

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 779**

21 Número de solicitud: 201131892

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.11.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.06.2013

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070795

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ SERRANO, 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

FRADE LÓPEZ, José María

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **FOSFORILACIÓN EN LOS RESIDUOS THR-248 Y/O THR-250 DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN E2F4 COMO DIANA TERAPÉUTICA EN PROCESOS PATOLÓGICOS QUE
CURSAN POR POLIPLIIDÍA SOMÁTICA.**

57 Resumen:

Fosforilación en los residuos Thr-248 y/o Thr-250 del factor de transcripción E2F4 como diana terapéutica en procesos patológicos que cursan por poliploidía somática.

El objeto de la invención se basa en la inhibición de la fosforilación específica del factor de transcripción E2F4 humano en sus Thr-248 y/o Thr-250 para inhibir procesos de endoreduplicación somática en células postmitóticas que pueden estar asociados con diversas situaciones patológicas. La invención cubre cualquier método de inhibición específica de la fosforilación proteica conocido en la actualidad (incluido la expresión de formas mutantes de E2F4 carentes de los residuos Thr fosforilados por p38^{MAPK}) o desarrollado en el futuro que pueda ser aplicado a las Thr-248 y/o Thr-250 del factor de transcripción E2F4 humano.

ES 2 409 779 A1

DESCRIPCIÓN**FOSFORILACIÓN EN LOS RESIDUOS THR-248 Y/O THR-250 DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN E2F4 COMO DIANA TERAPÉUTICA EN PROCESOS PATOLÓGICOS QUE CURSAN POR POLIPLOIDÍA SOMÁTICA****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención pertenece al sector farmacéutico, en concreto se refiere a la identificación de dianas moleculares para el desarrollo de herramientas terapéuticas.

10**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Es conocida la asociación existente entre la reactivación del ciclo celular en células postmitóticas, con la consiguiente síntesis de ADN *de novo*, y diversos procesos patológicos que afectan tanto a neuronas (neurodegeneración, isquemia, etc.) como miocitos (cardiomiopatía hipertrófica, patologías vasculares asociadas a la hipertensión y envejecimiento). En muchos casos, la reactivación del ciclo celular no supone la división celular sino que forma parte de un mecanismo de endoreduplicación (Ullah et al., 2009) que se traduce en la generación de poliploidía somática (poliploidía que afecta únicamente a ciertos tipos celulares y no se transmite de generación en generación). Quizá un ejemplo de patología asociada a la poliploidía somática sea la enfermedad de Alzheimer (EA). En esta enfermedad, se sabe que las neuronas reactivan el ciclo celular antes de degenerar (Yang et al., 2003), incrementando el contenido de ADN en su núcleo (Arendt et al., 2010). Es previsible que estas neuronas sufran modificaciones morfológicas y funcionales que comprometan su supervivencia (Frade y López-Sánchez, 2010). De hecho, se ha descrito que las neuronas hiperploides son las que degeneran predominantemente en el cerebro de pacientes con EA (Arendt et al., 2010). El tejido muscular cardíaco contiene también un porcentaje de miocitos poliploides, cuya proporción puede verse alterada en situaciones patológicas (Yabe y Abe, 1980; Vliegen et al., 1995). El músculo liso vascular también puede sufrir alteraciones asociadas con la poliploidía (McCran et al. 2008). Es por ello que el conocimiento de la base molecular implicada en la endoreduplicación facilitará el diseño de herramientas

terapéuticas que prevengan las patologías asociadas a la poliploidización somática. Hasta la fecha no se han desarrollado herramientas terapéuticas conducentes a prevenir la endoreduplicación somática asociada con patologías humanas, probablemente porque se trata de un campo de investigación muy reciente en el que están empezando a surgir nuevos conceptos.

US20080139517A1 propone la administración de uno o más agentes capaces de inhibir la progresión del ciclo celular neuronal ya sea en una fase temprana del ciclo celular o reduciendo la estimulación mitogénica en la alteración de la memoria asociada a la edad (AAMI, del inglés *age associated memory impairment*), alteración cognitiva leve (MCI, del inglés *mild cognitive impairment*), EA, demencia cerebrovascular y otras condiciones neurodegenerativas retrogenéticas. Sin embargo, en dicho documento de patente se asume que el proceso degenerativo cursa por la progresión del ciclo celular clásico y no por endoreduplicación. Además, este documento de patente no amplía el espectro a otras enfermedades del sistema nervioso y del corazón en las que se ha descrito o pueda describirse reactivación del ciclo celular generador de poliploidía.

En Morillo et al., 2010, se indica que el proceso de endoreduplicación en neuronas conducente a la tetraploidía neuronal ocurre de manera natural durante el desarrollo embrionario, dando lugar a poblaciones específicas de neuronas que adquieren mayor tamaño, dendritas más largas, y regiones diferenciales de inervación en su tejido diana (Morillo et al., 2010). Se sabe que la endoreduplicación en estas neuronas surge en respuesta a la activación del receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) mediada por el factor de crecimiento nervioso NGF (del inglés "nerve growth factor"). Estas neuronas duplican su ADN y permanecen en un estado tipo G2 debido al efecto de la neurotrofina BDNF, la cual actúa a través de su receptor TrkB evitando la transición G2/M. Por tanto, se sabe que la tetraploidización neuronal tiene lugar durante el desarrollo del sistema nervioso mediado por NGF vía p75^{NTR}, induciendo la actividad del factor de transcripción E2F1, para la re-entrada en el ciclo celular. Aquellas neuronas tetraploides que no reciben suficiente señal de BDNF tratan de realizar la mitosis seguida de su muerte por apoptosis. En el cerebro de Alzheimer es conocida la presencia de p75^{NTR} y de NGF en las regiones afectadas. Esto sugiere que la

hiperploidía observada en las neuronas afectadas podría ser causada por el mismo mecanismo que genera neuronas tetraploides durante el desarrollo del sistema nervioso. La disminución de niveles de TrkB observada en estadios avanzados de la enfermedad podría facilitar la muerte neuronal (ver el desarrollo
5 de este modelo en Frade y López-Sánchez, 2010).

Deschênes et al. 2004, hace referencia a los mecanismos de regulación de la proliferación y la diferenciación del epitelio celular intestinal humano, e indica la posible fosforilación del factor de transcripción E2F4 por p38^{MAPK}. Sin embargo,
10 este documento concluye que actualmente existe la necesidad de investigar qué residuos del factor de transcripción E2F4 serían fosforilados por p38^{MAPK}, como parte de los mecanismos de regulación de la proliferación y la diferenciación del epitelio celular intestinal humano.

15 Ninguno de estos documentos identifica moléculas candidatas como dianas terapéuticas para inhibir la poliploidización patológica. Por tanto, actualmente existe la necesidad de prevenir la endoreduplicación causante de la poliploidización patológica en células postmitóticas como método terapéutico, mediante la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a un agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250, para su uso en
25 la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática.

Así mismo, la presente invención se refiere a un método de prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática, caracterizado porque comprende la administración al paciente de una cantidad
30 terapéuticamente efectiva de un agente inhibidor de la fosforilación del factor de transcripción E2F4 de SEQ ID No: 1, en su Thr248 y/o Thr250.

Por último, la presente invención se refiere al uso de un agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o

Thr250, como diana terapéutica en la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5

En una realización preferente de la presente invención, el agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250, para su uso en la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática, se caracteriza porque es una forma mutante del factor de transcripción E2F4, cuya secuencia aminoacídica se identifica como SEQ ID No: 1 (humano). Preferentemente, dicha forma mutante del factor de transcripción E2F4 con SEQ ID No: 1 presenta una sustitución en Thr248 y/o Thr250 por un aminoácido no susceptible de ser fosforilado por p38^{MAPK}, distinto de glutamato o aspartato. Más preferentemente, dicho aminoácido no susceptible de ser fosforilado, es Alanina.

En otra realización preferente de la presente invención, el agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250, para su uso en la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática, se caracteriza porque es un fragmento de E2F4 comprendido en SEQ ID No: 1, con idéntica capacidad de interferir con la fosforilación por p38^{MAPK} de E2F4 endógeno.

En otra realización preferente de la presente invención, el agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250, para su uso en la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática, se caracteriza porque es una forma de E2F4 de otra especie con mutaciones en las Thr conservadas. Preferentemente dicha forma de E2F4 de otra especie se selecciona entre SEQ ID No 2 (pollo) y SEQ ID No 3 (ratón) (ver Fig. 1).

En otra realización preferente de la presente invención, el agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250, para su uso en la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a

la poliploidía somática, se caracteriza porque es una molécula sintética que mimetiza la forma mutante del factor de transcripción E2F4 de SEQ ID No: 1, con una sustitución por Alanina en Thr248 y/o Thr250.

- 5 Por otro lado, la presente invención hace referencia al agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250, para su uso en la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática, caracterizado porque dicha poliploidía somática se produce por endoreduplicación en células postmitóticas. Preferentemente, dichas
- 10 células postmitóticas son neuronas y/o miocitos.

- Adicionalmente, la presente invención hace referencia al agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250, para su uso en la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a
- 15 la poliploidía somática, caracterizado porque dicha patología asociada a la poliploidía somática se selecciona de entre el siguiente grupo: enfermedad neurodegenerativa, isquemia, cardiomiopatía hipertrófica, patología vascular asociada a la hipertensión y envejecimiento. Preferentemente, dicha patología asociada a la poliploidía somática es una enfermedad neurodegenerativa. Aún
- 20 más preferentemente, dicha enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer.

- En otra realización preferente de la presente invención, el método de prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente
- 25 efectiva de un agente inhibidor de la fosforilación del factor de transcripción E2F4 de SEQ ID No: 1, en su Thr248 y/o Thr250, se caracteriza porque dicho agente inhibidor se puede encontrar comprendido o bien en un péptido o proteína asociado a otro péptido permeable a la membrana celular que facilita su incorporación al interior celular, o bien en un vector capaz de infectar neuronas
- 30 y/o miocitos, preferentemente adecuado para terapia génica, más preferentemente dicho vector es un vector viral, y aun más preferentemente dicho vector viral es un lentivirus.

Nuestro laboratorio ha desvelado el mecanismo empleado por NGF/p75^{NTR} para

inducir la reactivación del ciclo celular en neuronas de pollo durante el desarrollo embrionario, efecto que genera endoreduplicación y tetraploidía neuronal (Morillo et al., 2010). Dicho mecanismo se basa en la activación de la Ser/Thr kinasa p38^{MAPK} en el núcleo de las células afectadas (Fig. 2), y la posterior fosforilación del factor de transcripción E2F4 en residuos treonina (Fig. 3). Cualquier otra vía de señalización que activase p38MAPK en células postmitóticas podría resultar en hiperploidización empleando al factor de transcripción E2F4. En el pollo solo existen dos residuos susceptibles de ser fosforiladas por p38^{MAPK}, las treoninas Thr261 y Thr263 (Fig. 1). El uso del software NetPhosK 1.0 predice que estas treoninas están inmersas en un dominio conservado con las proteínas E2F4 humana y de ratón (Fig. 1). En el caso de la proteína E2F4 humana la treonina susceptible de ser fosforilada por p38^{MAPK}, tal y como predice el software NetPhosK 1.0, es la treonina Thr248 (el sitio consenso de fosforilación de la p38^{MAPK}, requiere de un residuo Pro consecutivo, secuencia TP, que se encuentra tras dicha treonina). Se ha considerado proteger también la Thr 250 humana pese a carecer de un residuo Pro consecutivo. El motivo es su grado de conservación con las treoninas Thr251 del ratón y Thr263 del pollo, ambas con un residuo Pro consecutivo y predichas por el software NetPhosK 1.0 como treoninas susceptibles de ser fosforiladas por p38^{MAPK}.

20

La fosforilación de los residuos Thr261/Thr263 de E2F4 es crucial para la reactivación del ciclo celular inducida por NGF vía p75^{NTR} en las células de retina de embrión de pollo en proceso de diferenciación neuronal (Fig. 4). Tal reactivación del ciclo celular conduce a la tetraploidía neuronal (Morillo et al., 2010). Hemos observado que el empleo de una forma constitutivamente activa de E2F4 de pollo, en la cual las Thr261 y Thr263 han sido substituidas por Glu (un aminoácido cargado negativamente que mimetiza el estado fosforilado de la Thr) es capaz de mimetizar el efecto de NGF sobre las neuronas de la retina (Fig. 4AB). También hemos demostrado que el uso de una forma dominante negativa de E2F4 de pollo (Thr261Ala/Thr263Ala) que impide su fosforilación por p38^{MAPK} es capaz de inhibir el efecto de NGF sobre el ciclo celular en cultivos neurogénicos de retina (Fig. 4C,D). Por ello, es previsible que la expresión de esta forma mutante Thr261Ala/Thr263Ala (o bien la forma humana Thr248Ala/Thr250Ala) en las neuronas o miocitos afectados asociados con las

30

patologías descritas anteriormente podría inhibir el proceso de endoreduplicación y la hiperploidización consiguiente, lo cual podría prevenir, o al menos ralentizar, la progresión de la enfermedad. La presente invención hace referencia al uso de dichas formas mutantes de E2F4 para prevenir la hiperploidización y los efectos
5 patológicos asociados en diversas enfermedades que afectan a células postmitóticas (neuronas y células musculares).

Por tanto, la presente invención demuestra que la fosforilación del factor de transcripción E2F4 en unos residuos Thr conservados homólogos de las Thr248 y
10 Thr250 en el E2F4 humano es crucial para la inducción de endoreduplicación en neuronas de retina.

Esta invención también protege cualquier método para inhibir de manera específica la fosforilación del factor de transcripción E2F4 humano en su Thr248
15 y/o Thr250 (en adelante fosfoE2F4). La inhibición de dicha fosforilación impediría la capacidad de E2F4 para inducir la síntesis de ADN en células postmitóticas, lo cual tiene claros beneficios terapéuticos.

La presente invención también hace referencia a cualquier método para inhibir la
20 señalización de p38^{MAPK}/fosfoE2F4, preferentemente mediante una forma mutante de E2F4 en la que la Thr 248 y/o la Thr250, ha(n) sido sustituida(s) por un residuo Ala, tal como hemos realizado en nuestro laboratorio con E2F4 de pollo.

De forma alternativa, la presente invención también hace referencia a cualquier
25 otro método de inhibición de la señalización de p38^{MAPK}/fosfoE2F4, como por ejemplo:

- sustitución de Thr248 y/o Thr250 por otros aminoácidos no susceptibles de ser fosforilados,
- uso de un fragmento de E2F4 con idéntica capacidad de interferir con la
30 fosforilación de E2F4 endógeno,
- uso de formas de E2F4 de otras especies con mutaciones en las Thr conservadas,
- uso de moléculas sintéticas que mimeticen la forma E2F4 mutada, etc.

La presente invención también protege cualquier medio de transferencia específica de las formas mutadas de E2F4 mencionadas anteriormente al interior de las células afectadas, como por ejemplo mediante vectores apropiados, péptidos susceptibles de atravesar la membrana celular, etc.

5

La invención supone las siguientes fases:

1) Generación de la molécula bloqueante de la fosforilación del factor de transcripción E2F4 humano en las células diana

10

La molécula elegida para bloquear la fosforilación de E2F4 humano en su residuo Thr248 y/o Thr250 (ya sea la secuencia del gen codificante para E2F4 humano o de otra especie, la secuencia peptídica de E2F4 humano o de otra especie, la secuencia parcial del gen codificante para E2F4 humano o de otra especie, la secuencia peptídica parcial de E2F4 humano o de otra especie, u otra molécula que mimetice la región o regiones de interacción entre E2F4 y p38^{MAPK} capaz de bloquear la fosforilación de E2F4 humano en su residuo Thr248 y/o Thr250) será generada por síntesis química o mediante clonación de la secuencia de ADNc en un plásmido que pueda generar vectores adecuados para terapia génica.

20

En este último caso, la secuencia codificante debe amplificarse previamente con una enzima termoestable y con capacidad *proof-reading* a partir de ADNc derivado del ARNm obtenido previamente de una línea celular o de un tejido de origen humano. Para clonar la secuencia se usan primers en los que se han incluido las dianas de restricción compatibles con el polilinker del vector elegido para su clonación. La elección de dicho vector se hace en base al procedimiento usado en el EJEMPLO 4 para introducir la secuencia elegida en las células diana. Una vez clonada la secuencia se realiza un proceso estándar de mutagénesis dirigida conducente a modificar específicamente el codón ACT codificante de la Thr248 y/o Thr250 para transformarlo en un codón específico de cualquier aminoácido excepto Glu o Asp. El plásmido así generado se co-transfecta en una línea celular apropiada capaz de empaquetar el vector de interés.

30

2) Expresión de la molécula bloqueante de la fosforilación del factor de

transcripción E2F4 humano en las células diana

En aquellas células en las que está activa la vía de señalización p38^{MAPK}-E2F4 se espera que p38^{MAPK} resulte inhibido al unirse al exceso de moléculas que mimetizan la forma de E2F4 mutada, capaz de interactuar con p38^{MAPK} pero incapaz de ser fosforilada. De este modo se bloquea el proceso de endoreduplicación en dichas células. Las moléculas bloqueantes pueden ser expresadas por las mismas células diana si son transferidas en forma de ADN (usando vectores apropiados tales como los lentivirus, p. ej.). Alternativamente, las moléculas bloqueantes pueden ser transferidas mediante péptidos capaces de atravesar la membrana celular con mayor o menor especificidad de tipo celular diana.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Estructura, dominios funcionales y conservación de secuencias del factor de transcripción E2F4. En la figura se ilustran la comparación entre las secuencias aminoacídicas de los factores de transcripción E2F4 humano Homo sapiens (H. sapiens), del ratón Mus musculus (M. musculus), del pollo Gallus gallus (G. gallus), del sapo Xenopus laevis (X. laevis) y del pez cebra Danio rerio (D. rerio). Se indican también los distintos dominios funcionales conocidos, que incluyen la región de unión al ADN (DB), el dominio de dimerización (DIM), la "marked box" (MB) y el dominio de transactivación (TA). Se indica también la región que incluye las Thr248 y Thr250 de la secuencia humana conservadas en las otras especies (indicado por pequeños rectángulos): Thr249 y Thr251 en la secuencia del ratón, Thr 261 y Thr263 en la secuencia del pollo, Thr228 en el

sapo y Thr217 en el pez cebra. A esta región la denominamos dominio regulador (RD). Los aminoácidos conservados completamente en el dominio regulador se indican con un punto.

FIGURA 2. La activación de p38^{MAPK} nuclear en respuesta a NGF es necesaria para la reactivación del ciclo en cultivos neurogénicos de células de retina de embrión de pollo en E6. Estas células responden a NGF induciendo la reactivación del ciclo celular que conduce a la tetraploidía somática (endoreduplicación) (Morillo et al., 2010). A. western blot con anti-p38^{MAPK} activo (P-p38^{MAPK}) y anti-p38^{MAPK} en extractos nucleares de los cultivos neurogénicos mencionados tratados durante el tiempo indicado con 100 ng/ml NGF. Los ratios normalizados (Normalized ratio) entre los niveles de P-p38^{MAPK} y p38^{MAPK} se indican en la base. B. Tinción inmunocitoquímica con anticuerpos anti-p38^{MAPK} activo (P-p38^{MAPK}) en los cultivos neurogénicos mencionados tratados con 100 ng/ml NGF durante 20 min. Los nucleos se marcaron con bisbenzimidida (Bisb.). Nótese el aumento de señal en el nucleo de las células tratadas con NGF. C. Ensayo de luciferasa en extractos de cultivos neurogénicos de células de retina de embrión pollo E6 transfectadas con un plásmido que expresa luciferasa bajo el control del promotor del gen *cMyc*, conocido por su respuesta a E2F durante la transición G1/S, y otro plásmido con expresión constitutiva de β -galactosidasa. Los valores de la ratio luciferasa/ β -galactosidasa se representan como "Actividad luciferasa". El tratamiento con 100 ng/ml NGF supone la activación del promotor *cMyc*, indicio de reactivación del ciclo celular. Este efecto se bloquea con el inhibidor selectivo de p38^{MAPK} SB203580 (usado a 5 μ M). D. Incorporación de BrdU, como indicativo de entrada en fase S, en cultivos neurogénicos de células de retina de embrión pollo E6. El tratamiento con 100 ng/ml NGF supone el incremento en la proporción de células en fase S, efecto bloqueado por el inhibidor selectivo de p38^{MAPK} SB203580 (usado a 5 μ M), pero no por el inhibidor selectivo de JNK (c-Jun N-terminal kinase) SP600125 (usado a 7 μ M). * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$ (Test t de Student)

30

FIGURA 3. Fosforilación de E2F4 en residuos treonina promovida por NGF en cultivos neurogénicos de células de retina de embrión de pollo en E6. En la parte superior se muestra un western blot realizado con anticuerpos anti-fosfoThr (α p-

Thr) en extractos inmunoprecipitados con anticuerpos anti-E2F4, procedentes de los cultivos indicados tratados con diferentes combinaciones de 100 ng/ml NGF y el inhibidor selectivo SB203580 (usado a 5 μ M). En la parte inferior se muestra un western blot realizado con anticuerpos anti-E2F4 en los mismos extractos sin
 5 inmunoprecipitar (INPUT). Puede observarse cómo la presencia de NGF supone el incremento en la fosforilación en residuos treonina, en tanto que la presencia del inhibidor de p38^{MAPK} inhibe tal fosforilación.

FIGURA 4. La fosforilación de E2F4 en los residuos Thr261/Thr263 es capaz de
 10 inducir reactivación del ciclo en cultivos neurogénicos de células de retina de embrión de pollo en E6. A. Actividad luciferasa analizada tal y como se describe en la Figura 2C. La expresión de la forma constitutivamente activa de E2F4 (E2F4-CA), caracterizada por las sustituciones Thr261Glu/Thr263Glu, induce la actividad del promotor cMyc, efecto observable incluso en presencia del inhibidor
 15 selectivo de p38^{MAPK} SB203580 (usado a 5 μ M). B. La incorporación de BrdU se incrementa significativamente en células transfectadas con la forma constitutivamente activa de E2F4 (E2F4-CA), efecto observable incluso en presencia del inhibidor selectivo de p38^{MAPK} SB203580 (usado a 5 μ M). De los resultados mostrados en los paneles A y B se deduce que p38^{MAPK} actúa
 20 exclusivamente a través de los residuos Thr261/Thr263. C. Actividad luciferasa analizada tal y como se describe en la Figura 2C. La expresión de la forma dominante negativa de E2F4 (E2F4-DN), caracterizada por las sustituciones Thr261Ala/Thr263Ala, previene el efecto de 100 ng/ml NGF sobre la actividad del promotor cMyc. D. La expresión de la forma dominante negativa de E2F4 (E2F4-
 25 DN), previene el efecto de 100 ng/ml NGF sobre la incorporación de BrdU en los cultivos neurogénicos de retina.

FIGURA 5. Esquema del procedimiento de clonación de la secuencia codificante de E2F4 en un plásmido que permita la generación de un vector apropiado para
 30 terapia génica (lentivirus, etc.), por ejemplo. El ARNm obtenido a partir de células o tejido humano se convierte en ADNc utilizando una transcriptasa reversa. La secuencia codificante de E2F4 humano se representa como un rectángulo gris en el que se indica la posición del codón codificante de la Thr 248. Este codón está

flanqueado por dos dianas de restricción específicas (C y D). Se diseñan dos primers a partir de la secuencia de los extremos de la región codificante con una diana de restricción específica en sus extremos 5' (A y B). Estas dianas aparecen también en el polilinker del vector de expresión, y son usadas para la clonación de la secuencia codificante de E2F4 en dicho vector. P: promotor encargado de la transcripción de la proteína E2F4. pol: secuencia de poliadenilación usada para introducir una cola poli(A) en el ARNm generado por el vector.

FIGURA 6. Esquema del procedimiento de mutagénesis de la secuencia codificante de E2F4. Se diseñan una pareja de primers externos que flanquean las dianas de restricción C y D (flechas externas) y otra pareja solapante de primers internos que incluyen en su secuencia el codón de Thr248 mutagenizado (flechas internas). Se realizan dos reacciones de amplificación por PCR con DNA polimerasa Pfu y los productos de la reacción se desnaturalizan conjuntamente. Después de renaturalizar el ADN se obtienen, entre otras posibilidades, la situación indicada en el esquema. La extensión con DNA polimerasa Pfu crea doble hélices de ADN con las secuencias de los primers externos en sus extremos. Estas secuencias se amplifican exponencialmente con dichos primers resultando en fragmentos de ADN con la Thr248 mutagenizada en Ala, flanqueada por las dianas de restricción C y D. La secuencia que contiene la mutación se puede subclonar en el vector de expresión usando para ello las dianas de restricción C y D.

BIBLIOGRAFÍA

- Arendt T, Brückner MK, Mosch B, Lösche A. (2010) "Selective cell death of hyperploids neurons in Alzheimer's disease". *Am. J. Pathol.* 177:15-20.
- Deschênes et al. 2004 "The Nucleocytoplasmic Shuttling of E2F4 Is Involved in the Regulation of Human Intestinal Epithelial Cell Proliferation and Differentiation".
- Frade JM, López-Sánchez N. (2010) "A novel hypothesis for Alzheimer disease based on neuronal tetraploidy induced by p75NTR". *Cell Cycle* 9:1934-1941.
- McCrann DJ, Nguyen HG, Jones MR, Ravid K. (2008) "Vascular smooth muscle cell polyploidy: an adaptive or maladaptive response?" *J. Cell Physiol.* 215:588-592.

- Morillo SM, Escoll P, de la Hera A, Frade JM. (2010) "Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:109-114.
- 5 - Ullah Z, Lee CY, Lilly MA, DePamphilis ML. (2009) Developmentally programmed endoreduplication in animals. *Cell Cycle* 8:1501-1509.
- Vliegen HW, Eulderink F, Brusckhe AV, van der Laarse A, Cornelisse CJ. (1995) "Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium". *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* 5:27-31.
- 10 - Yabe Y, Abe H. (1980) "Changes in DNA synthesis in significantly hypertrophied human cardiac muscle". *Adv. Myocardiol.* 1:553-563.
- Yang Y, Mufson EJ, Herrup K. (2003) "Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease". *J. Neurosci.* 23:2557-2563.

15 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como

20 limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1 - *Clonación de la secuencia codificante de E2F4 humano*

25

La secuencia codificante de E2F4 humano (posiciones 64-1305 de la secuencia con número de acceso en el NCBI: NM_001950) (SEQ ID No 4) se clona en un plásmido que pueda generar vectores adecuados para terapia génica (vectores lentivirales, por ejemplo). La secuencia codificante debe amplificarse previamente

30 con la enzima ADN polimerasa Pfu a partir de ADNc derivado del ARNm obtenido previamente de una línea celular o de un tejido de origen humano. Para clonar la secuencia se usan primers en los que se han incluido las dianas de restricción EcoRV y PaeI (subrayadas en las secuencias indicadas al pie de este párrafo) compatibles con el poli-linker del vector de expresión lentiviral (ver esquema

simple de dicho vector en la Fig 5, la diana EcoRV se correspondería con A y la diana PacI se correspondería con B en dicho esquema). Ejemplos de estos oligonucleótidos son los siguientes:

- 5 SEQ ID No 5: Oligo 5': 5'-CAACAGATATCATGGCGGAGGCCGGGCCACA-3'
 SEQ ID No 6: Oligo 3': 5'-CCATTAATTAAGGGTCCCAGCCACACAGGGC-3'

Correspondientes el primero a los nucleótidos en posición 64-83 y complementario el segundo a los nucleótidos en posición 1319-1338 de la
 10 secuencia de E2f4 humano.

El amplicón así obtenido se clona en el vector pGEM-Teasy (Promega), el cual no posee dianas de restricción EcoRV o PacI, en el que se realizará la mutagénesis dirigida descrita en el punto 2.

15

EJEMPLO 2 - *Mutación de la Thr248 (la mutación de la Thr250 puede hacerse mediante un procedimiento similar una vez generada la mutación Thr248Ala)*

Una vez clonada la secuencia de E2F4 humano en el vector pGEM-Teasy se
 20 diseñan oligonucleótidos en la región comprendida entre las posiciones 731-754 de la secuencia codificante de E2f4 humano, correspondiente a la SEQ ID No 4.

Estos oligonucleótidos incluyen el codón ACT codificante de la Thr248 (en la posición 742-744 de la secuencia codificante de E2f4 humano) mutado como codón específico de Ala (secuencia GCT). Ejemplos de estos oligonucleótidos

25 pueden ser:

SEQ ID No 7: Oligo 5'mutado: 5'-TCAGCTCGCTCCCACTGCTG-3' (posición 735-754).

SEQ ID No 8: Oligo 3'mutado: 5'-CAGTGGGAGCGAGCTGAGGA-3' (posición
 30 732-751).

Estos oligonucleótidos (que contienen la mutación subrayada) serán usados como primers de dos reacciones independientes indicadas en la Fig. 6. Para estas reacciones se diseña otra pareja de primers que flanquean las dianas de

restricción de la enzima BspEI (indicadas como C y D en la Fig 6). En la secuencia del ADNc codificante para E2F4 humano existen dos dianas BspEI en las posiciones 374-379 y 979-984, con secuencia TCCGGA. Ejemplos de estos primers pueden ser:

5

SEQ ID No 9: Oligo 5' no mutado: 5'-AAGGTGTGGGTGCAGCAGAG-3' (posición 352-371).

SEQ ID No 10: Oligo 3' no mutado: 5'-GGTCTGCCTTGATGGGCTCA-3' (posición 1005-1025).

10

Posteriormente se realizan dos reacciones de amplificación por PCR con DNA polimerasa Pfu tal como se indica en el esquema de la Fig. 6 (Oligo 5' no mutado con Oligo 3' mutado y Oligo 5' mutado con Oligo 3' no mutado), y los productos de la reacción se desnaturalizan conjuntamente. Después de renaturalizar el ADN se

15 obtienen, entre otras posibilidades, la situación indicada en el esquema de la Fig. 6. La extensión con DNA polimerasa Pfu de estos híbridos crea doble hélices de ADN susceptibles de ser amplificados con primers externos (Oligo 5' no mutado y Oligo 3' no mutado; ver Fig. 6). De este modo se obtienen fragmentos de ADN con la Thr248 mutagenizada en Ala, flanqueada por las dianas de restricción C y

20 D (ver Fig. 6). La secuencia que contiene la mutación se puede subclonar entonces en el plásmido pGEM-Teasy generado en el punto 1, usando para ello las dianas de restricción C y D (BspEI). Después de secuenciarse los clones modificados se selecciona uno en el que la secuencia se haya incorporado en la orientación adecuada.

25

EJEMPLO 3 - *Generación de vectores para terapia susceptibles de infectar el sistema nervioso*

El plásmido pGEM-Teasy con la secuencia codificante de E2F4 humano mutada

30 (T248A) se corta con las enzimas EcoRV y PaeI para liberar dicha secuencia y se subclona en el vector de expresión lentiviral pSMPUW-Hygro (Cell Biolabs, Inc.) en su poli-linker que contiene las dianas EcoRV y PaeI. El vector así generado se co-transfecta en una línea celular apropiada capaz de empaquetar el vector de interés.

EJEMPLO 4 - *Expresión de la forma mutada de E2F4 en células diana*

En aquellas neuronas o miocitos en los que está activa la vía de señalización
5 p38^{MAPK}-E2F4 se espera que p38^{MAPK} resulte inhibido al unirse al exceso de
moléculas de E2F4 mutado, al igual que hemos observado en neuronas en
proceso de diferenciación tratadas con NGF. De este modo se bloquea el proceso
de endoreduplicación en dichas células. Dado que la fosforilación de E2F4 en su
Thr248 no participa en otras funciones celulares excepto la endoreduplicación, su
10 presencia en otras células no debería tener efectos colaterales.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente inhibidor de la fosforilación por p38^{MAPK} del factor de transcripción E2F4 en su Thr248 y/o Thr250 seleccionado del grupo formado por
- 5
- a) una forma mutante del factor de transcripción E2F4 con SEQ ID No: 1,
 - b) un fragmento de E2F4 comprendido en SEQ ID No: 1, con idéntica capacidad de interferir con la fosforilación por p38^{MAPK} de E2F4 endógeno,
 - 10 c) una forma de E2F4 de otra especie con mutaciones en las Thr conservadas y
 - d) una molécula sintética que mimetiza la forma mutante del factor de transcripción E2F4 de SEQ ID No: 1, con una sustitución por Alanina en Thr248 y/o Thr250
- 15 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una patología asociada a la poliploidía somática, caracterizado porque dicha poliploidía somática se produce por endoreduplicación en células postmitóticas, caracterizado porque dichas células postmitóticas son neuronas y/o miocitos,
- 20 selecciona de entre el siguiente grupo: enfermedad neurodegenerativa, isquemia, cardiomiopatía hipertrófica, patología vascular asociada a la hipertensión y envejecimiento.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha forma mutante del factor de transcripción E2F4 con SEQ ID No: 1 presenta una sustitución en Thr248 y/o Thr250 por un aminoácido no susceptible de ser fosforilado por p38^{MAPK}.
- 25
3. Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho aminoácido no susceptible de ser fosforilado, es Alanina.
- 30
4. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha forma de E2F4 de otra especie se selecciona entre SEQ ID No 2 y/o SEQ ID No 3.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicha patología asociada a la poliploidía somática es una enfermedad neurodegenerativa.
- 5 6. Uso según la reivindicación 5, caracterizado porque dicha enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque dicho agente inhibidor se encuentra comprendido en un péptido o proteína
10 asociado a otro péptido permeable a la membrana celular que facilita su incorporación al interior celular.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque
15 dicho agente inhibidor se encuentra comprendido en un vector capaz de infectar neuronas y/o miocitos .
9. Uso según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho vector es un vector viral.
- 20 10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho vector viral es un lentivirus.

FIG. 1

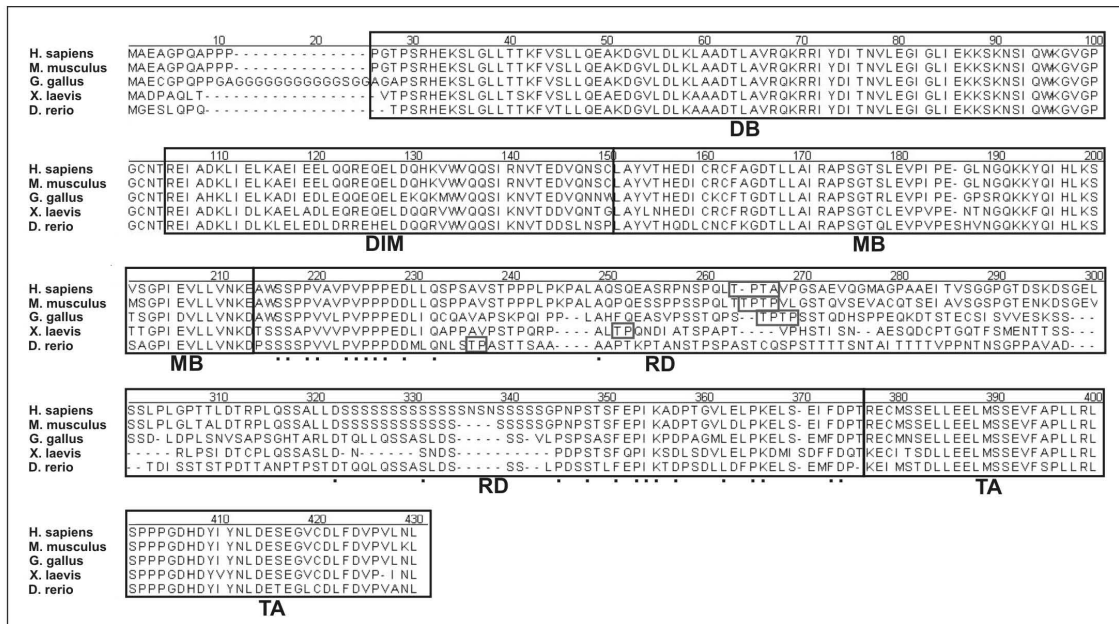


FIG. 2

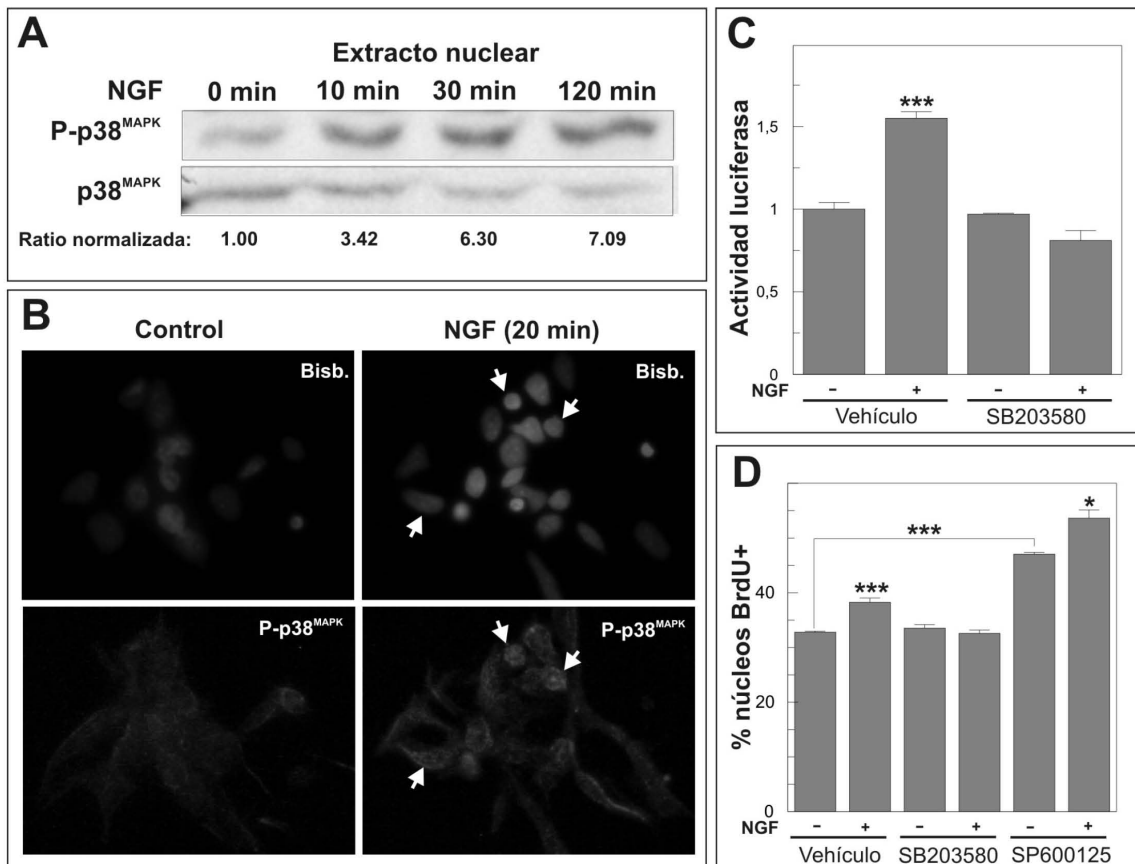


FIG. 3

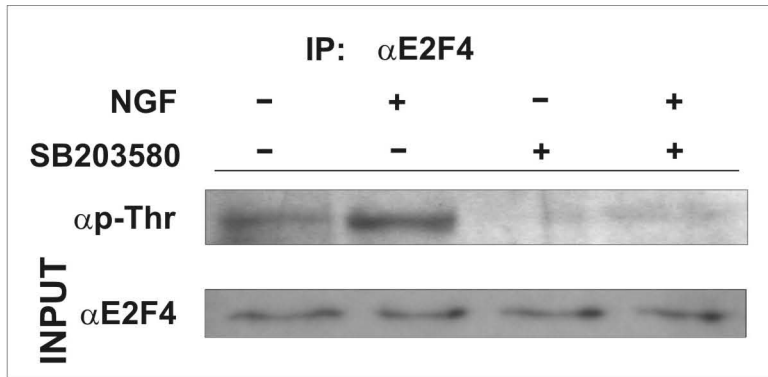


FIG. 4

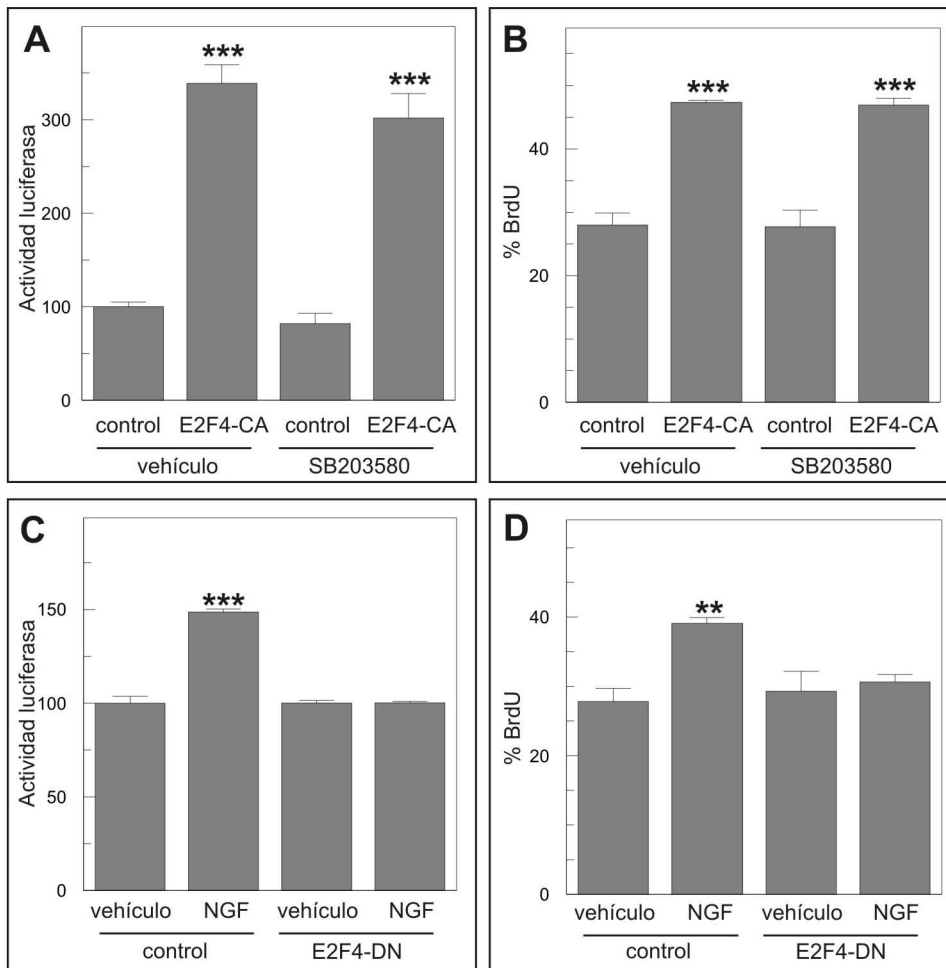


FIG. 5

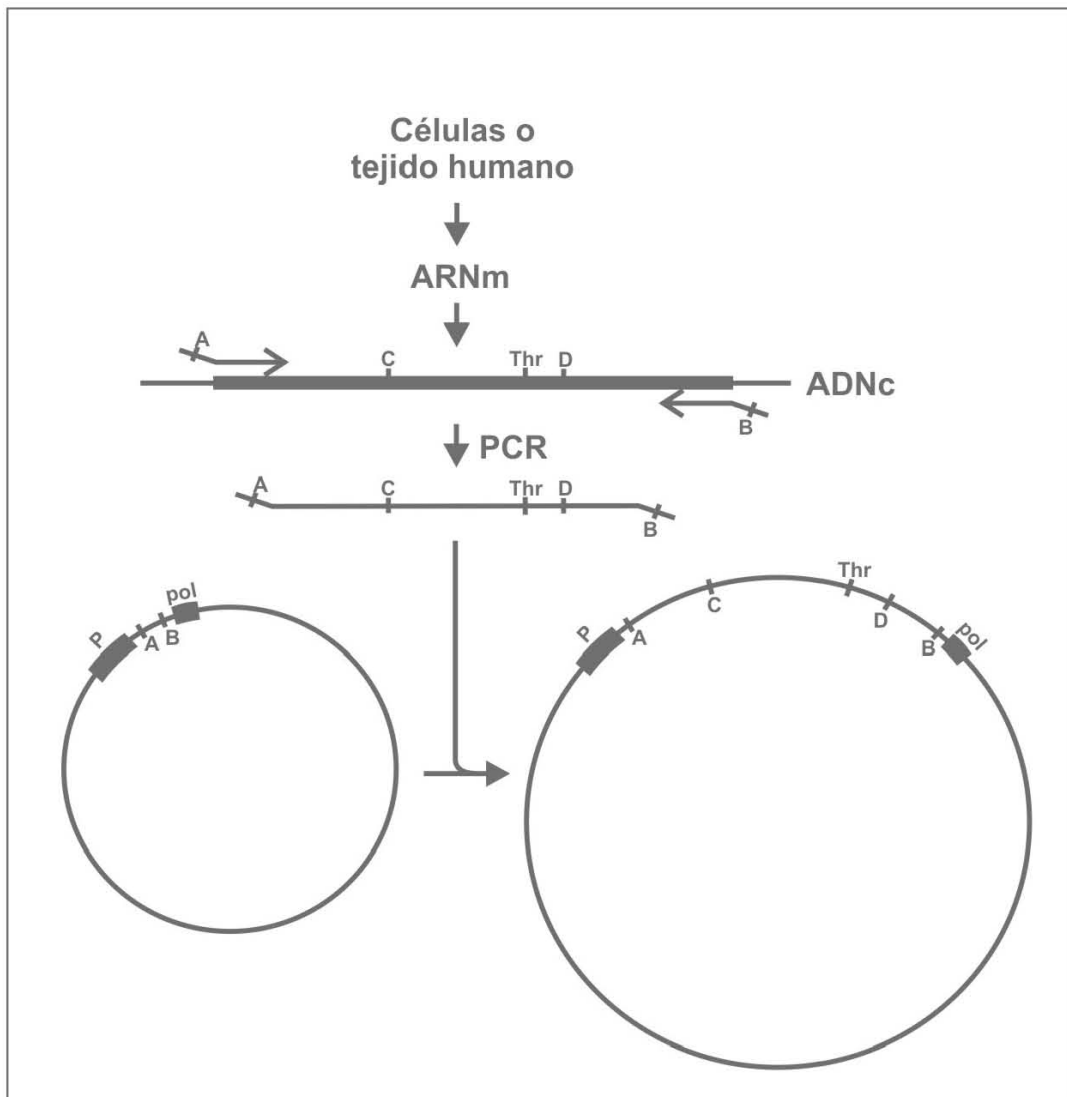
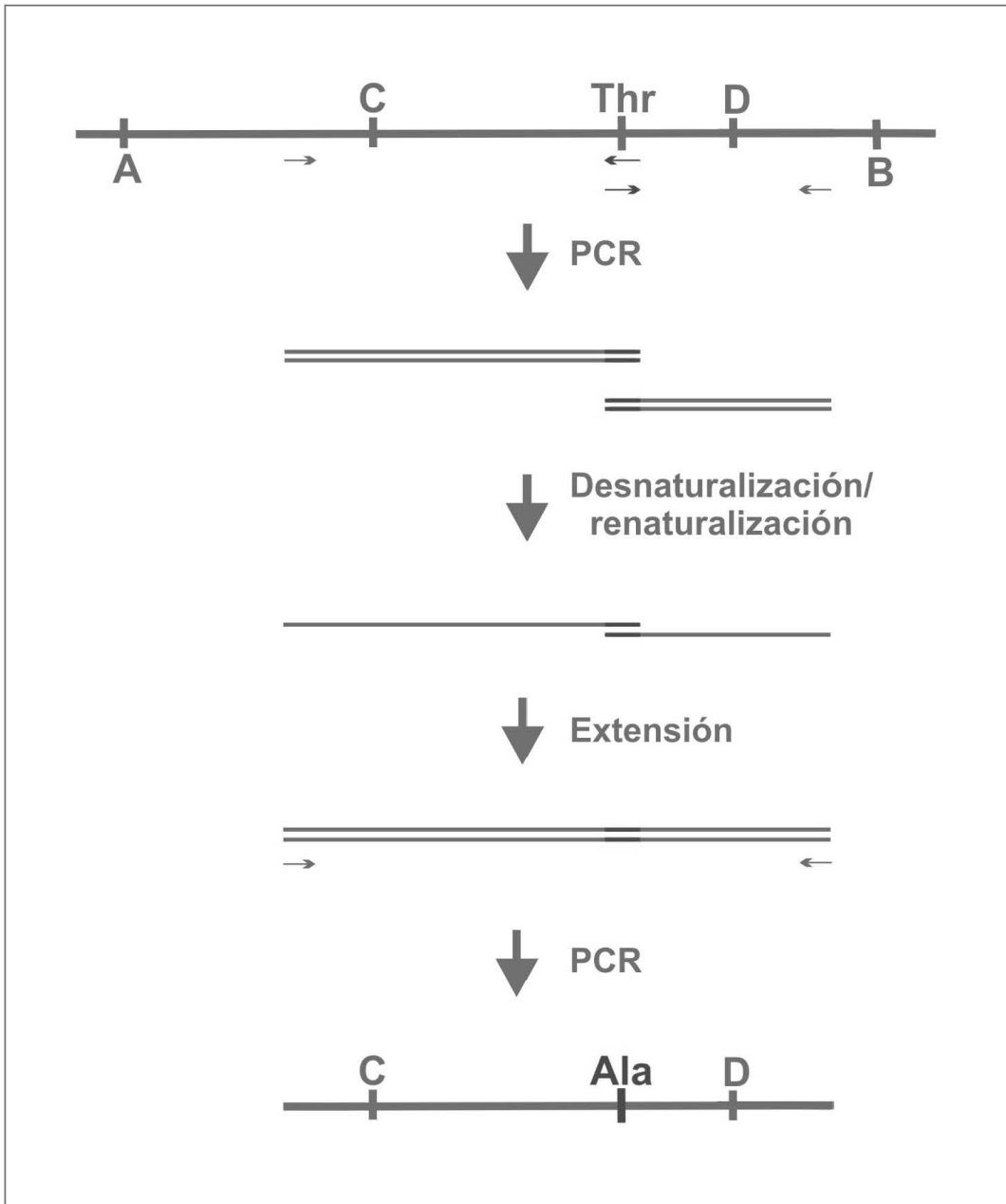


FIG. 6



ES 2 409 779 A1

SEQUENCE LISTING

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> FOSFORILACION EN LOS RESIDUOS THR-248 Y/O THR-250 DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION E2F4 COMO DIANA TERAPEUTICA EN PROCESOS PATOLOGICOS QUE CURSAN POR POLIPLOIDIA SOMATICA

<130> 5110257 JOSE MARIA FRADE

<160> 10

<170> BISSAP 1.0

<210> 1

<211> 413

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..413

<223> /mol_type="protein"
/note="Secuencia aminoacidica del factor de transcripcion E2F4 humano"
/organism="Homo sapiens"

<400> 1

```

Met Ala Glu Ala Gly Pro Gln Ala Pro Pro Pro Pro Gly Thr Pro Ser
1      5      10      15
Arg His Glu Lys Ser Leu Gly Leu Leu Thr Thr Lys Phe Val Ser Leu
20     25     30
Leu Gln Glu Ala Lys Asp Gly Val Leu Asp Leu Lys Leu Ala Ala Asp
35     40     45
Thr Leu Ala Val Arg Gln Lys Arg Arg Ile Tyr Asp Ile Thr Asn Val
50     55     60
Leu Glu Gly Ile Gly Leu Ile Glu Lys Lys Ser Lys Asn Ser Ile Gln
65     70     75
Trp Lys Gly Val Gly Pro Gly Cys Asn Thr Arg Glu Ile Ala Asp Lys
85     90     95
Leu Ile Glu Leu Lys Ala Glu Ile Glu Glu Leu Gln Gln Arg Glu Gln
100    105   110
Glu Leu Asp Gln His Lys Val Trp Val Gln Gln Ser Ile Arg Asn Val
115   120   125
Thr Glu Asp Val Gln Asn Ser Cys Leu Ala Tyr Val Thr His Glu Asp
130   135   140
Ile Cys Arg Cys Phe Ala Gly Asp Thr Leu Leu Ala Ile Arg Ala Pro
145   150   155   160
Ser Gly Thr Ser Leu Glu Val Pro Ile Pro Glu Gly Leu Asn Gly Gln
165   170   175
Lys Lys Tyr Gln Ile His Leu Lys Ser Val Ser Gly Pro Ile Glu Val
180   185   190
Leu Leu Val Asn Lys Glu Ala Trp Ser Ser Pro Pro Val Ala Val Pro
195   200   205
Val Pro Pro Pro Glu Asp Leu Leu Gln Ser Pro Ser Ala Val Ser Thr
210   215   220
Pro Pro Pro Leu Pro Lys Pro Ala Leu Ala Gln Ser Gln Glu Ala Ser
225   230   235   240
Arg Pro Asn Ser Pro Gln Leu Thr Pro Thr Ala Val Pro Gly Ser Ala
245   250   255
Glu Val Gln Gly Thr Met Ala Gly Pro Ala Ala Glu Ile Thr Val Ser Gly
260   265   270
Gly Pro Gly Thr Asp Ser Lys Asp Ser Gly Glu Leu Ser Ser Leu Pro
275   280   285
Leu Gly Pro Thr Thr Leu Asp Thr Arg Pro Leu Gln Ser Ser Ala Leu
290   295   300
Leu Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asn
305   310   315   320
Ser Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asn Pro Ser Thr Ser Phe Glu
325   330   335

```


ES 2 409 779 A1

Pro Ile Lys Ala Asp Pro Thr Gly Val Leu Glu Leu Pro Lys Glu Leu
 340 345 350
 Ser Glu Ile Phe Asp Pro Thr Arg Glu Cys Met Ser Ser Glu Leu Leu
 355 360 365
 Glu Glu Leu Met Ser Ser Glu Val Phe Ala Pro Leu Leu Arg Leu Ser
 370 375 380
 Pro Pro Pro Gly Asp His Asp Tyr Ile Tyr Asn Leu Asp Glu Ser Glu
 385 390 395 400
 Gly Val Cys Asp Leu Phe Asp Val Pro Val Leu Asn Leu
 405 410

<210> 2
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..410
 <223> /mol_type="protein"
 /note="Secuencia aminoacidica del factor de transcripcion E2F4 de
 1 raton "
 /organism="Mus musculus"

<400> 2
 Met Ala Glu Ala Gly Pro Gln Ala Pro Pro Pro Gly Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Arg His Glu Lys Ser Leu Gly Leu Leu Thr Thr Lys Phe Val Ser Leu
 20 25 30
 Leu Gln Glu Ala Lys Asp Gly Val Leu Asp Leu Lys Leu Ala Ala Asp
 35 40 45
 Thr Leu Ala Val Arg Gln Lys Arg Arg Ile Tyr Asp Ile Thr Asn Val
 50 55 60
 Leu Glu Gly Ile Gly Leu Ile Glu Lys Lys Ser Lys Asn Ser Ile Gln
 65 70 75 80
 Trp Lys Gly Val Gly Pro Gly Cys Asn Thr Arg Glu Ile Ala Asp Lys
 85 90 95
 Leu Ile Glu Leu Lys Ala Glu Ile Glu Glu Leu Gln Gln Arg Glu Gln
 100 105 110
 Glu Leu Asp Gln His Lys Val Trp Val Gln Gln Ser Ile Arg Asn Val
 115 120 125
 Thr Glu Asp Val Gln Asn Ser Cys Leu Ala Tyr Val Thr His Glu Asp
 130 135 140
 Ile Cys Arg Cys Phe Ala Gly Asp Thr Leu Leu Ala Ile Arg Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Gly Thr Ser Leu Glu Val Pro Ile Pro Glu Gly Leu Asn Gly Gln
 165 170 175
 Lys Lys Tyr Gln Ile His Leu Lys Ser Met Ser Gly Pro Ile Glu Val
 180 185 190
 Leu Leu Val Asn Lys Glu Ala Trp Ser Ser Pro Pro Val Ala Val Pro
 195 200 205
 Val Pro Pro Pro Asp Asp Leu Leu Gln Ser Pro Pro Ala Val Ser Thr
 210 215 220
 Pro Pro Pro Leu Pro Lys Pro Ala Leu Ala Gln Pro Gln Glu Ser Ser
 225 230 235 240
 Pro Pro Ser Ser Pro Gln Leu Thr Thr Pro Thr Pro Val Leu Gly Ser
 245 250 255
 Thr Gln Val Ser Glu Val Ala Cys Gln Thr Ser Glu Ile Ala Val Ser
 260 265 270
 Gly Ser Pro Gly Thr Glu Asn Lys Asp Ser Gly Glu Val Ser Ser Leu
 275 280 285
 Pro Leu Gly Leu Thr Ala Leu Asp Thr Arg Pro Leu Gln Ser Ser Ala
 290 295 300
 Leu Leu Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 305 310 315 320
 Ser Ser Ser Ser Gly Pro Asn Pro Ser Thr Ser Phe Glu Pro Ile Lys
 325 330 335
 Ala Asp Pro Thr Gly Val Leu Asp Leu Pro Lys Glu Leu Ser Glu Ile
 340 345 350
 Phe Asp Pro Thr Arg Glu Cys Met Ser Ser Glu Leu Leu Glu Glu Leu

ES 2 409 779 A1

Met Ser 355 Ser Glu Val Phe Ala Pro Leu Leu Arg Leu Ser 365 Pro Pro Pro
 370 375 380
 Gly Asp His Asp Tyr Ile Tyr Asn Leu Asp Glu Ser Glu Gly Val Cys
 385 390 395 400
 Asp Leu Phe Asp Val Pro Val Leu Lys Leu
 405 410

<210> 3
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..414
 <223> /mol_type="protein"
 /note="Secuencia aminoacidica del factor de transcripcion E2F4 de
 1 pollo"
 /organism="Gallus gallus"

<400> 3
 Met Ala Glu Cys Gly Pro Gln Pro Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly Ala Pro Ser Arg His
 20 25 30
 Glu Lys Ser Leu Gly Leu Leu Thr Thr Lys Phe Val Ser Leu Leu Gln
 35 40 45
 Glu Ala Lys Asp Gly Val Leu Asp Leu Lys Leu Ala Ala Asp Thr Leu
 50 55 60
 Ala Val Arg Gln Lys Arg Arg Ile Tyr Asp Ile Thr Asn Val Leu Glu
 65 70 75 80
 Gly Ile Gly Leu Ile Glu Lys Lys Ser Lys Asn Ser Ile Gln Trp Lys
 85 90 95
 Gly Val Gly Pro Gly Cys Asn Thr Arg Glu Ile Ala His Lys Leu Ile
 100 105 110
 Glu Leu Lys Ala Asp Ile Glu Asp Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu
 115 120 125
 Glu Lys Gln Lys Met Trp Val Gln Gln Ser Ile Lys Asn Val Thr Glu
 130 135 140
 Asp Val Gln Asn Asn Trp Leu Ala Tyr Val Thr His Glu Asp Ile Cys
 145 150 155 160
 Lys Cys Phe Thr Gly Asp Thr Leu Leu Ala Ile Arg Ala Pro Ser Gly
 165 170 175
 Thr Arg Leu Glu Val Pro Ile Pro Glu Gly Pro Ser Arg Gln Lys Lys
 180 185 190
 Tyr Gln Ile His Leu Lys Ser Thr Ser Gly Pro Ile Asp Val Leu Leu
 195 200 205
 Val Asn Lys Asp Ala Trp Ser Ser Pro Pro Val Val Leu Pro Val Pro
 210 215 220
 Pro Pro Glu Asp Leu Ile Gln Cys Gln Ala Val Ala Pro Ser Lys Pro
 225 230 235 240
 Gln Ile Pro Pro Leu Ala His Phe Gln Glu Ala Ser Val Pro Ser Ser
 245 250 255
 Thr Gln Pro Ser Thr Pro Thr Pro Ser Ser Thr Gln Asp His Ser Pro
 260 265 270
 Pro Glu Gln Lys Asp Thr Ser Thr Glu Cys Ser Ile Ser Val Val Glu
 275 280 285
 Ser Lys Ser Ser Ser Ser Asp Leu Asp Pro Leu Ser Asn Val Ser Ala
 290 295 300
 Pro Ser Gly His Thr Ala Arg Leu Asp Thr Gln Leu Leu Gln Ser Ser
 305 310 315 320
 Ala Ser Leu Asp Ser Ser Ser Val Leu Pro Ser Pro Ser Ala Ser Phe
 325 330 335
 Glu Pro Ile Lys Pro Asp Pro Ala Gly Met Leu Glu Leu Pro Lys Glu
 340 345 350
 Leu Ser Glu Met Phe Asp Pro Thr Arg Glu Cys Met Asn Ser Glu Leu
 355 360 365
 Leu Glu Glu Leu Met Ser Ser Glu Val Phe Ala Pro Leu Leu Arg Leu
 370 375 380

ES 2 409 779 A1

Ser Pro Pro Pro Gly Asp His Asp Tyr Ile Tyr Asn Leu Asp Glu Ser
 385 390 395 400
 Glu Gly Val Cys Asp Leu Phe Asp Val Pro Val Leu Asn Leu
 405 410

<210> 4
 <211> 1242
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> 1..1242
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Secuencia codificante de E2F4 humano"
 /organism="Homo sapiens"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 731..754
 <223> /note="Region empleada usada para construir los oligos para la mu
 tagenesis "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 742..744
 <223> /note="Codon ACT codificante de la Thr248"

<400> 4
 atggcggagg ccgggccaca ggcgccgccg cccccgggca ctccaagccg gcacgaaaag 60
 agcctgggac tgctcaccac caagtctgtg tcccttctgc aggaggccaa ggacggcgtg 120
 cttgacctca agctggcagc tgacacccta gctgtacgcc agaagcggcg gatttacgac 180
 attaccaatg ttttgaagg tatcgggcta atcgagaaaa agtccaagaa cagcatccag 240
 tgaaggggtg tggggcctgg ctgcaatacc cgggagattg ctgacaaact gattgagctc 300
 aaggcagaga tcgaggagct gcagcagcgg gagcaagaac tagaccagca caaggtgtgg 360
 gtgcagcaga gcatccggaa cgtcacagag gacgtgcaga acagctgttt ggcctacgtc 420
 actcatgagg acatctgcag atgctttgct ggagataccc tcttggccat ccgggccccca 480
 tcaggcacca gcctggaggt gcccatcca gagggctctca atgggcagaa gaagtaccag 540
 attcacctga agagtgtgag tgggtccatt gaggttctgc tgggtgaacaa ggaggcatgg 600
 agctcacccc ctgtggctgt gcctgtgcca ccacctgaag atttgctcca gagcccatct 660
 gctgtttcta cacctccacc tctgcccagg cctgcccag cccagtcca ggaagcctca 720
 cgtccaaata gtccctcagct cactcccact gctgtccctg gcagtgacaga agtccagggg 780
 atggctggcc cagcagctga gatcacagt agtggcggcc ctgggactga tagcaaggac 840
 agtgggtgagc tcagttcact cccactgggc ccaacaacac tggacacccg gccactgcag 900
 tcttctgccc tgctggacag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcaac 960
 agtaacagca gcagttcgtc cggaccaaac ctttctacct cctttgagcc catcaaggca 1020
 gacccacag gtgttttggg actccccaaa gagctgtcag aaatctttga tcccacacga 1080
 gagtgcacga gctcggagct gctggaggag ttgatgtcct cagaagtgtt tgcccctctg 1140
 cttcgtcttt ctccacccc gggagaccac gattatatct acaacctgga cgagagtgaa 1200
 ggtgtctgtg acctctttga tgtgcctgtt ctcaacctct ga 1242

ES 2 409 779 A1

```

<210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..31
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Correspondiente a los nucleotidos en posicion 64-83 de la
      secuencia codificante de E2F4 humana"
      /organism="artificial sequences"

<220>
<221> misc_feature
<222> 5..11
<223> /note="diana de restriccion de EcoRV"

<400> 5
caacagatat catggcggag gccgggccac a                               31

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..31
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Correspondiente a los nucleotidos en posicion 1319-1338 de
      la "
      /organism="artificial sequences"

<220>
<221> misc_feature
<222> 3..11
<223> /note="diana de restriccion de PacI"

<400> 6
ccattaatta aggtcccag ccacacaggg c                               31

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Oligonucleotido 5'mutado posicion 735-754"
      /organism="artificial sequences"

<220>
<221> misc_feature
<222> 8
<223> /note="mutacion para incluir codon especifico de Ala respecto a l
a secuencia de E2F4 humano posicion 742-744"

<400> 7
tcagctcgct cccactgctg                                           20

<210> 8
<211> 20

```

ES 2 409 779 A1

```

<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Oligonucleotido 3'mutado posicion 732-751"
      /organism="artificial sequences"

<220>
<221> misc_feature
<222> 10
<223> /note="mutacion para incluir codon especifico de Ala respecto a l
      a secuencia de E2F4 humano posicion 742-744"

<400> 8
cagtgggagc gagctgagga                                     20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Oligonucleotido 5' no mutado posicion 352-371"
      /organism="artificial sequences"

<400> 9
aaggtgtggg tgcagcagag                                     20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Oligonucleotido 3' no mutado posicion 1005-1025"
      /organism="artificial sequences"

<400> 10
ggtctgcctt gatgggctca                                     20

```