de señalización de la proteína Hh.

5 7.- Modelo animal según las reivindicaciones 1 a la 6 caracterizado porque el animal pertenece al siguiente grupo: mosca *Drosophila megalobaster*, ratón, pollo y pez cebra.

10 8.- Modelo animal según las reivindicaciones 1 a la 7 caracterizado porque la modificación genética es específica de tejido mediante el uso de promotores de expresión específicos de tejido o célula.

15 9.- Modelo animal según las reivindicaciones 1 a la 8 caracterizado porque el compuesto objeto de identificación pertenece al siguiente grupo: lípidos, esteroides y ácidos grasos.

10.- Modelo animal según la reivindicación 9 caracterizado porque los esteroides pertenecen al siguiente grupo: oxysteroides, Vitamina D3, colesterol y ergosterol, y derivados de los mismos

20 11.- Modelo animal según la reivindicación 7 caracterizado porque el animal modelo es *Drosophila megalobaster* con una modificación genética consistente en la sobreexpresión de Ptc, específica del disco del ala u ojo del animal, y bloqueante de la señalización de la proteína Hh.

25 12.- Modelo animal según la reivindicación 7 caracterizado porque el modelo animal es *Drosophila megalobaster* con una modificación genética consistente en la sobreexpresión de Smo, específica del disco del ala u ojo del animal, e inductora de la señalización de la proteína Hh.

30 13.- Modelo animal según la reivindicación 7 caracterizado porque el modelo animal es *Drosophila megalobaster* con una modificación genética consistente en la sobreexpresión de una forma mutada de Ptc, por ejemplo, PtcSSD, específica

del disco del ala u ojo del animal, e inductora de la señalización de la proteína Hh.

14.- Modelo animal según la reivindicación 7 caracterizado porque el modelo animal es *Drosophila megalobaster* con una
5 modificación genética consistente en la anulación o mutación genética del factor de transcripción SREBP, y más particularmente, el mutante de *Drosophila* HLH106 (HLH106line52).

15.- Uso del modelo animal según las reivindicaciones 1 a
10 la 14 en un procedimiento para la identificación de compuestos farmacéuticos reguladores de la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh.

16.- Uso del modelo según la reivindicación 15
15 caracterizado porque el procedimiento para la identificación de compuestos farmacéuticos comprende las siguientes etapas:

i) adición a la dieta del modelo animal del compuesto candidato a identificar su acción sobre la señalización de Hh,

20 ii) una etapa, opcional, de inducción del gen de interés relacionado con la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas con Hh, cuando éste no sea constitutivo,

25 iii) determinación de una modificación del fenotipo o parámetro biológico característico de un normal o alterado funcionamiento de las partículas lipoproteicas con Hh, inducido en ii), e

30 iv) identificación de un compuesto regulador, ya sea inductor o bloqueante, si se produce la modificación del fenotipo en iii).

17.- Uso del modelo según la reivindicación 16 caracterizado porque el fenotipo ó parámetro biológico determinado en iii) pertenece al siguiente grupo:

determinación del desarrollo del disco imaginal del ala y tamaño del ojo de una mosca.

18.- Uso del modelo según la reivindicación 15
5 caracterizado porque los compuestos farmacéuticos reguladores de la vía hedgehog (Hh) son útiles para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas, preferentemente el cáncer.

19.- Uso de los compuestos farmacéuticos reguladores de la formación, difusión y recepción de partículas lipoproteicas
10 con Hh para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades humanas, preferentemente el cáncer o cualquier otra donde estuviera implicada esta regulación.

FIGURAS

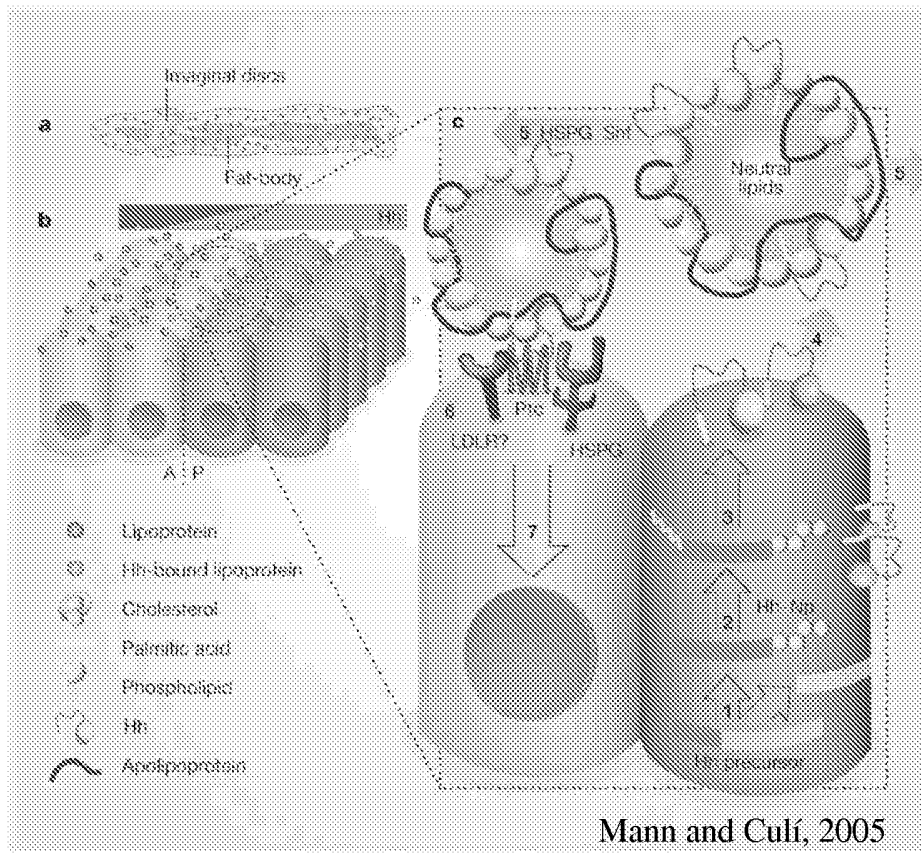


Figura 1

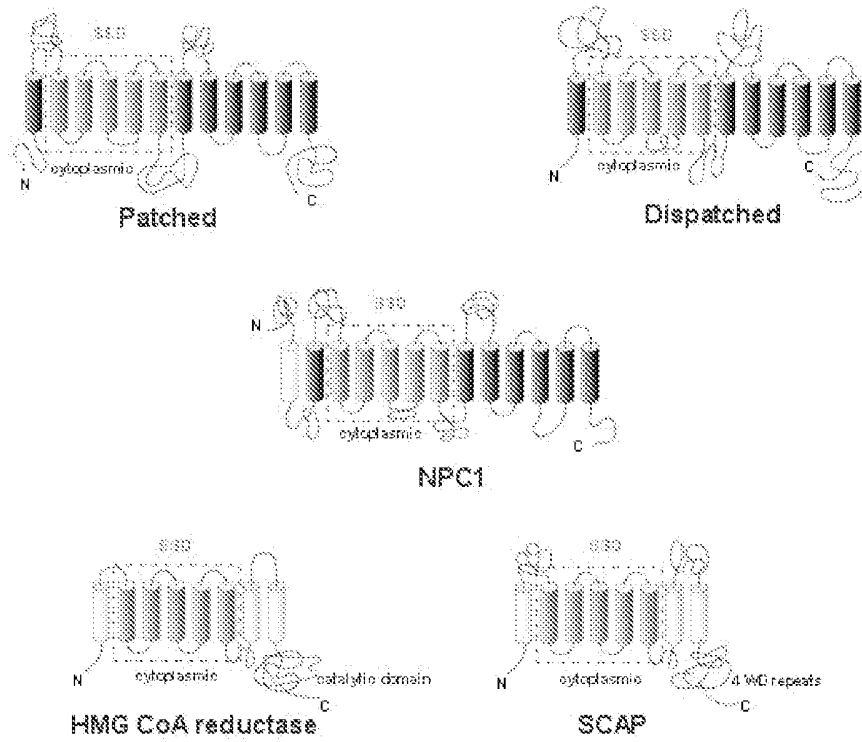


Figura 2

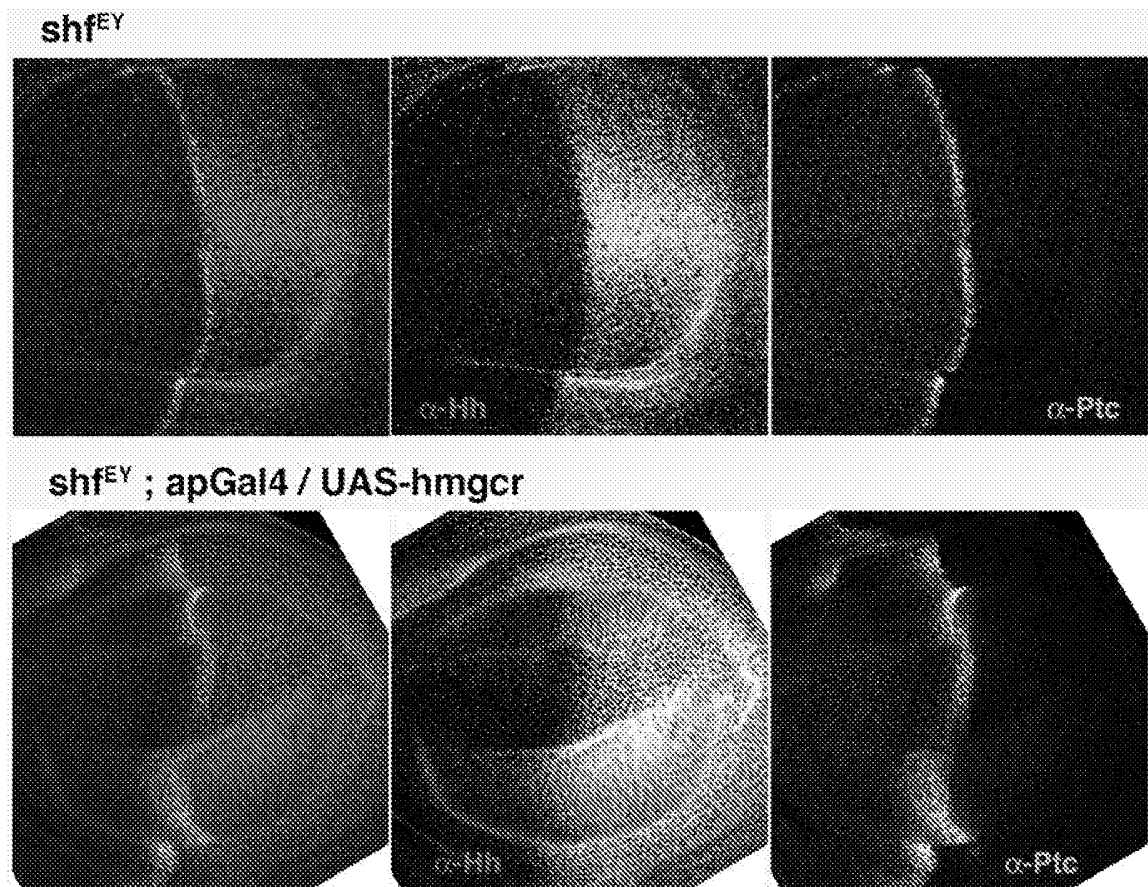
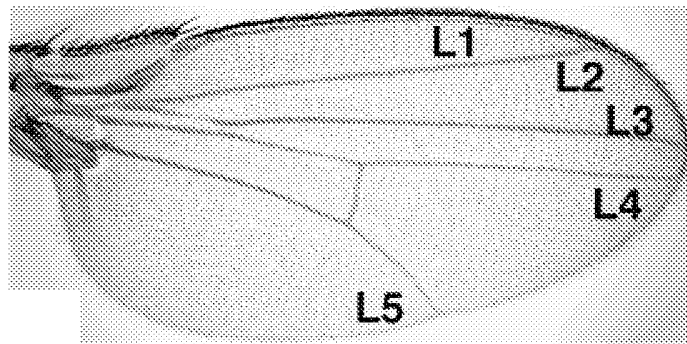
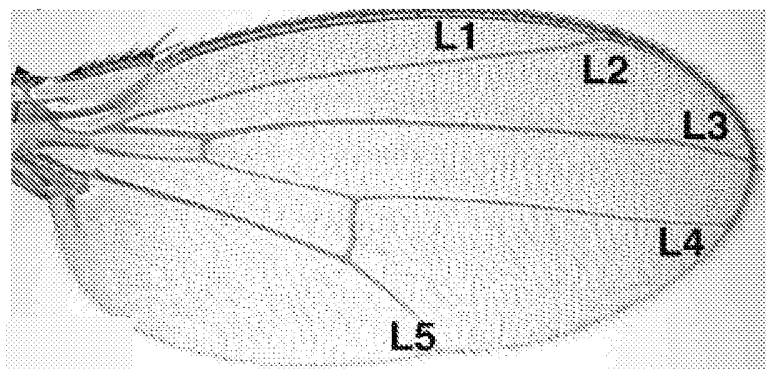


Figura 3



shf²



shf²; UAS-HMG CoA /Hh-Gal4

Figura 4

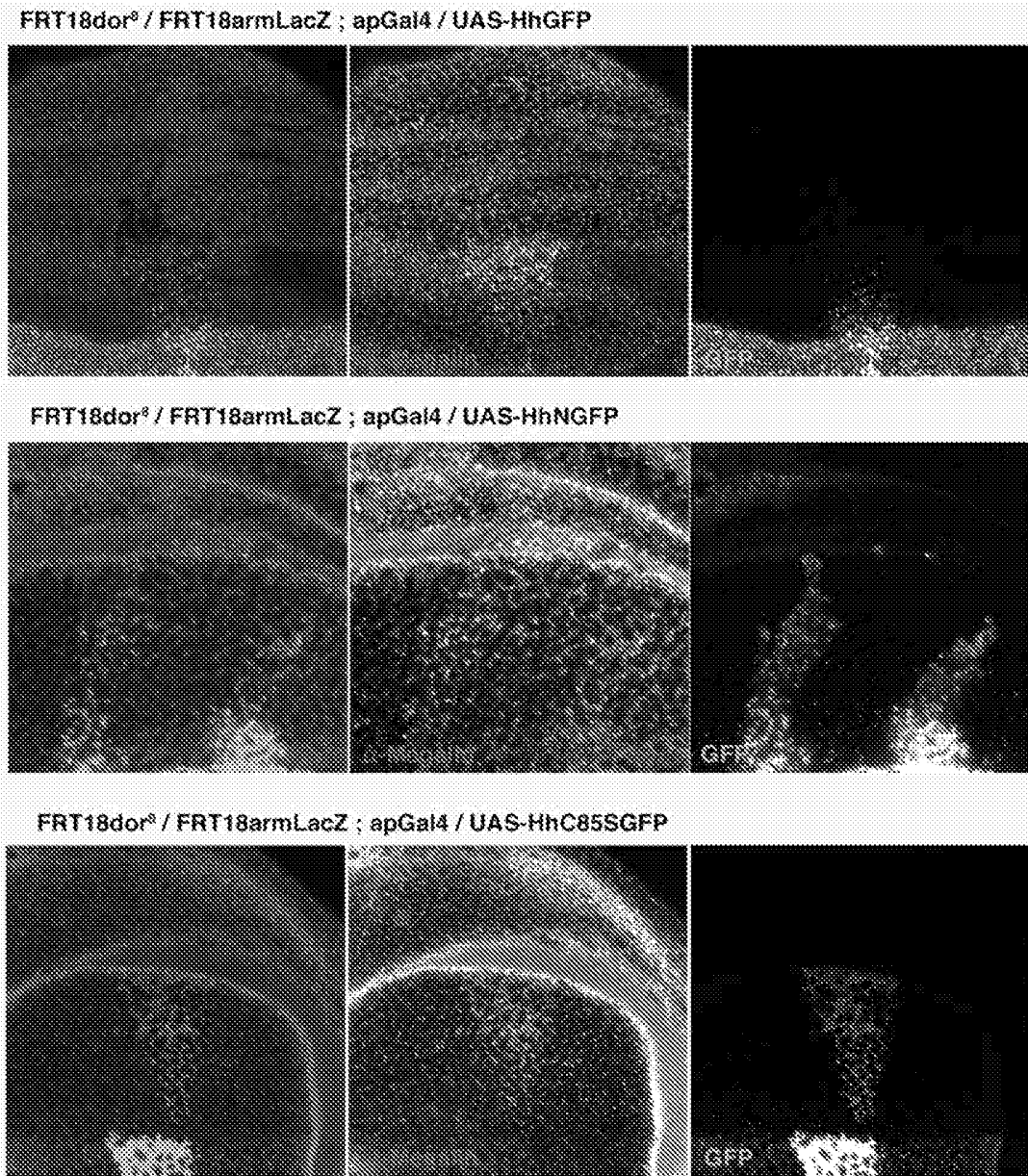


Figura 5

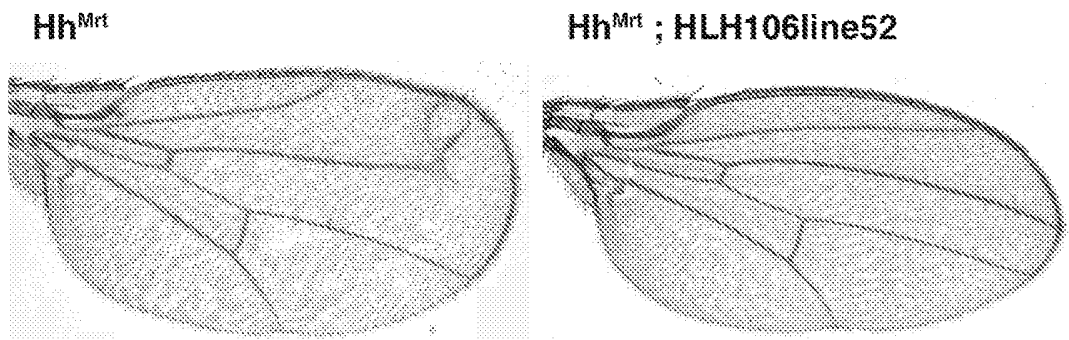


Figura 6

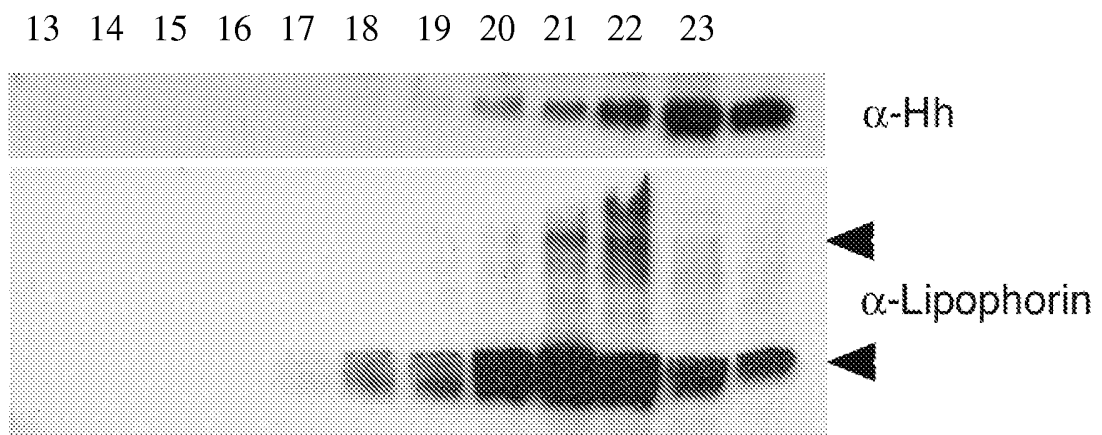
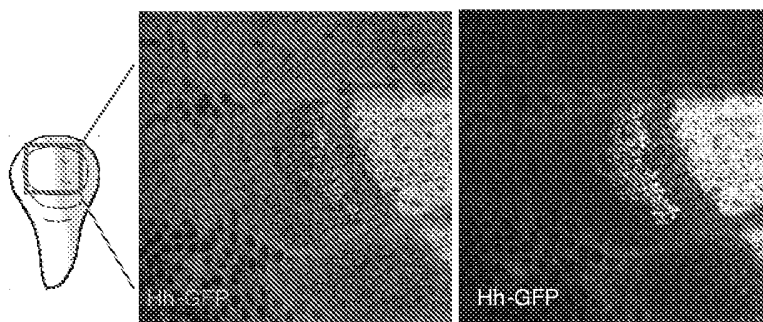


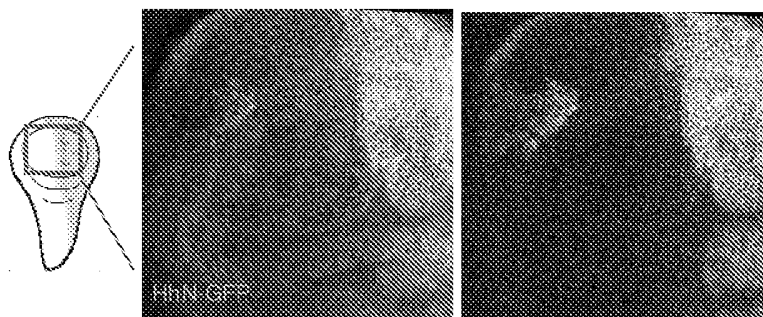
Figura 7

dor⁻, megalin⁻ clones



Hh-GFP

Hh-GFP



HhN-GFP

alpha-Megalin

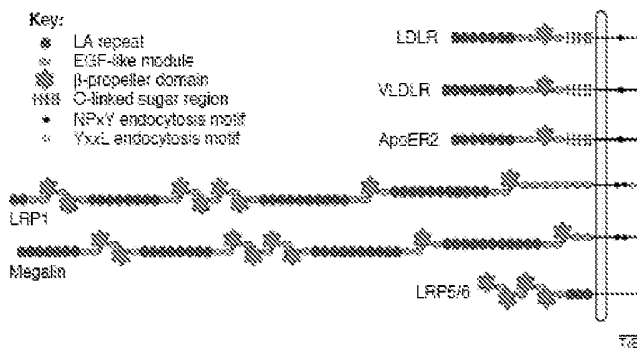


Figura 8

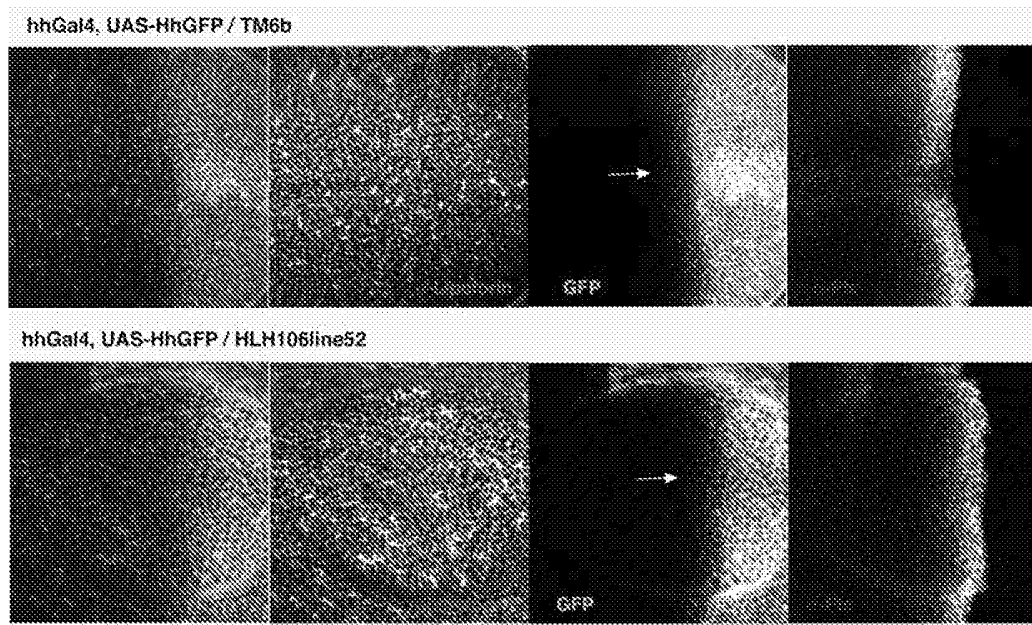


Figura 9

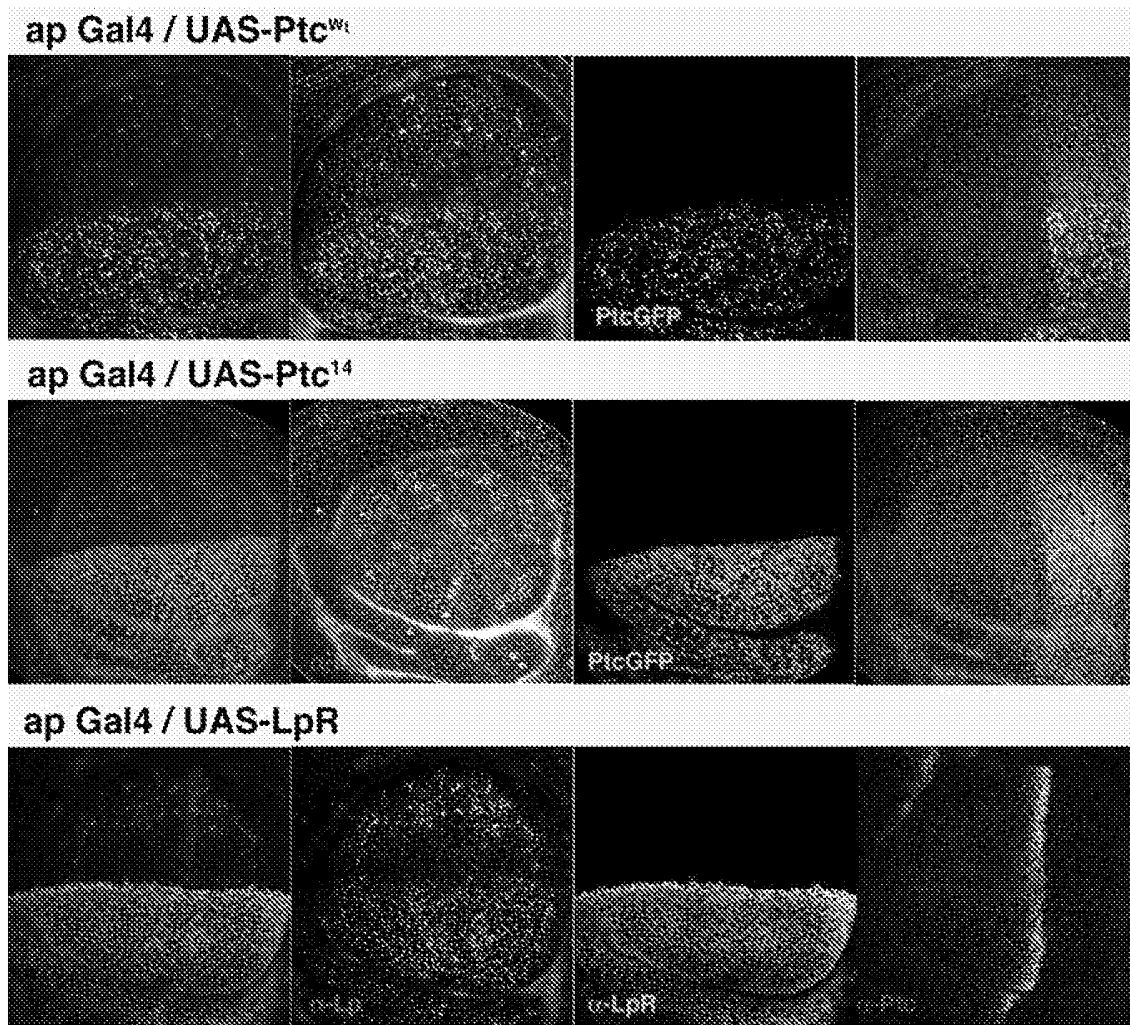


Figura 10

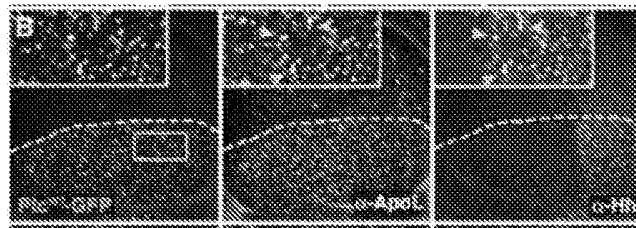


Figura 11A

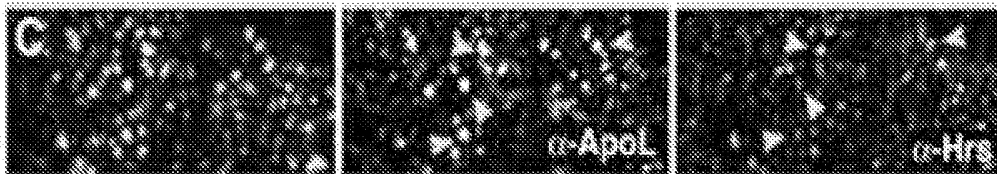


Figura 11B



Figura 11C

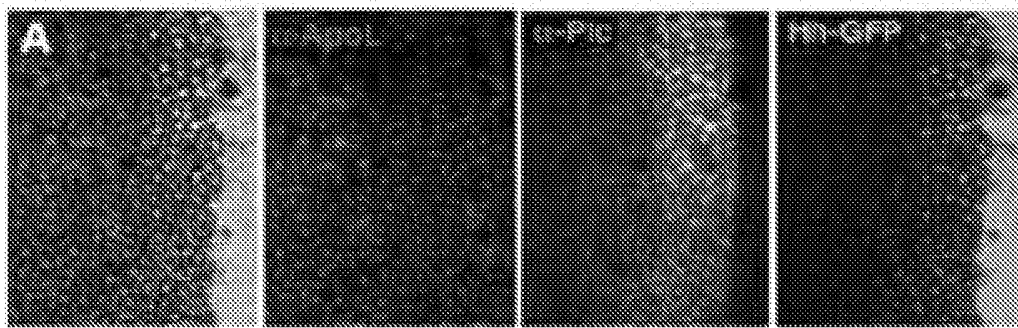


Figura 11E

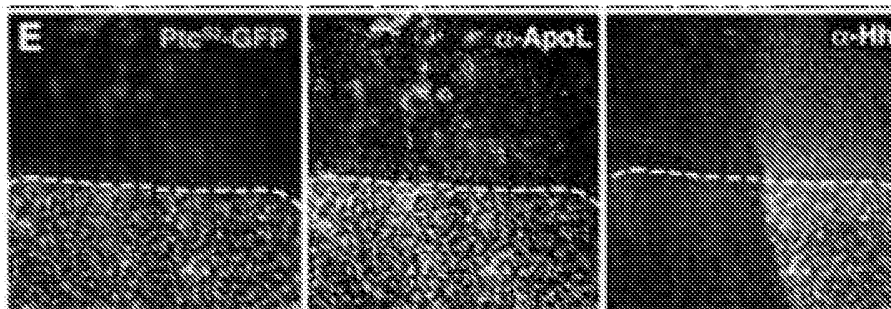


Figura 11E

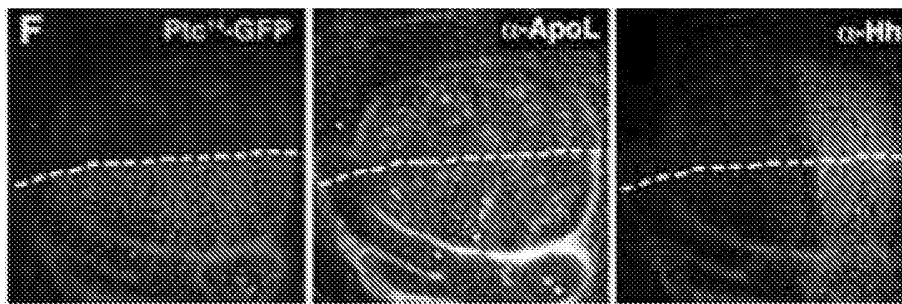


Figura 11F

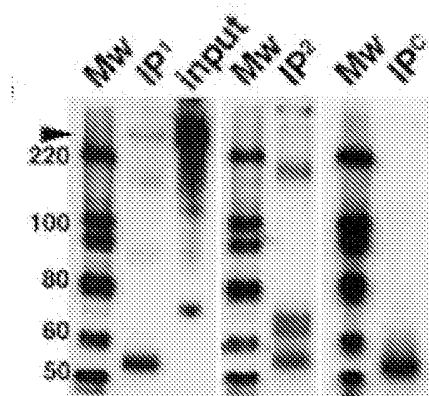


Figura 11G

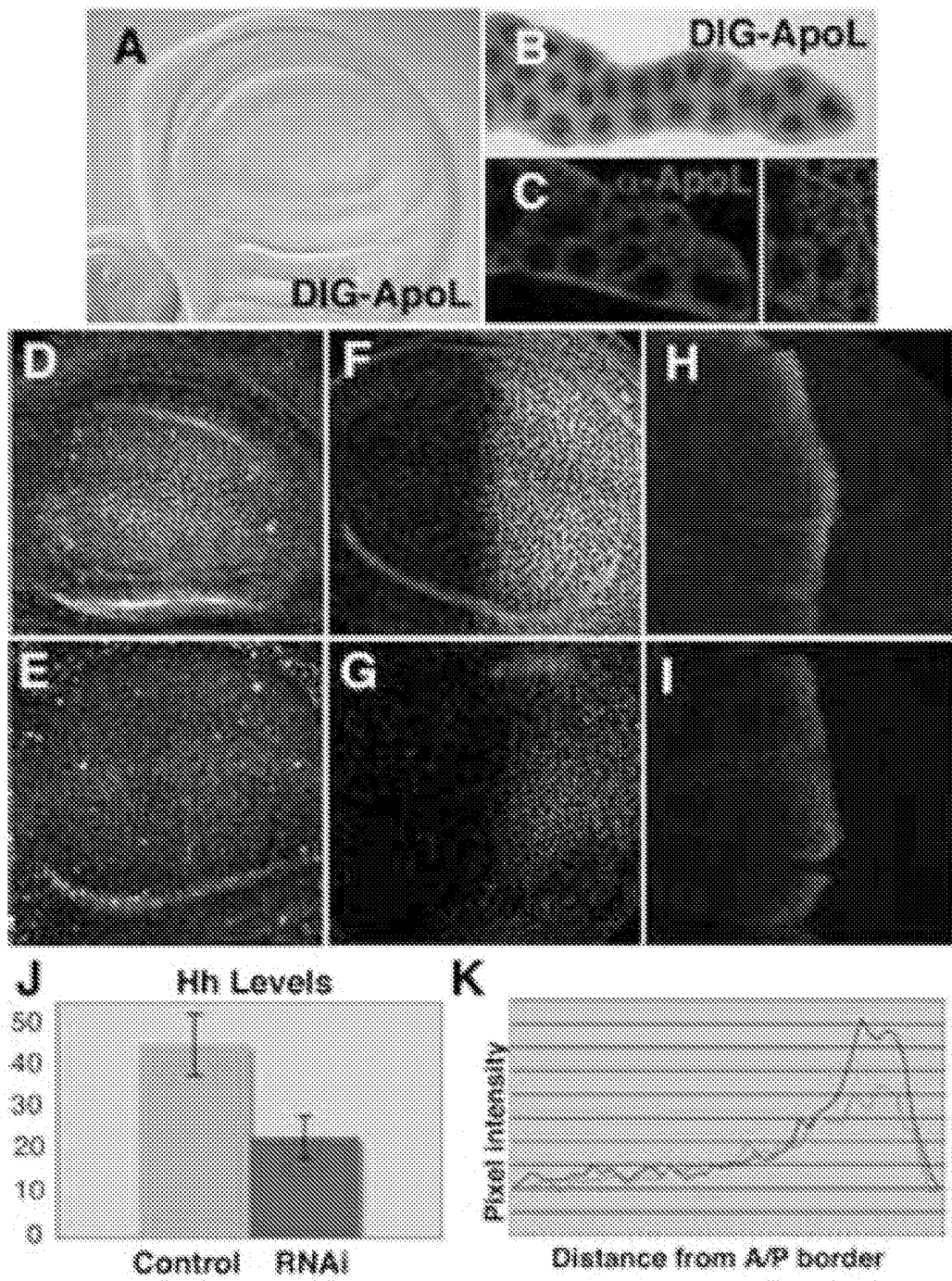


Figura 12

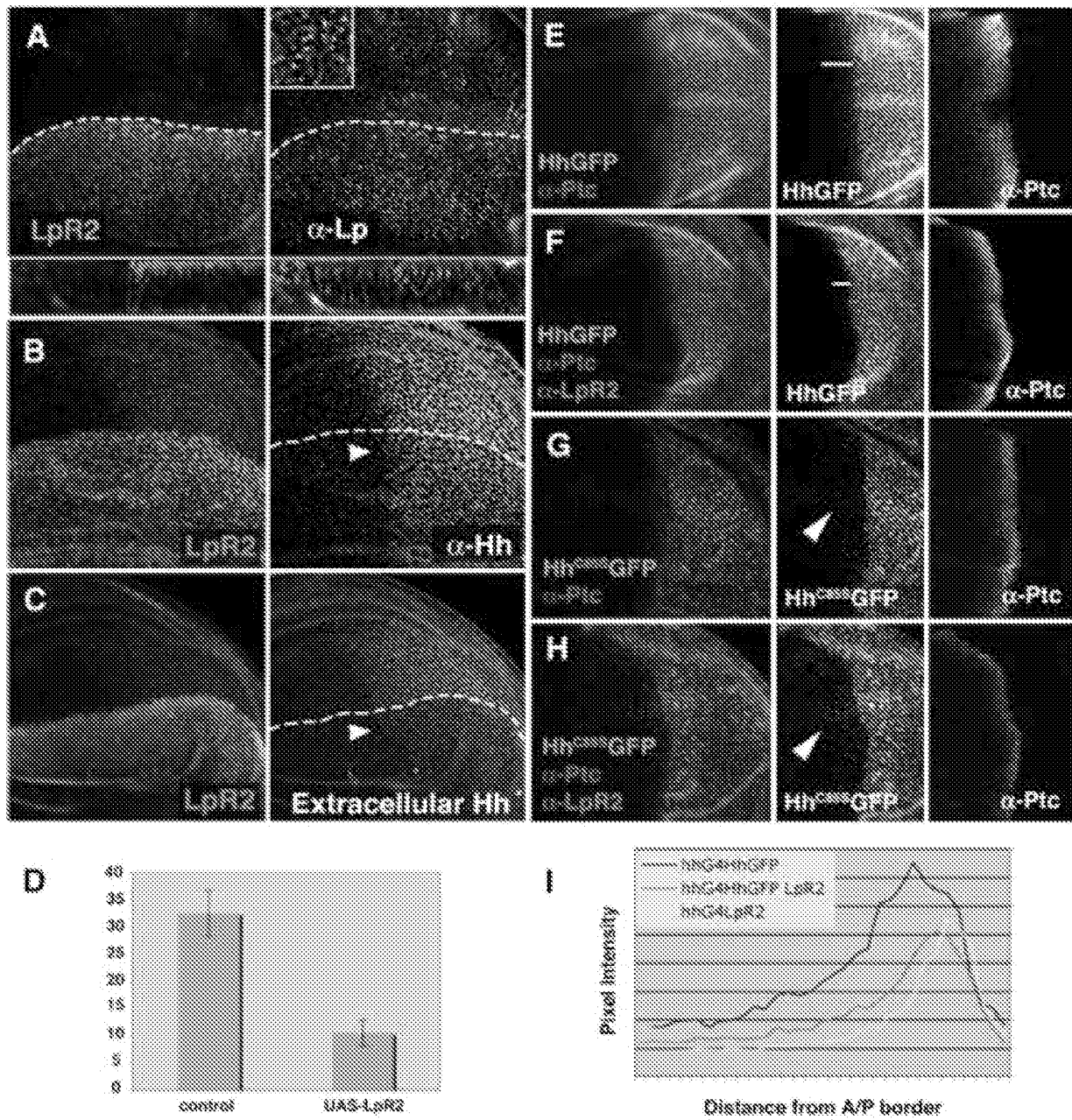


Figura 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/76308 A1 (EX-ELIXIS, INC.) 21.12.2000, page 2, lines 34-36; page 4, lines 13-35; page 16, lines 7-26; page 19, lines 30-36; page 20, lines 1-19; page 21, lines 27-34; page 30, lines 15-25; page 55, example 7; claims 1, 3, 4, 7.	5, 8, 14-17
X	WO 02/36818 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 10.05.2002, page 3, lines 27-30; page 4, lines 1-9; page 7, lines 7-22; claim 1.	6, 11-13, 15
X	US 2002/0026648 A1 (ERNST HAFEN) 28.02.2002, page 1, paragraph [0001]; page 3, paragraphs [0017] and [0018]; page 8, paragraph [0053]; claims 4 and 12.	15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24.January.2008 (24.01.2008)

Date of mailing of the international search report

(24/01/2008)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M^a D. García Grávalos

Telephone No. +34 913493404

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 1, 2, 3, 4, 7, 9 and 10

No search has been carried out owing to the lack of clarity of these claims. The compounds to which the invention refers should be defined in terms of their chemical structure. The genetic modifications which affect proteins should be specified, as well as the modified genes. The features of other animal models should also be defined.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2007/070164

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0076308 A	21.12.2000	CA 2373628 A	21.12.2000
		AU 5477000 A	02.01.2001
		EP 1196026 A	17.04.2002
		JP 2003501102 T	14.01.2003
		US 6781028 B	24.08.2004
-----	-----	-----	-----
WO 0236818 A	10.05.2002	AU 1249402 A	15.05.2002
-----	-----	-----	-----

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/033 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2007/070164

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 00/76308 A1 (EX-ELIXIS, INC.) 21.12.2000, página 2, líneas 34-36; página 4, líneas 13-35; página 16, líneas 7-26; página 19, líneas 30-36; página 20, líneas 1-19; página 21, líneas 27-34; página 30, líneas 15-25; página 55, ejemplo 7; reivindicaciones 1, 3, 4, 7.	5, 8, 14-17
X	WO 02/36818 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 10.05.2002, página 3, líneas 27-30; página 4, líneas 1-9; página 7, líneas 7-22; reivindicación 1.	6, 11-13, 15
X	US 2002/0026648 A1 (ERNST HAFEN) 28.02.2002, página 1, párrafo [0001]; página 3, párrafos [0017] y [0018]; página 8, párrafo [0053]; reivindicaciones 4 y 12.	15

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

24.Enero.2008 (24.01.2008)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

24 de enero de 2008 (24/01/2008)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M^a D. García Grávalos

Nº de teléfono +34 913493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/070164

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n^{os}: 1, 2, 3, 4, 7, 9 y 10
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
No se ha realizado la búsqueda por falta de claridad en estas reivindicaciones. Los compuestos a los que se refiere la invención deben ser definidos por su estructura química. Las modificaciones genéticas que afectan a proteínas deben ser especificadas, así como los genes modificados. También deben ser definidas las características de otros modelos animales.

3. Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:

4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}:

Indicación en cuanto a la protesta Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
 Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
 El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº
PCT/ES 2007/070164

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 0076308 A	21.12.2000	CA 2373628 A AU 5477000 A EP 1196026 A JP 2003501102 T US 6781028 B	21.12.2000 02.01.2001 17.04.2002 14.01.2003 24.08.2004
WO 0236818 A	10.05.2002	AU 1249402 A	15.05.2002

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01K 67/033 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)