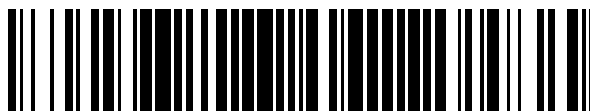


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 467**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06708450 .9**
96 Fecha de presentación: **22.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1855524**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Animal transgénico como modelo de enfermedades fibróticas**

30 Prioridad:
22.02.2005 EP 05003759

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2012

73 Titular/es:
**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)
BINGER STRASSE 173
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:
**WAGNER, ERWIN y
EFERL, ROBERT**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

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).

ES 2 391 467 T3

DESCRIPCIÓN

Animal transgénico como modelo de enfermedades fibróticas

- 5 La invención se refiere a modelos animales, en particular a modelos de ratón, para enfermedades fibróticas como la fibrosis pulmonar y los trastornos fibróticos de la piel.

La fibrosis pulmonar es un trastorno devastador que afecta a cinco millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, el número real podría ser significativamente superior como consecuencia del diagnóstico erróneo. Típicamente, los pacientes desarrollan la fibrosis pulmonar entrados los cuarenta o cincuenta años, con síntomas tales como la falta de aliento, la tos crónica, la fatiga, la pérdida de apetito y la rápida pérdida de peso. El tiempo de supervivencia medio tras el diagnóstico es inferior a 5 años (Giri, 2003). La fibrosis pulmonar no se considera una entidad separada sino que habitualmente se desarrolla en el contexto de exposiciones ambientales o acompañando a un síndrome. Las causas comunes son la exposición al amianto, polvos metálicos o sustancias orgánicas, la sarcoidosis (una enfermedad caracterizada por la formación de granulomas), la exposición a fármacos y la radiación. Con frecuencia, la fibrosis pulmonar se asocia a enfermedades del tejido conectivo o del colágeno, tales como la artritis reumatoide y el escleroderma (Giri, 2003).

Patológicamente, la enfermedad se caracteriza por inflamación crónica y la producción de colágeno dentro de focos fibroblásticos en el pulmón. Los miofibroblastos, una característica distintiva de los focos fibroblásticos, se cree que aparecen debido a la activación local de fibroblastos parenquimales por parte del factor β de crecimiento transformante (TGF- β) e históricamente se han considerado la célula productora de colágeno en las lesiones fibróticas (Selman y Pardo, 2003); además, el CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo) se considera un factor muy importante y resulta necesario para la diferenciación y expresión del gen del colágeno. Sin embargo, resultados recientes han cuestionado este concepto fundamental y sugieren un origen hematopoyético de los fibroblastos patológicos (Hashimoto *et al.*, 2004). La enfermedad típicamente cursa con cicatrizaciones en el pulmón y los alveolos que acaban revestidas de tejido fibrótico. Al formarse una cicatriz, el tejido se engrosa, provocando una pérdida irreversible de eficiencia de la capacidad del tejido de transferir oxígeno al flujo sanguíneo (Gross y Hunninghake, 2001).

Se han implicado varios factores de crecimiento en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Estos factores han sido identificados en virtud de su capacidad de estimular la división de los fibroblastos y la producción de matriz extracelular (ECM), así como su presencia en los pulmones y líquidos pulmonares de pacientes o animales con enfermedad pulmonar fibrótica. Entre estos factores de crecimiento se incluyen la TGF- β , el factor de crecimiento similar a insulina (IGF)-I, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) (Krein y Winston, 2002).

En la actualidad no existe ningún tratamiento efectivo o una cura para la fibrosis pulmonar. Los agentes farmacológicos diseñados para tratar la cicatrización pulmonar todavía se encuentran en fase experimental. Aunque las teorías tradicionales han propuesto que podría ser un trastorno autoinmunitario, los tratamientos destinados a suprimir la inflamación sólo han tenido escaso éxito en la reducción de la progresión fibrótica (Giri, 2003). Debido a que la fibrosis pulmonar es una enfermedad muy compleja, la predicción de la longevidad de los pacientes tras el diagnóstico varía mucho.

Todavía sigue siendo objeto de debate si la fibrosis pulmonar está causada principalmente por la inflamación crónica (Gross y Hunninghake, 2001). Originalmente, los datos experimentales sugerían que las enfermedades pulmonares fibróticas se originaban como trastornos inflamatorios. Por ejemplo, la fibrosis pulmonar se desarrolla en el ratón con la expresión ectópica del mediador inflamatorio factor α de necrosis tumoral (TNF- α) en el pulmón (Miyazaki *et al.*, 1995). Además, en un modelo de bleomicina de la fibrosis pulmonar en el ratón, la fibrosis está precedida por inflamación profunda, incluyendo la producción de niveles elevados de TNF- α (Piguet *et al.*, 1989). Resulta importante que los ratones deficientes en TNF- α o en receptor de TNF- α son resistentes a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Ortiz *et al.*, 1998; Piguet *et al.*, 1997). Estos resultados condujeron a la premisa de que la fibrosis podría evitarse mediante interrupción de la cascada inflamatoria antes de que se produjesen daños irreversibles en los tejidos. De esta manera, esta teoría explica el entusiasmo inicial de la terapia de corticosteroides y citotóxica de la fibrosis pulmonar. Sin embargo, ahora resulta evidente que la actual terapia antiinflamatoria proporciona poco beneficio (Giri, 2003). Por lo tanto, algunos estudios han intentado demostrar que el trastorno pulmonar fibrótico no es un trastorno inflamatorio. Por ejemplo, el desarrollo de la enfermedad pulmonar fibrótica puede ser desencadenado por la transferencia adenovírica de TGF- β a los pulmones de animales que sólo presentan una respuesta inflamatoria transitoria. Estas nuevas ideas sugieren que la fibrosis pulmonar resulta de daños secuenciales a los pulmones a los que sigue una respuesta de cicatrización y no a lesiones crónicas. Por lo tanto, se establece una estrategia terapéutica basada en la modificación de la replicación de los fibroblásticos y de la deposición de la matriz. Sin embargo, no se ha observado ningún efecto clínico beneficioso en pacientes tras el tratamiento de colchicina (que interfiere con el procesamiento intracelular del colágeno) o el tratamiento de penicilamina (inhibidor del entrecruzamiento del colágeno). Entre otros agentes incluidos en ensayos experimentales

del bloqueo de la fibrogénesis se incluyen la pirfenidona, el interferón- γ o los anticuerpos contra la señalización de TGF- β (Giri, 2003).

En consecuencia, existe una necesidad de un modelo animal eficiente y fiable para el estudio de las enfermedades fibróticas, por ejemplo la fibrosis pulmonar, y para el ensayo de candidatos farmacológicos para el tratamiento de dichos trastornos.

Por lo tanto, es un objetivo de la invención proporcionar un modelo animal para la enfermedad fibrótica, por ejemplo la fibrosis pulmonar que se desarrolla en el contexto de una enfermedad de tipo escleroderma (fibrosis generalizada) o en otras enfermedades fibróticas.

La solución del problema subyacente a la invención se basa en los mecanismos moleculares asociados al factor de transcripción AP-1.

El factor de transcripción AP-1 es generado por una serie de dímeros de los productos de las familias de proteínas Fos, Jun y CREB/ATF (Eferl y Wagner, 2003), así como otras proteínas bZip. Además, se han observado asociaciones entre Fos o Jun y la subunidad p65 de NF κ B (Stein *et al.*, 1993) y ATF-2 y p50-NF κ B (Du *et al.*, 1993). La asociación combinatorial puede incluir tres genes Jun (*c-jun*, *junB* y *junD*), cuatro genes Fos (*c-fos*, *fosB*, *fra-1* y *fra-2*) y varios genes CREB/ATF (Eferl y Wagner, 2003). A pesar del elevado grado de homología en las características estructurales globales, los diferentes miembros de las familias de Fos, Jun y CREB muestran diferencias significativas, que conducen a diferencias sutiles en la unión y activación transcripcional del ADN, lo que sugiere que los dímeros individuales presentan funciones específicas en la regulación génica (Jochum *et al.*, 2001). Los miembros de la familia de AP-1 participan en el control de la proliferación celular, así como en diversos tipos de diferenciación, y también en la función neural y en las respuestas al estrés. AP-1 es uno de los factores clave que traducen los estímulos externos en cambios tanto de corto como largo plazo de la expresión génica (Jochum *et al.*, 2001).

Se requieren miembros de las dos familias de proteínas, Jun y Fos, para la formación y remodelado óseo. La delección parcial ubicua de un alelo *c-jun* condicional conduce a malformaciones del esqueleto axial (Behrens *et al.*, 2003) y recientemente se ha demostrado que JunB es esencial para la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (célula formadora de hueso) (Kenner *et al.*, 2004). La mayoría de las proteínas Fos participan en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos y osteoclastos (célula resorptiva de hueso). Los ratones transgénicos que expresan c-Fos desarrollan osteosarcomas debido a la proliferación incrementada de los osteoblastos (Grigoriadis *et al.*, 1993). En contraste, los ratones que no presentan c-Fos desarrollan osteopetrosis, causada por un defecto en la diferenciación del linaje de los osteoclastos (Grigoriadis *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993). Este defecto de la diferenciación puede rescatarse mediante la expresión de la proteína de tipo Fos Fra-1, lo que sugiere que Fos y Fra-1 presentan funciones solapantes en la diferenciación de los osteoclastos (Fleischmann *et al.*, 2000). La pérdida de Fra-1 en un modelo de ratón condicional conduce a una masa ósea reducida debido a un defecto funcional de los osteoblastos (Eferl *et al.*, 2004). Resulta consistente que la expresión ectópica de Fra-1 conduce a osteoesclerosis, probablemente debido a una diferenciación acelerada de los osteoprogenitores en osteoblastos maduros (Jochum *et al.*, 2000). Se ha descrito un fenotipo esquelético similar en ratones transgénicos que expresan Δ FosB, una variante de procesamiento de FosB, lo que sugiere que Fra-1 y Δ FosB estimulan la diferenciación de los osteoblastos mediante la regulación de los genes transcripcionales diana comunes en el linaje de los osteoblastos (Sabatakis *et al.*, 2000). Sin embargo, la necesidad de Fra-2 en la formación del hueso está menos clara. La delección condicional de Fra-2 en los condrocitos conduce a una masa ósea reducida (Karreth *et al.*, 2004), aunque no se han llevado a cabo estudios de pérdida o ganancia funcional con osteoblastos u osteoclastos.

La expresión "expresión ectópica" se refiere a la producción de la expresión génica en un tejido en el que dicho gen no se expresa normalmente o normalmente se expresa a un nivel más bajo.

En los experimentos que han conducido a la invención, el locus genómico de Fra-2 se sobreexpresaba ampliamente en un ratón transgénico (*fra-2^{tg}*), originalmente con el propósito de investigar la consecuencia de una actividad incrementada de Fra-2 sobre las funciones de los osteoblastos y osteoclastos. El vector transgénico de los ratones *fra-2^{tg}* se diseñó de una manera similar para los ratones *c-fos^{tg}* y *fra-1^{tg}* (Grigoriadis *et al.*, 1993; Jochum *et al.*, 2000) para permitir una comparación significativa de los tres modelos de ratón transgénico. Aunque los experimentos con el ratón transgénico de *fra-2* anteriormente descrito (McHenry *et al.*, 1998) han demostrado que la sobreexpresión de *fra-2* perturba el desarrollo normal del ojo, inesperadamente se encontró en los experimentos de la invención que la sobreexpresión de *fra-2* resultaba en un fenotipo similar al de la fibrosis pulmonar humana. Inesperadamente, los ratones transgénicos de *fra-2* morían en menos de 6 meses debido a que desarrollaban una fibrosis generalizada que afectaba principalmente a los pulmones. Además de la fibrosis pulmonar, se ha demostrado en los experimentos de la invención que los ratones *fra-2^{tg}* desarrollan fibrosis en algunos otros tejidos, conduciendo a un fenotipo de tipo escleroderma.

De esta manera, la invención se refiere a la utilización de un roedor transgénico que comprende un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una

secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ con la expresión ectópica generalizada o específica de tipo celular de *fra-2* que se manifiesta en un fenotipo de enfermedad fibrótica, como modelo para enfermedades fibróticas.

La expresión "enfermedades fibróticas" se refiere a enfermedades que implican fibrosis, que puede deberse, por ejemplo, a inflamación crónica o a la reparación y reorganización de tejidos. La fibrosis es la formación o desarrollo de un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como proceso de reparación o reacción, y no la formación de tejido fibroso como constituyente normal de un órgano o tejido, incluyendo los riñones, corazón, pulmones, hígado, piel y articulaciones.

En una realización preferente, la enfermedad fibrótica es una enfermedad pulmonar, en particular fibrosis pulmonar.

En el sentido de la presente invención, la expresión "enfermedad pulmonar" comprende la fibrosis de pulmón (pulmonar) y las enfermedades pulmonares con un componente fibrótico seleccionado de entre fibrosis pulmonar idiopática, otras neumonías intersticiales (IP), tales como la neumonía intersticial de células gigantes, la IP no específica, la neumonía en organización criptogénica, la IP asociada a enfermedad vascular del colágeno y la IP inducida farmacológicamente, así como la sarcoidosis, la fibrosis quística, el síndrome del distrés respiratorio, la granulomatosis, la silicosis, la asbestosis, el escleroderma sistémico que implica el pulmón, así como la fibrosis y remodelado en el asma o la COPD.

En una realización adicional, la enfermedad fibrótica es la fibrosis generalizada, que es una fibrosis de tipo escleroderma que se manifiesta en varios órganos diana, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, aparte del pulmón y/o la piel, el bazo, el corazón, los riñones y/o el hígado.

También se ha demostrado en los experimentos de la invención que los ratones *fra-2^{tg}* desarrollan trastornos fibróticos de la piel, los cuales se asocian a una cicatrización excesiva. Los queloides y las cicatrices hipertróficas en la piel son ejemplos de dichos trastornos fibróticos de la piel.

Algunos experimentos de cicatrización de heridas de grosor completo de la piel del lomo de ratones han demostrado un retardo en el cierre de heridas en los ratones *fra-2^{tg}*, lo que se debe a la producción excesiva de tejido de granulación en las heridas en proceso de cierre, que conduce a una formación excesiva de cicatriz.

La expresión "roedor transgénico" se refiere a un roedor (por ejemplo ratón, rata, hámster, etc.) que presenta una secuencia de ácidos nucleicos endógena codificante de ADN de *Fra-2* establemente integrado en su línea germinal (es decir, en la secuencia genómica de la mayoría o todas sus células). Alternativamente, puede introducirse un transgén *fra-2* en las células madre embrionarias para la generación de ratones quiméricos con expresión ectópica de *fra-2*.

En una realización preferente, el roedor es un ratón.

Se introducen ácidos nucleicos de *Fra-2* heterólogos en la línea germinal de dichos animales no humanos mediante manipulación genética de, por ejemplo, embriones o células madre embrionarias del animal huésped no humano siguiendo protocolos estándares.

A continuación, se hace referencia al roedor/ratón transgénico de *fra-2* como "roedor/ratón *fra-2^{tg}*".

Para mayor claridad, la expresión "ratón *fra-2^{tg}*" o "roedor *fra-2^{tg}*", respectivamente, en el sentido de la presente invención, se refiere a un roedor/ratón transgénico que porta un locus genómico *fra-2* ó ADNc de *fra-2*, bajo el control de un promotor H2Kb y una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ que permite la expresión transgénica generalizada o específica de tipo celular de *fra-2*.

El término "*fra-2*" (o "*Fra-2*", respectivamente) se refiere a ADN de *fra-2* (o a la proteína *Fra-2*, respectivamente) de cualquier especie de mamífero que resulta, al expresarse bajo el control de un promotor adecuado al nivel y en la localización apropiados de manera que se manifiesta en el fenotipo de interés, en enfermedad fibrótica, en particular fibrosis pulmonar. El ADN de *fra-2* seleccionado puede ser idéntico al gen *fra-2* homólogo de la especie animal seleccionada (por ejemplo un ratón porta el transgén de ADN de *fra-2* murino y una rata, el transgén *fra-2* de rata) o puede ser diferente, por ejemplo particularmente en vista de la utilización del animal como modelo para enfermedades humanas y para el cribado o caracterización de inhibidores de enfermedades humanas, puede ser el gen *fra-2* humano.

Las secuencias *fra-2*/ADN de *Fra-2*/proteína son conocidas de la literatura, por ejemplo de ser humano (GenBank nº de acceso X16706; Matsui *et al.*, 1990), ratón (GenBank nº de acceso NM_008037; Foletta *et al.*, 1994) o de rata (GenBank nº de acceso NM_012954).

En los experimentos de la invención, para el constructo transgénico se utilizaron los constituyentes H2-K^b (promotor), IRES-EGFP (gen informador) y la repetición terminal larga LTR (intensificador) procedente del virus del osteosarcoma murino FBJ.

En los experimentos que condujeron a la invención, se utilizó el sistema experimental siguiente: en primer lugar, se cribó una biblioteca genómica de ADN de λ de ratón (de la cepa de ratón 129 Sv) para el gen *fra-2* de ratón con oligonucleótidos marcados ligantes de los cuatro exones de *fra-2*. Se aisló, se caracterizó y se secuenció el locus de longitud completa de *fra-2*. La secuencia de los cuatro exones se correspondía completamente con la secuencia publicada de ADNc de *Fra-2* de ratón (Foletta *et al.*, 1994). El promotor para el antígeno H2-K^b del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I (Grigoriadis *et al.*, 1993) se clonó delante del locus genómico de *fra-2* para permitir la expresión ubicua del transgén. Para realizar el seguimiento de la actividad del transgén *in vivo*, se clonó una secuencia IRES-EGFP (Zhu *et al.*, 1999) detrás del locus *fra-2* seguido de la secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ para estabilizar el ARNm de *fra-2* y para garantizar la expresión del transgén en las células mesenquimales (Grigoriadis *et al.*, 1993). Además, se situaron los sitios loxP delante del exón 2 y después del exón 4 para permitir la delección mediada por Cre de múltiplos de transgén y la generación de varias líneas transgénicas con diferente número de copia del transgén y niveles de expresión del transgén.

El gen *fra-2*^{roedor tg}, en particular de ratón, puede obtenerse utilizando métodos basados en protocolos conocidos para generar animales transgénicos, por ejemplo mediante la utilización de manipulación génica mediada por Cre-loxP (tal como se describe en, por ejemplo, Orban *et al.*, 1992; Sauer, 1993) mediante microinyección de transgenes *fra-2* en oocitos no humanos fertilizados, la inyección de transgenes grandes basados en cromosomas artificiales bacterianos (BAC) en oocitos no humanos fertilizados (tal como se describe en, por ejemplo, Chrast *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2001), la infección de embriones no humanos en el estadio de 8 células con vectores retrovíricos (Blesch, 2004) u otros vectores portadores del transgén, tal como la transgénesis, transfección o infección mediada por adenovirus (Lai *et al.*, 2002) y lentivirus (Blesch, 2004) de células madre embrionarias (ES) no humanas con constructos portadores del transgén (Wolf y Woodside, 2005).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un roedor transgénico, por ejemplo un ratón, que comprende un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ con expresión ectópica generalizada o específica de tipo celular de *fra-2* en las células pulmonares, por ejemplo en células epiteliales de las vías respiratorias, fibroblastos, miofibroblastos y células hematopoyéticas, como modelo animal de la fibrosis pulmonar. Con el fin de obtener la expresión ectópica en estos tipos celulares específicos, se utilizaron promotores específicos de tipo celular para generar el animal transgénico, por ejemplo el promotor del gen de la proteína C surfactante (Boggaram, 2003) para las células epiteliales de las vías respiratorias, o el promotor CD4 (Tanigaki *et al.*, 2004), el promotor CD19 (Rickert *et al.*, 1997) o el promotor LysM (Clausen *et al.*, 1999) para las células hematopoyéticas o el promotor del gen del colágeno pro-alfa 1(I) para los fibroblastos (Rossert *et al.*, 1995). Además de estos tipos celulares, la expresión ectópica puede resultar deseable en otras células que son relevantes para el fenotipo de interés. Análogamente a las células anteriormente indicadas, puede conseguirse la expresión de *fra-2* dirigiendo la expresión del transgén en estas células mediante la utilización de un promotor específico de tipo celular.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a células de roedor transgénico según la invención, en particular a células de ratón, que comprenden un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ. Las células transgénicas de *fra-2* puede obtenerse a partir de un roedor con expresión ectópica de *fra-2* de manera ubicua o específicamente en el tipo celular de interés. Las células se seleccionan con respecto a su capacidad de contribuir al desarrollo de la enfermedad fibrótica, en particular la fibrosis pulmonar, por ejemplo las células hematopoyéticas, las células epiteliales o mesenquimales pulmonares tales como los fibroblastos o los miofibroblastos. Debido a que el crecimiento excesivo de los fibroblastos por una parte y la formación de los miofibroblastos (resultantes de la transformación del fibroblasto u originada a partir de células hematopoyéticas) por otra parte resultan relevantes para el fenotipo de la enfermedad pulmonar, los fibroblastos y los miofibroblastos resultan de interés particular.

Las células de interés pueden aislarse y cultivarse según métodos conocidos, por ejemplo fibroblastos, miofibroblastos y células epiteliales pulmonares (Dong *et al.*, 1997; Phipps *et al.*, 1989).

Alternativamente, para el aislamiento de las células de interés procedentes de animales transgénicos, las células primarias o líneas celulares respectivas pueden transfectarse con el ADN *fra-2*.

Los ratones *fra-2*^{tg} y las células derivadas de los mismos resultan útiles para el ensayo de fármacos destinados al tratamiento de enfermedades fibróticas como la enfermedad pulmonar.

El modelo animal de la invención también puede utilizarse para someter a ensayo estrategias terapéuticas, por ejemplo compuestos, para evitar la formación anormal de cicatrices mediante la intervención farmacológica. En particular, los ratones *fra-2^{tg}* o las células *fra-2^{tg}* que comprenden un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ pueden utilizarse en ensayos para el cribado de inhibidores de la formación de cicatriz en la cicatrización excesiva. Los experimentos de la invención han demostrado que Fra-2 mismo es una diana para la intervención farmacológica de los trastornos fibróticos, incluyendo la cicatrización excesiva. Por lo tanto, los inhibidores de Fra-2 pueden resultar útiles como inhibidores de dichas enfermedades.

El modelo animal de la invención puede utilizarse, aunque sin limitación, para la evaluación de inhibidores de las citoquinas proinflamatorias que desempeñan un papel en las rutas fibrogénicas que dependen de la actividad de Fra-2. Por ejemplo, pueden someterse a ensayo nuevos inhibidores que podrían evitar microdaños a las células epiteliales pulmonares, tales como los inhibidores del enzima conversor de la angiotensina o los inhibidores de la caspasa en el modelo animal de la invención. Además, pueden someterse a ensayo inhibidores específicos que eviten la acumulación del colágeno o en general la actividad fibrogénica de las células en los focos fibróticos de los pulmones afectados.

Según un aspecto adicional de la invención, el roedor transgénico y las líneas celulares derivadas del mismo que comprenden un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ también pueden utilizarse para identificar o someter a ensayo compuestos candidatos efectivos en la terapia de la enfermedad fibrótica, en particular de la fibrosis pulmonar, por ejemplo mediante la inhibición de rutas fibrogénicas no identificadas hasta el momento que son dependientes de la actividad de Fra-2.

De esta manera, la presente invención proporciona además un método para determinar el efecto terapéutico de un compuesto sobre una enfermedad fibrótica, por ejemplo la fibrosis pulmonar. El método incluye administrar una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo en un roedor *fra-2^{tg}* transgénico, en particular un ratón, que comprende un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ. El método incluye medir la respuesta de un roedor transgénico al compuesto de ensayo (es decir, la mejora o la desaparición de los síntomas de la enfermedad) y comparar la respuesta del animal transgénico con la de un animal de control, que puede ser, por ejemplo, un animal de tipo salvaje o, alternativamente, un animal transgénico de control. Los compuestos que podrían presentar un efecto sobre el fenotipo resultante de la expresión ectópica de *fra-2* también pueden cribarse frente a células en ensayos basados en células, por ejemplo con el fin de identificar dichos compuestos. En ensayos que utilizan células que comprenden un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ, que sobreexpresa *fra-2*, los compuestos pueden someterse a ensayo para su efecto sobre el crecimiento excesivo de los fibroblastos y/o la transformación de los fibroblastos en miofibroblastos y/o la formación de matriz extracelular.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos identificados pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD₅₀/ED₅₀. Los compuestos que muestran índices terapéuticos grandes resultan preferentes. Aunque pueden utilizarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe procurarse diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar los daños potenciales a las células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios. Por ejemplo, conseguir la selectividad tóxica mediante la utilización de compuestos inhalados con vidas medias plasmáticas cortas para el tratamiento de la fibrosis pulmonar.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de los estudios animales pueden utilizarse para formular un abanico de dosis para la utilización en seres humanos. La dosis de dichos compuestos se encuentra comprendida dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. En el caso de que la ventana terapéutica permita la utilización de valores de ED más altos sin efectos tóxicos, dichos valores de ED, por ejemplo hasta ED₉₀, resultan preferentes.

La dosis puede variar dentro de dicho intervalo dependiendo de la forma de dosificación utilizada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición de los síntomas que es la mitad de la máxima) o más alta según se determine en cultivo celular (para los agonistas, resultan preferentes los valores superiores al valor de IC₅₀ (o al valor ED₅₀ para los agonistas)).

Dicha información puede utilizarse para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en el ser humano. Los niveles plasmáticos pueden medirse según métodos conocidos, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Finalmente, el modelo animal resulta útil para estudiar la etiología de las enfermedades fibróticas humanas, por ejemplo la fibrosis pulmonar. Resulta muy importante definir el tipo celular que es responsable del desarrollo de la fibrosis pulmonar. Los modelos de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina convencionales no permiten experimentos tales como los estudios de trasplante de médula ósea, lo que dificulta alcanzar dicho objetivo. Además, los ratones *fra-2^{tg}* pueden cruzarse con diferentes fondos genéticos, tales como ratones con deficiencia de Rag2 o pérdida de la función del receptor p55 del TNF- α , con el fin de evaluar la contribución de las células T autorreactivas y la señalización de TNF en la fibrosis pulmonar, respectivamente. El conocimiento del tipo celular responsable y de las rutas de señalización principales que puede obtenerse con el modelo animal según la invención presenta una influencia crítica sobre la orientación general de la experimentación farmacológica para el tratamiento de la fibrosis pulmonar.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

- A.) Esquema del vector transgénico de *fra-2*. Se utilizó un promotor H2K^b para la expresión de *fra-2*. Se utilizó el gen informador IRES-EGFP posterior a *fra-2* para seguir la actividad del transgén y se incluyó una secuencia LTR para la estabilización del ARNm. Los sitios loxP permiten la delección del transgén mediada por la recombinase Cre.
H2K^b: promotor H2K^b; E1-E4: exón 1-4 de *fra-2*; poliA. señal de poliadenilación; HindIII: sitios de restricción utilizados para el análisis de transferencia southern.
- B.) Análisis de transferencia southern de tres líneas transgénicas (12, 13, 15) para determinar el número de copia del transgén en el genoma. Se digirió el ADN procedente de colas de ratón con HindIII y se sondeo con una secuencia correspondiente al exón 2 de *fra-2*. Se indican las posiciones de las bandas de tipo salvaje y transgénicas. La cuantificación reveló 4, 60 y 2 copias transgénicas para las líneas transgénicas 12, 13 y 15, respectivamente.
- C.) Ensayo de protección frente a la ARNasa para la expresión de *fra-2* con dos tejidos (hígado y corazón) procedentes de las líneas transgénicas 12, 13 y 15. La expresión de *fra-2* se encontraba elevada en las líneas 12 y 13 en ambos tejidos en grado similar. No era detectable expresión del transgén en la línea transgénica 15. Se utilizó la expresión de GAPDH como control de carga.
- D.) Ensayo de protección frente a la ARNasa con diferentes tejidos de ratones transgénicos adultos (6 semanas de edad) (línea 13). El transgén se expresaba ubicuamente excepto en el cerebro. ti.: timo; ri.: riñón; ba: bazo; cal.: calvarios.

Figura 2

- A.) Gráfico de Kaplan-Meier que muestra la letalidad prematura de los ratones *fra-2^{tg}*. Los ratones con expresión elevada del transgén *fra-2* (líneas 12 y 13) enfermaron en la adultez y empezaron a morir aproximadamente a las 6 semanas de edad. No se observó letalidad prematura en los ratones de la línea 15, que no mostró expresión del transgén.
- B.) Proporciones de peso pulmonar a corporal incrementadas en ratones *fra-2^{tg}*. Se observó un incremento del peso pulmonar en los ratones transgénicos de las líneas 12 y 13 (se muestran para la línea 12) pero no de la línea 15. El gran incremento del peso pulmonar coincide con la letalidad de los ratones transgénicos. Se evaluó si estaban enfermos a partir de la pérdida de peso corporal, la aparición de pelaje, la debilidad de los ratones y la falta de aliento.

Figura 3

- A.) Morfología gruesa de los pulmones *fra-2^{tg}*. Los ratones de las líneas 12 y 13 mostraban pulmones drásticamente incrementados con fibrosis aparente.
- B.) Secciones teñidas con H-E de pulmones *fra-2^{tg}*. Los ratones de las líneas 12 y 13 mostraban fibrosis pulmonar intersticial (panel superior) y estenosis de los vasos sanguíneos (panel inferior).

Figura 4

- A.) Desarrollo de síndrome de tipo escleroderma en *fra-2^{tg}*. La tinción de azul de cromo- azul de anilina del colágeno (en azul) reveló que las lesiones fibróticas en ratones *fra-2^{tg}* no se encontraban restringidas a los pulmones sino que también se observaban en otros órganos (a título de ejemplos se muestran hígado, piel y corazón).

- B.) Análisis de PCR en tiempo real de la expresión del colágeno en los pulmones de ratones *fra-2^{tg}*. La expresión del colágeno de tipo I y de tipo III fibrogénicos se encontraba incrementada en los pulmones de los ratones enfermos.

5 Figura 5

- A.) Fibrosis pulmonar en ratones *fra-2^{tg}* con inmigración vascular y perivascular de células inflamatorias. La tinción de H-E de los pulmones *fra-2^{tg}* demuestra que la inflamación es el primer suceso de la fibrosis pulmonar (panel superior). Las células inflamatorias están compuestas principalmente de células T positivas para CD3 (tinción negra, cabeza de flecha) y células mieloides positivas para la esterasa, tales como granulocitos (tinción roja, cabeza de flecha).
- 10 B.) La inflamación provoca acumulación de quimoquinas y citoquinas en los pulmones de los ratones *fra-2^{tg}*, tal como demuestra el ensayo de protección frente a la ARNasa.

15 Figura 6

- A.) No se observa fibrosis pulmonar severa en los ratones de tipo salvaje reconstituidos con médula ósea de *fra-2^{tg}*. Las secciones de pulmón y de hígado de ratones de tipo salvaje reconstituidas con médula ósea de *fra-2^{tg}* tras la irradiación letal demuestran que la fibrosis no puede trasplantarse fácilmente.
- 20 B.) El perfil de FACS de las células de médula ósea procedente de ratones de tipo salvaje reconstituidos con médula ósea de tipo salvaje.
- C.) El perfil de FACS de células de médula ósea procedentes de ratones de tipo salvaje reconstituidos con médula ósea de *fra-2^{tg}*. Observar que prácticamente la totalidad de las células de médula ósea expresan el gen informador EGFP, que refleja la expresión del transgén.
- 25 D.) Las proporciones de pesos de órgano/cuerpo confirman que no se desarrolla fibrosis pulmonar severa en los ratones de tipo salvaje reconstituidos con médula ósea de *fra-2^{tg}*.

Figura 7

- 30 A.) Fibrosis pulmonar severa en ratones *fra-2^{tg}* reconstituidos con médula ósea de tipo salvaje. Las secciones de pulmón y de hígado de ratones *fra-2^{tg}* reconstituidas con médula ósea de tipo salvaje tras la irradiación letal demuestran que la fibrosis se desarrolla en presencia de médula ósea de tipo salvaje.
- B.) Perfil de FACS de las células de médula ósea de ratones de tipo salvaje reconstituidos con médula ósea de tipo salvaje.
- 35 C.) Perfil de FACS de células de médula ósea de ratones *fra-2^{tg}* reconstituidos con médula ósea de tipo salvaje. Observar que prácticamente la totalidad de las células positivas para EGFP transgénicas ha desaparecido.
- D.) Las proporciones de pesos de órgano/cuerpo confirman que la fibrosis pulmonar se desarrolla en ratones *fra-2^{tg}* reconstituidos con médula ósea de tipo salvaje.

40 Figura 8

- A.) Cicatrización de heridas retrasada tras provocar una herida de grosor completo en ratones *fra-2^{tg}*. Los ratones transgénicos de *Fra-2* muestran un cierre de heridas retrasado tras provocar una herida de grosor completo en la piel posterior (panel superior: 8 días después de la herida; panel inferior: 11 días después de provocar la herida).
- 45 B.) Se observa una cantidad incrementada de tejido de granulación que consiste de colágeno en las heridas de los ratones transgénicos de *fra-2* (11 días después de provocar una herida; panel superior: tinción de H-E; panel inferior: tinción de CAB para el colágeno en azul).
- C.) La cuantificación de la cicatrización de heridas demuestra un cierre de heridas retrasado en los ratones transgénicos de *fra-2* desde tan sólo 3 días después de la provocación de la herida.
- 50 D.-G.) Ensayos de protección frente a la ARNasa con biopsias de piel obtenidas en el momento de provocar la herida y 3 días después. No se observaron diferencias en la expresión de los miembros de AP-1 excepto para *fra-2* (D), las metaloproteinasas de matriz (E), las TIMP (E), citoquinas (F), los miembros de la familia de TGF- β (F) y las quimoquinas (G).
- 55

En los Ejemplos, se utilizaron los materiales y métodos siguientes:

Generación de ratones fra-2^{tg}

- 60 Se aisló el locus *fra-2* de longitud completa a partir de una biblioteca de ADN genómico de λ , se secuenció y se clonó en el vector pBS II. El promotor del antígeno H2-K^b del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I (Grigoriadis *et al.*, 1993) se clonó cadena arriba del locus genómico de *fra-2* para permitir la expresión ubicua del transgén. Para llevar a cabo el seguimiento de la actividad del transgén, se clonó una secuencia IRES-EGFP (Zhu *et al.*, 1999) cadena abajo del locus *fra-2*, seguido de la secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del

sarcoma murino FBJ (Grigoriadis *et al.*, 1993). Además, se situó un sitio loxP cadena arriba del exón 2 y cadena abajo del exón 4 para permitir la delección mediada por Cre de los multímeros de transgén y la generación de varias líneas transgénicas con diferentes números de copia del transgén. Se inyectó el constructo transgénico en el pronúcleo de oocitos C57BL76 fertilizados y se establecieron tres líneas transgénicas independientes.

Transferencia southern y ensayo de protección frente a ARNasa (RPA)

Para la transferencia southern de *fra-2*, se digirieron 10 µg de ADN de la cola con HindIII, rindiendo un fragmento de 12,5 kb para el alelo de tipo salvaje de *fra-2* y un fragmento de 7,5 kb para el transgén. Para la detección de las bandas, se utilizó como sonda un fragmento KpnI de 0,6 kb correspondiente al exón 2 de *fra-2*. Para el ensayo de protección frente a ARNasa, se aisló ARN total pulmonar utilizando el protocolo TRIZOL (Sigma). Los ensayos de protección frente a ARNasa se llevaron a cabo utilizando los sistemas de ensayo de protección frente a ARNasa multisonda RiboQuant mCK-2b y mCK-5c (PharMingen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Histología

Los tejidos se fijaron durante la noche con PFA al 4% tamponado neutro a 4°C y se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones de cinco micrómetros con hematoxilina y eosina (H-E) o con azul de anilina-cromo o se procesaron adicionalmente. La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo para anti-CD3 (Santa Cruz) tras extraer el antígeno (Dako S1699) con el sistema MultiLink de Dako (Dako E0453) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Reconstitución de médula ósea

Se irradiaron letalmente ratones receptores hembra de 6 a 10 meses y se reconstituyeron 20 horas después con médula ósea procedente de ratones donantes macho. La médula ósea se extrajo mediante lavado de los fémures y tibias de ratones donantes, se realizó un recuento de la misma y se inyectaron 5×10^6 células en la vena de la cola de los receptores. Se extrajeron rutinariamente células de médula ósea y de bazo de los receptores después de sacrificarlos para el examen histológico y se evaluó la eficiencia de la reconstitución mediante transferencia southern y análisis de FACS para la fluorescencia de EGFP.

Ejemplo 1

Generación y caracterización de los ratones *fra-2^{tg}*

Se situó el locus genómico *fra-2* en un vector transgénico con el promotor H2K^b ampliamente activo cadena arriba y un gen informador IRES-EGFP cadena abajo (fig. 1A). Se incluyó una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ para la estabilización del ARNm de *fra-2* y para garantizar la expresión del transgén en las células mesenquimales. Los sitios loxP adicionales situados cadena arriba del exón 2 y cadena abajo del exón 4 permiten la delección mediada por Cre de los multímeros de transgén y la generación de varias líneas transgénicas con diferentes números de copia y niveles de expresión del transgén. Se generaron tres líneas transgénicas independientes con diferente número de copia del transgén (fig. 1B). Las líneas 12 y 13 expresan el transgén a niveles elevados (fig. 1C) y portan 4 y 60 copias del transgén, respectivamente. La línea 15 porta sólo dos copias del transgén y no mostró expresión manifiesta del transgén (fig. 1C). Pudo observarse considerable expresión del transgén en todos los tejidos de las líneas 12 y 13 excepto en el cerebro (fig. 1D).

Ejemplo 2

Se desarrolla fibrosis pulmonar en los ratones *fra-2 tg*

El fenotipo principal desarrollado por los ratones es la fibrosis generalizada con énfasis en el tejido pulmonar. La fibrosis pulmonar es responsable de la letalidad prematura de la mayoría de los ratones *fra-2^{tg}* (fig. 2A). Los ratones enferman a los 12 meses de edad aproximadamente y sufren de falta de aliento que se debe a un drástico incremento del peso pulmonar (fig. 2B, 3A) y a la fibrosis del tejido pulmonar (fig. 3B). La fibrosis pulmonar con frecuencia se desarrolla en respuesta a contaminantes ambientales o en el contexto de un síndrome. La tinción con colágeno de varios tejidos ha demostrado que la fibrosis pulmonar en ratones *fra-2^{tg}* se desarrolla en el contexto de una enfermedad de tipo escleroderma que se caracteriza por una fibrosis generalizada en varios tejidos (fig. 4A). La producción incrementada de colágenos fibrogénicos en el pulmón se confirmó mediante análisis de PCR en tiempo real.

Ejemplo 3

Inflamación de uno de los primeros sucesos en la fibrosis pulmonar

- 5 Se analizaron los pulmones de ratones de 10 a 14 semanas de edad con el fin de identificar los sucesos iniciales de la fibrosis pulmonar en los ratones *fra-2^{tg}*. Este análisis demostró que la inflamación en las regiones vasculares y perivasculares es uno de los primeros sucesos en la fibrosis pulmonar (fig. 5A). Las tinciones inmunohistoquímica e histoquímica identificaron las poblaciones celulares principales que infiltran los pulmones. Éstas eran células T
10 positivas para CD3 y células mieloides positivas para esterasa (fig. 5A). La presencia de estas células se asoció a niveles incrementados de quimoquinas y citoquinas (fig. 5B), que también podrían contribuir a los cambios fibrogénicos en los pulmones y que también podrían atraer más células inflamatorias.

Ejemplo 4

- 15 La inflamación y la fibrosis pulmonar son desencadenadas por microdaños en las células epiteliales de las vías respiratorias

- Todavía es una cuestión a debate si la fibrosis pulmonar es principalmente una enfermedad autoinmunitaria o si resulta desencadenada por microdaños a los epitelios de las vías respiratorias con una contribución más o menos
20 importante del sistema inmunológico. Estas preguntas se intentan contestar mediante experimentos de trasplante de médula ósea. Por una parte, la enfermedad debería ser trasplantable con médula ósea de *fra-2^{tg}* en el caso de que los ratones *fra-2^{tg}* desarrollen células inmunológicas autorreactivas que son responsables de los daños pulmonares y la fibrosis pulmonar. Por otra parte, la enfermedad también debería desarrollarse en ratones *fra-2^{tg}* que han sido reconstituidos con células de médula ósea de tipo salvaje en el caso de que los microdaños a los epitelios de las
25 vías respiratorias sean el desencadenante primario de la fibrosis. Los datos preliminares sugieren que la fibrosis pulmonar no puede trasplantarse fácilmente con células de médula ósea *fra-2^{tg}*, excluyendo una enfermedad autoinmunitaria como la causa principal (fig. 6). Sin embargo, aparentemente se desarrolla una fibrosis pulmonar severa en ratones *fra-2^{tg}* reconstituidos con médula ósea de tipo salvaje (fig. 7). Estos datos sugieren que un proceso de microdaños, con toda probabilidad provocado por la apoptosis de las células epiteliales alveolares, es la
30 causa principal de la fibrosis pulmonar.

Ejemplo 5

Los ratones *fra-2^{tg}* muestran cicatrización excesiva

- 35 Los ratones *fra-2^{tg}* muestran un retardo en el cierre de las heridas tras provocarles una herida de grosor completo en la piel con un sacabocado para biopsia en la piel del lomo (fig. 8A, C). Se observó una cantidad incrementada de tejido de granulación consistente de colágeno en las heridas de los ratones *fra-2^{tg}* tras provocarles una herida (fig. 8B). Los ensayos de protección frente a ARNasa con biopsias de la piel obtenidas en el momento de provocar la
40 herida y 3 días después no mostraban diferencias en la expresión de los miembros de AP-1 (excepto para *fra-2*), de las metaloproteinasas de matriz, de las TIMP, de las citoquinas, de los miembros de la familia de TGF- β y de las quimoquinas (fig. 8D-G). Estos datos demuestran que la actividad incrementada de Fra-2 conduce a un retardo en el cierre de las heridas y a una formación excesiva de cicatriz. Esto sugiere que los inhibidores de la actividad de Fra-2 podrían aplicarse ectópicamente para evitar la formación de cicatriz tras una lesión o cirugía.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un roedor transgénico que comprende un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ con una expresión ectópica generalizada o específica de tipo celular de *fra-2* que se manifiesta en un fenotipo de enfermedad fibrótica, como modelo de enfermedades fibróticas.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho roedor es el ratón.
3. Utilización según la reivindicación 1 para enfermedades fibróticas humanas.
4. Utilización según la reivindicación 1 para la fibrosis generalizada de tipo escleroderma.
5. Utilización según la reivindicación 1 para la fibrosis pulmonar.
6. Utilización según la reivindicación 5, en la que dicho roedor transgénico expresa ectópicamente *fra-2* en las células pulmonares.
7. Utilización según la reivindicación 1 para los trastornos fibróticos de la piel.
8. Utilización según la reivindicación 7, en la que dicho trastorno fibrótico de la piel es la formación excesiva de cicatriz.
9. Método para determinar el efecto de un compuesto de ensayo sobre una enfermedad fibrótica, que comprende poner en contacto el modelo según la reivindicación 1 con un compuesto de ensayo, medir la respuesta del roedor transgénico a dicho compuesto de ensayo y comparar la respuesta del mamífero transgénico con la respuesta de un animal de control.
10. Método según la reivindicación 9, en el que la enfermedad fibrótica es la fibrosis generalizada de tipo escleroderma.
11. Método según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad fibrótica es la fibrosis pulmonar.
12. Método según la reivindicación 9, en el que la enfermedad fibrótica es un trastorno fibrótico de la piel.
13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho trastorno fibrótico de la piel es la formación excesiva de cicatriz.
14. Método para determinar el efecto de un compuesto de ensayo sobre una enfermedad fibrótica, que comprender poner en contacto células de ensayo que sobreexpresan *fra-2*, en el que las células de ensayo comprenden un vector transgénico, comprendiendo el vector transgénico: (i) el locus genómico *fra-2*, (ii) el promotor H2K^b, e (iii) una secuencia de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma murino FBJ, y que se han obtenido del roedor transgénico según la reivindicación 2, con un compuesto de ensayo, medir el efecto de dicho compuesto de ensayo sobre dichas células de ensayo y comparar dicho efecto con el efecto de dicho compuesto de ensayo sobre células de control.
15. Método según la reivindicación 14, en el que dichas células se han obtenido de un roedor transgénico con expresión ectópica de *fra-2*.
16. Método según la reivindicación 14, en el que la enfermedad fibrótica es la fibrosis generalizada de tipo escleroderma.
17. Método según la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad fibrótica es la fibrosis pulmonar.
18. Método según la reivindicación 14, en el que la enfermedad fibrótica es un trastorno fibrótico de la piel.
19. Método según la reivindicación 14, en el que dicho trastorno fibrótico de la piel es la formación excesiva de cicatriz.
20. Método según la reivindicación 14, en el que dichas células son células hematopoyéticas.
21. Método según la reivindicación 14, en el que dichas células son células epiteliales pulmonares.
22. Método según la reivindicación 14, en el que dichas células son células mesenquimales.

23. Método según la reivindicación 22, en el que dichas células mesenquimales son fibroblastos o miofibroblastos.

Figura 1

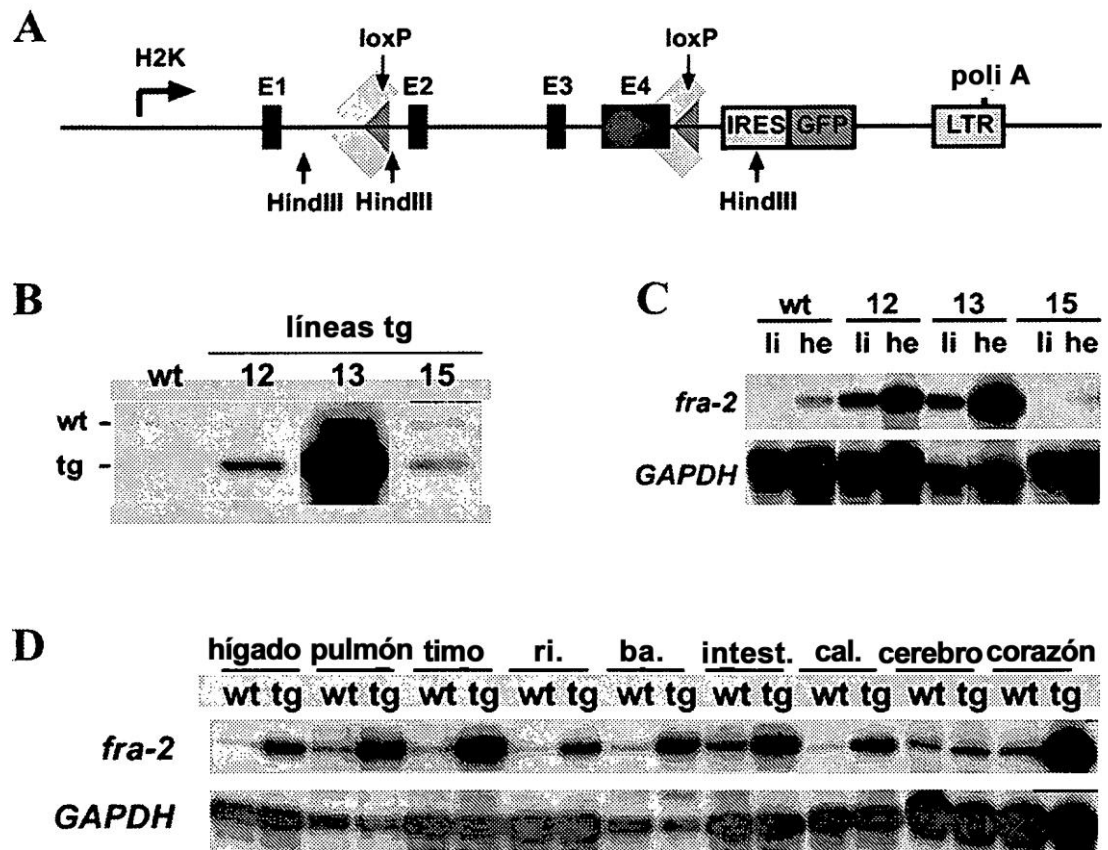


Figura 2

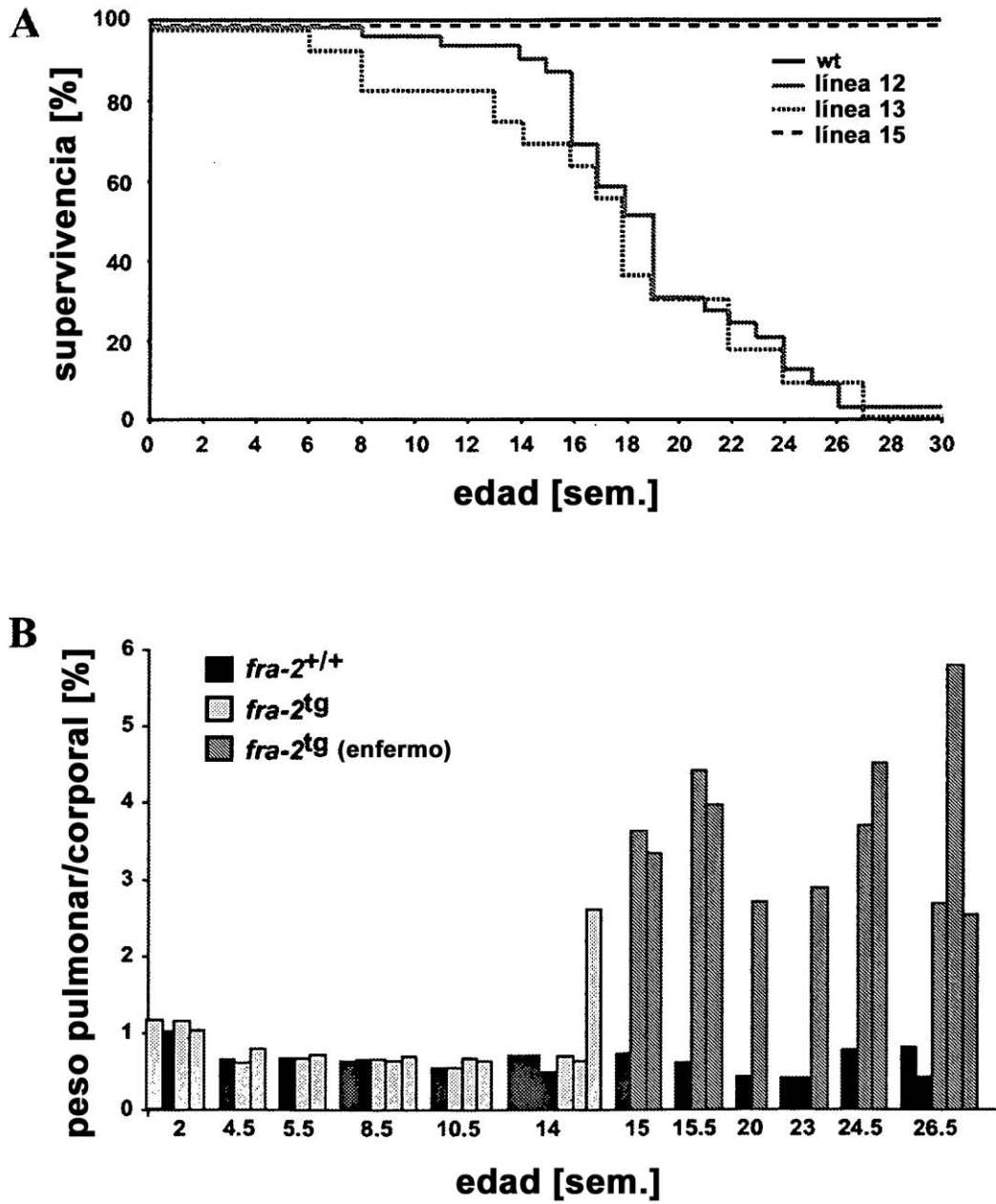


Figura 3

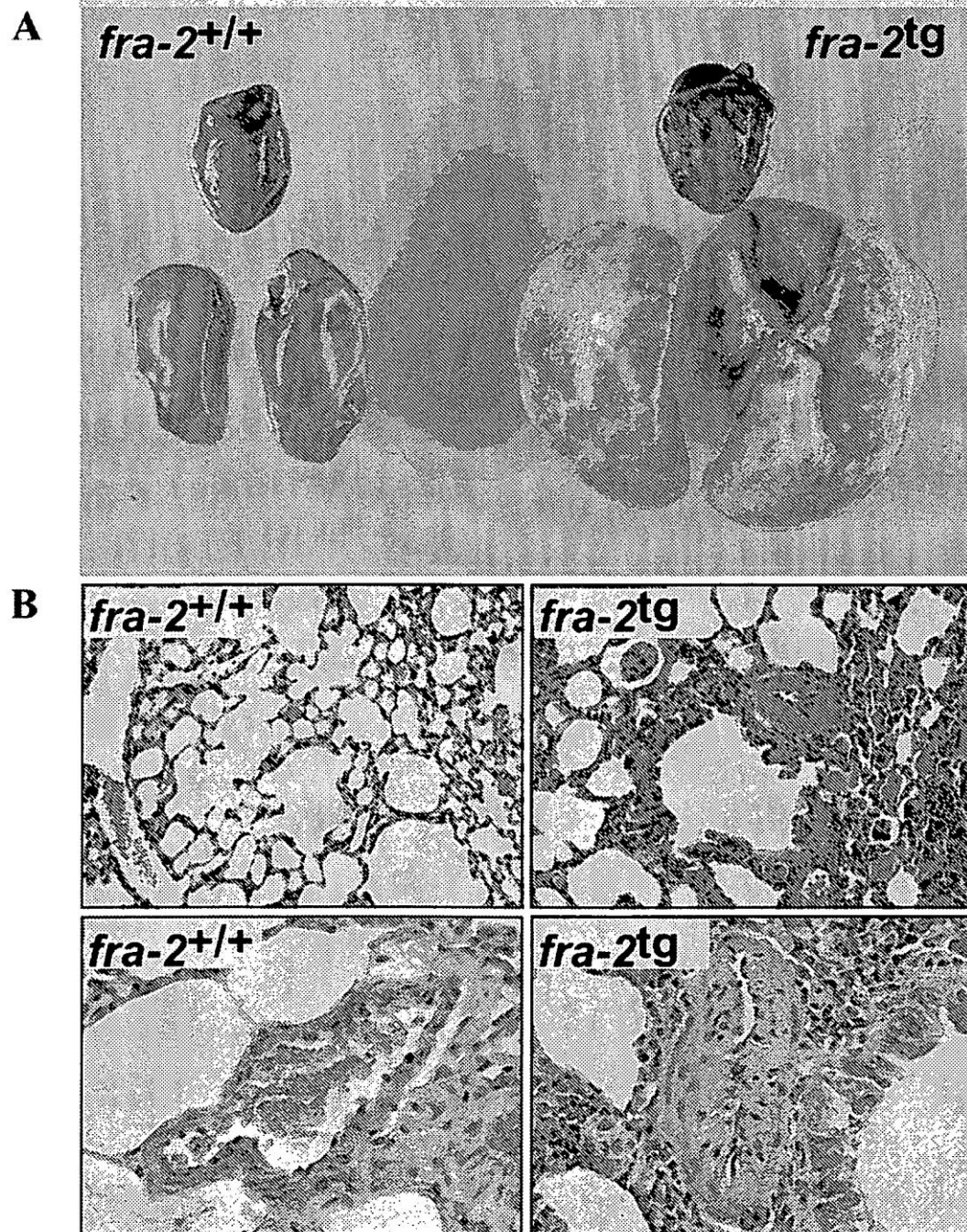


Figura 4A

A

fra-2^{+/+}

fra-2^{tg}

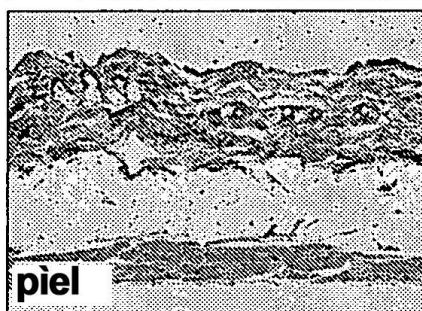
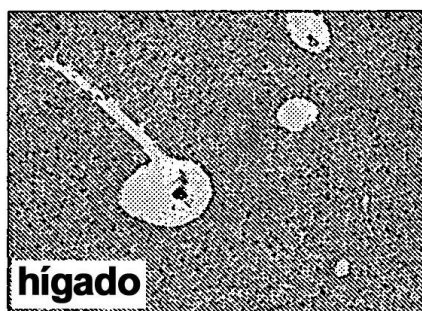
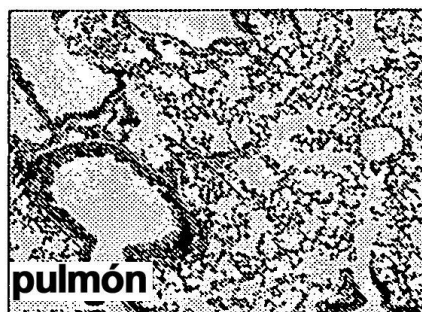


Figura 4B

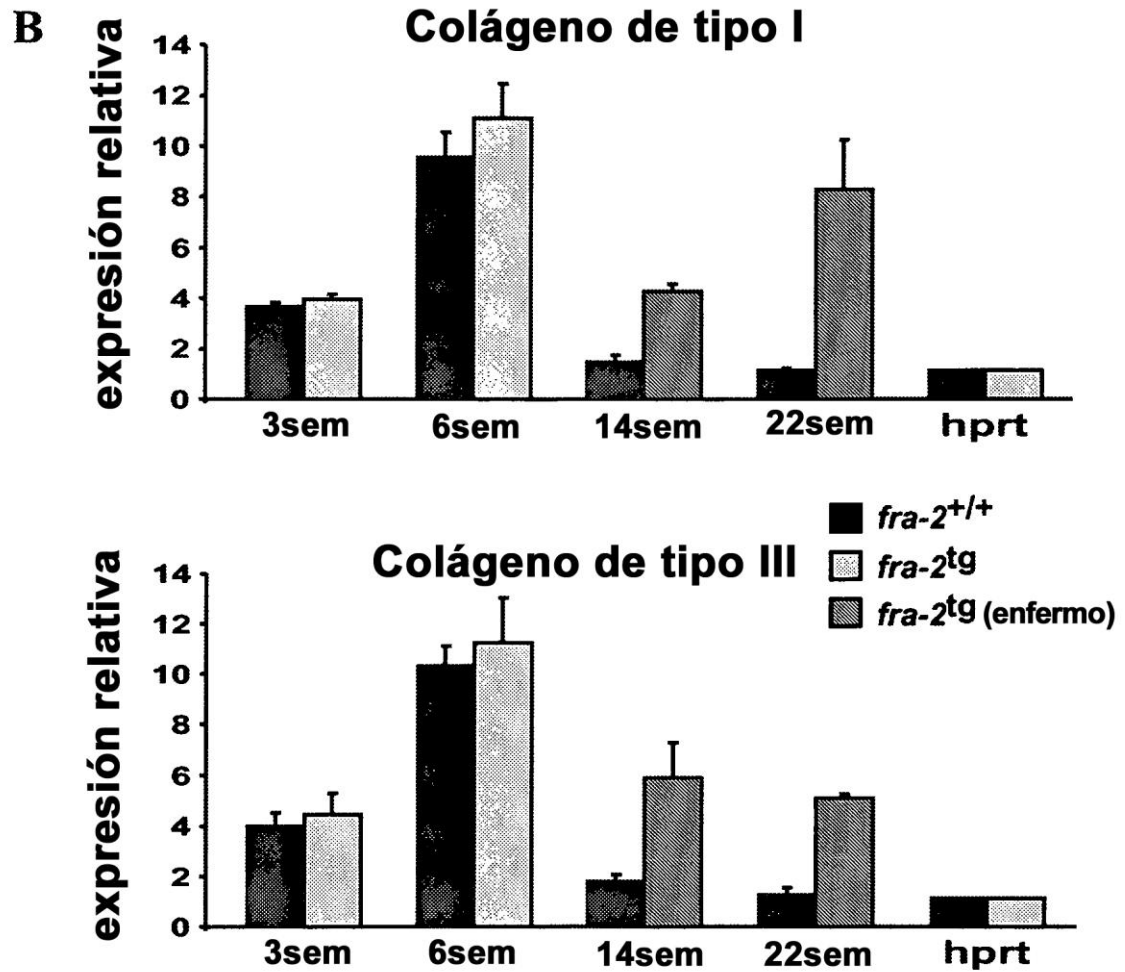


Figura 5A

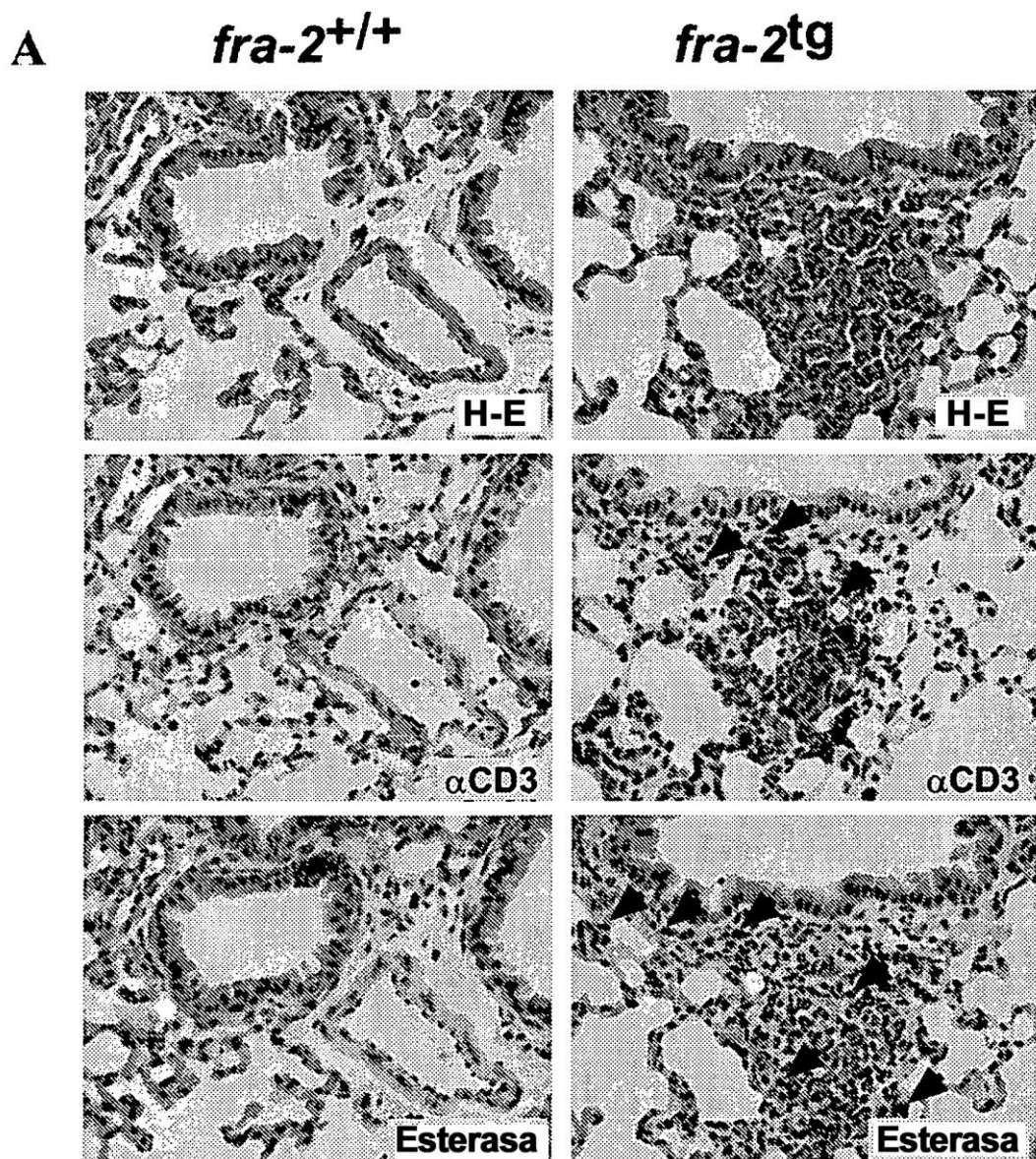


Figura 5B

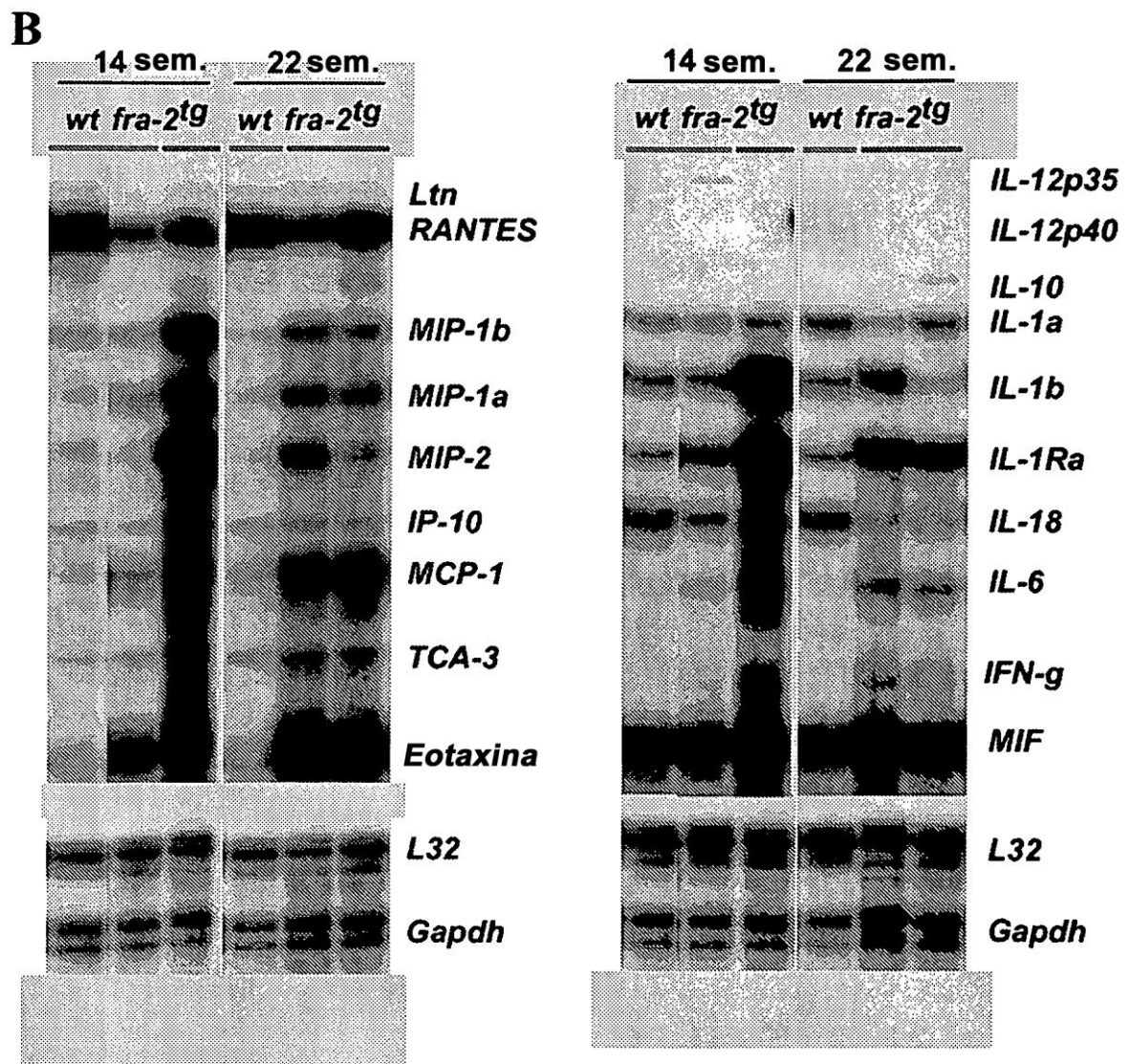


Figura 6A

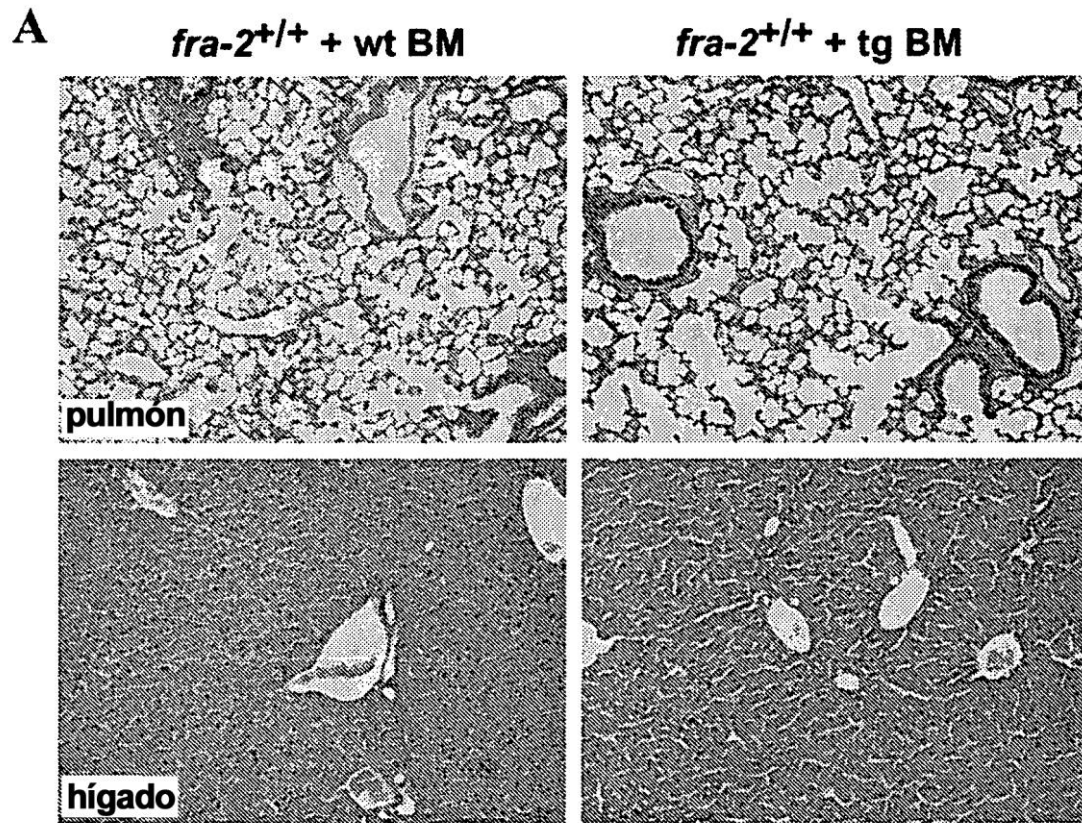


Figura 6B,C,D

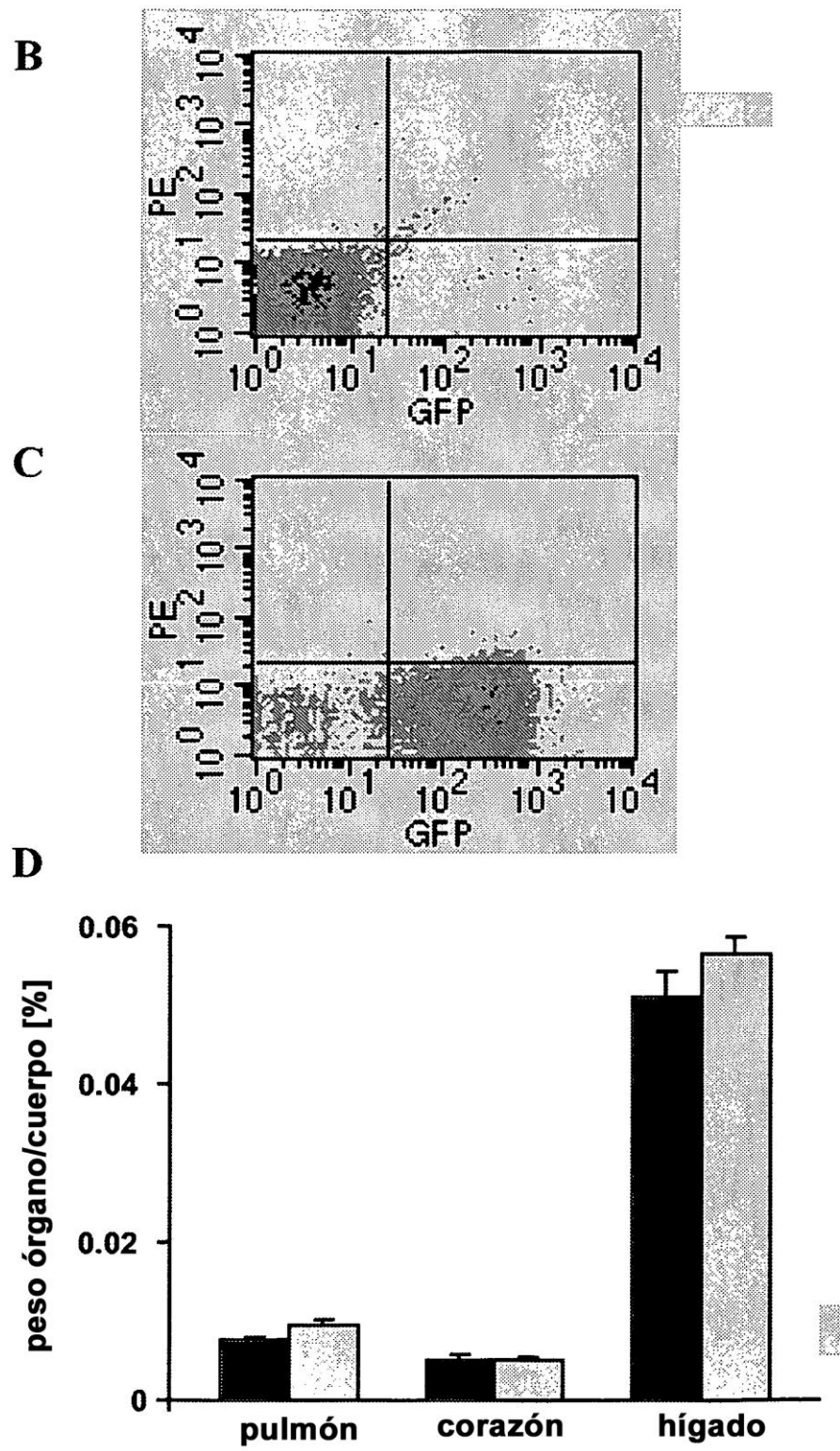


Figura 7A

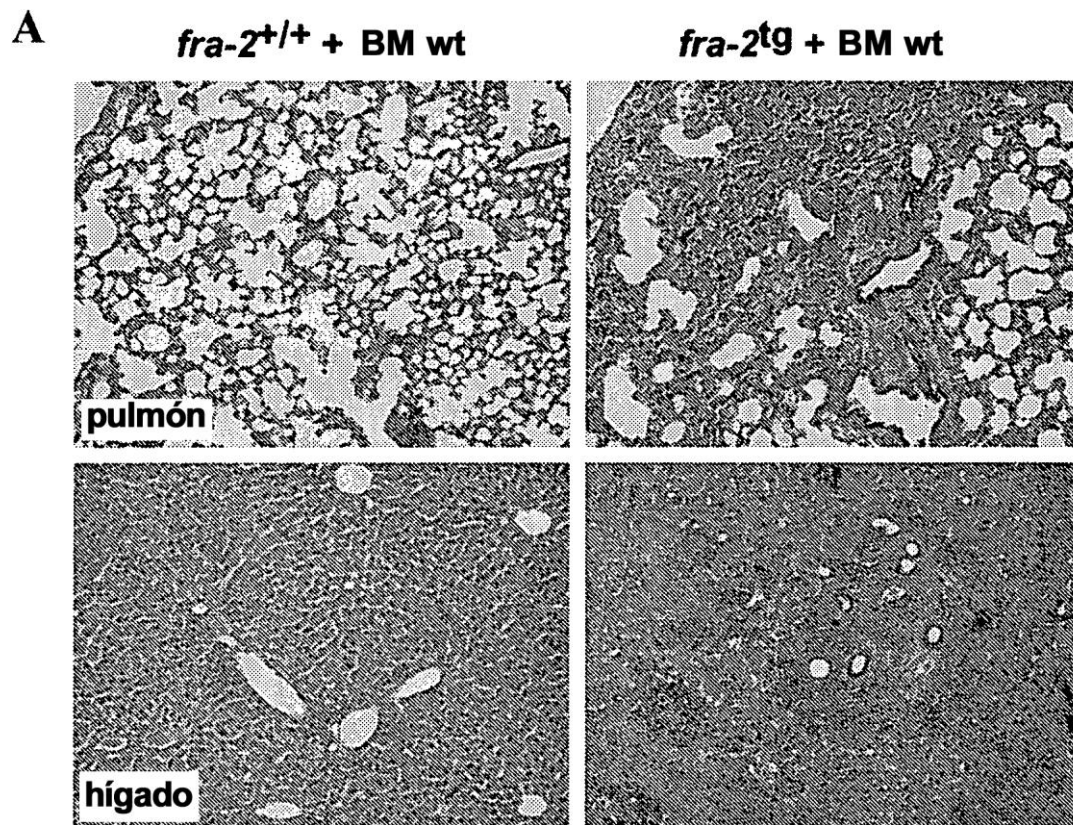


Figura 7B,C,D

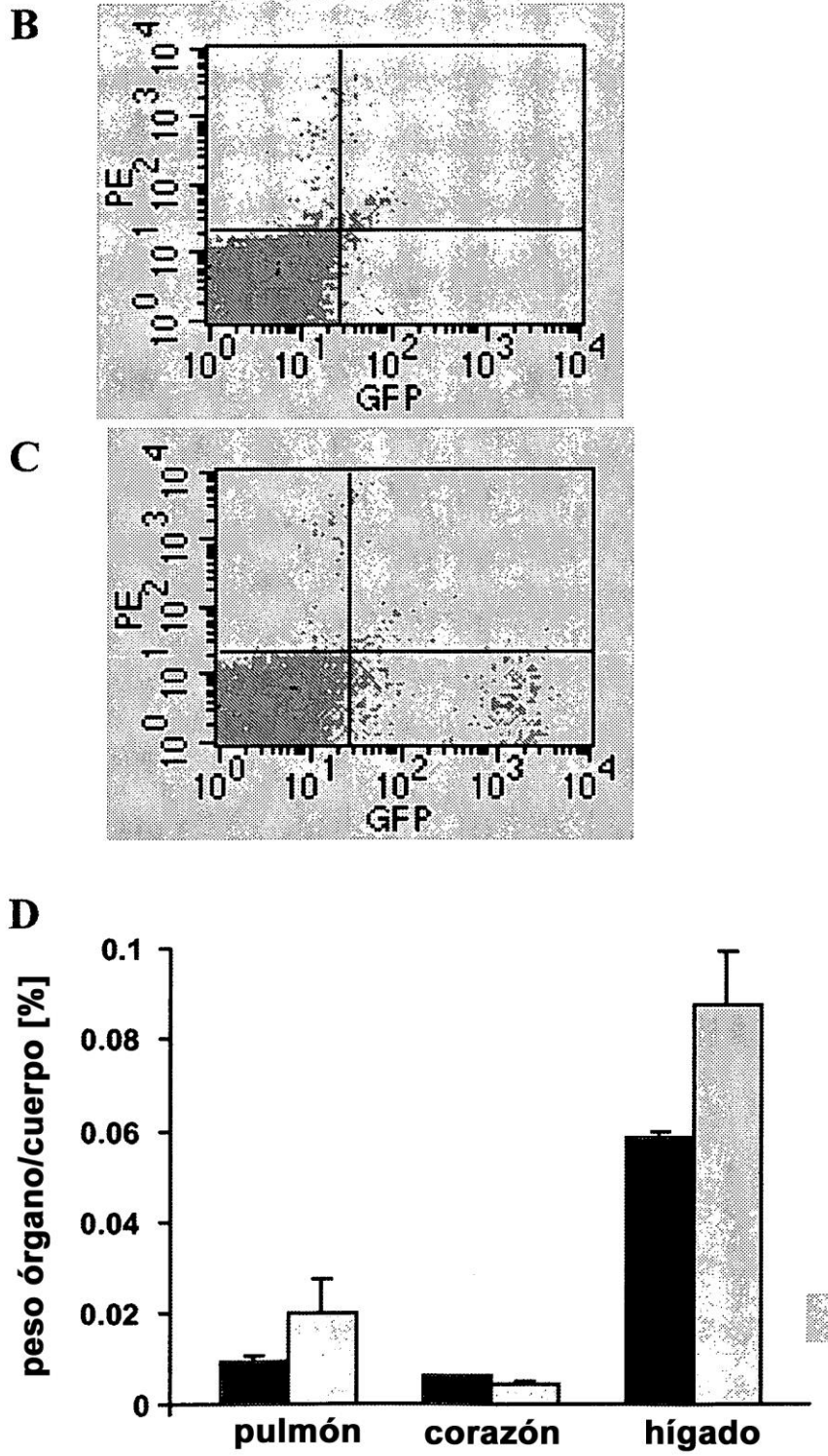


Fig. 8A,B

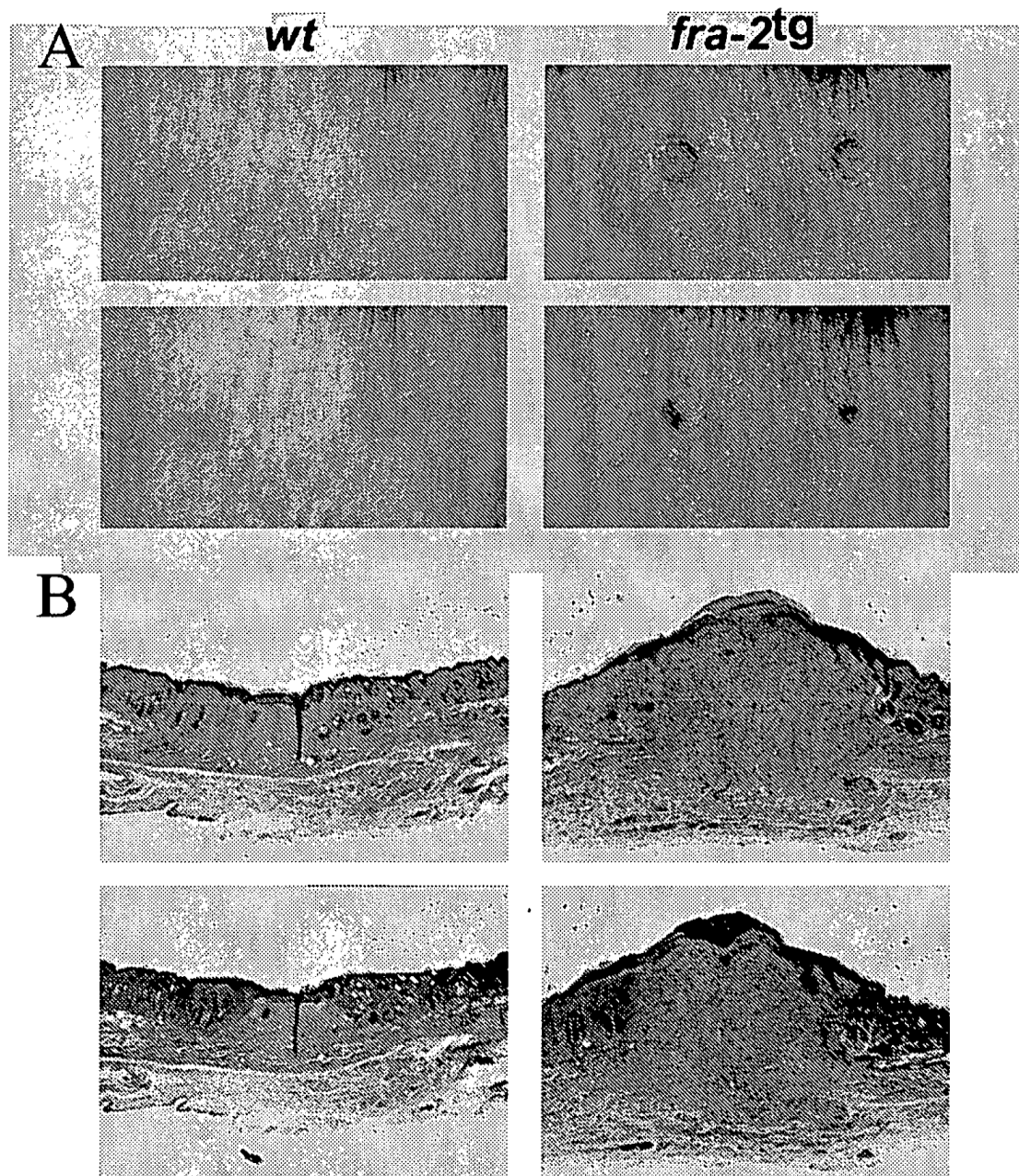


Figura 8C

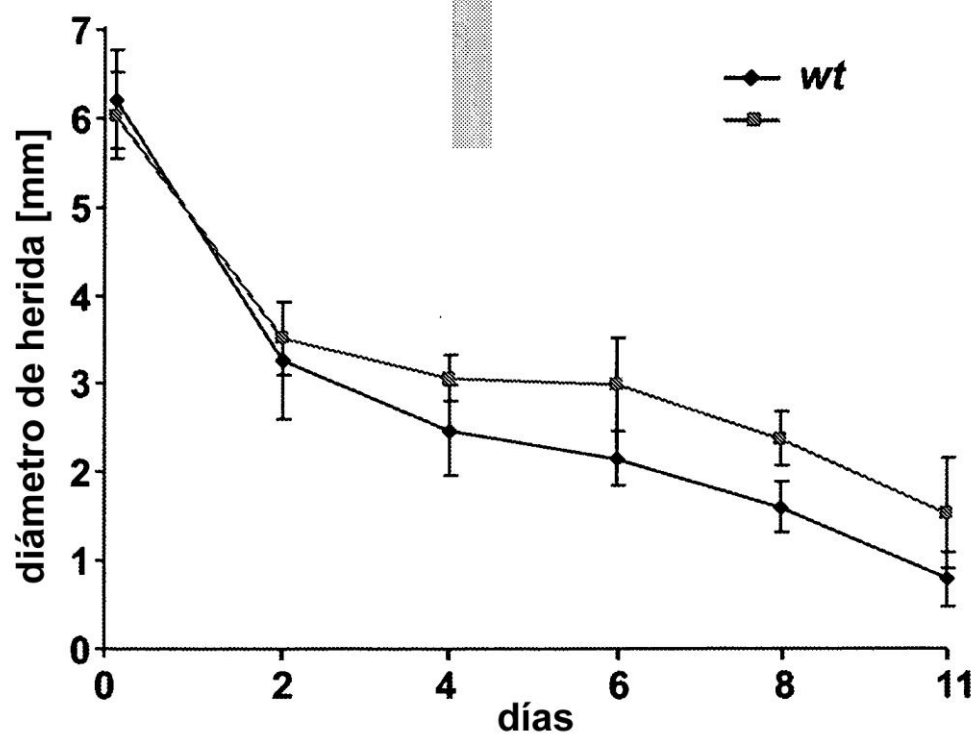


Fig. 8 D,E,F,G

