(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 514 140**

(21) Número de solicitud: 201330436

(51) Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

26.03.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

27.10.2014

Fecha de la concesión:

27.07.2015

(45) Fecha de publicación de la concesión:

03.08.2015

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070230

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (100.0%)
CTRA. DE UTRERA, KM. 1, EDIFICIO FRANCISCO DE MIRANDA Nº 9
41013 SEVILLA (Sevilla) ES

(72) Inventor/es:

MUÑOZ RUIZ, Manuel Jesús y
PÉREZ JIMÉNEZ, María Mercedes

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **Uso del inhibidor de sulfatasas esteroideas STX64 para el tratamiento del envejecimiento**

(57) Resumen:

Uso del inhibidor de sulfatasas esteroideas STX64 para el tratamiento del envejecimiento.

La presente invención se refiere al uso del inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea STX64 para el tratamiento del envejecimiento y, por tanto, para incrementar la longevidad de los individuos o mejorar la calidad de vida de éstos. También se refiere a una composición cosmética que comprenda dicho inhibidor con ese fin.

ES 2 514 140 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

USO DEL INHIBIDOR DE SULFATASAS ESTEROIDEAS STX64 PARA EL TRATAMIENTO DEL ENVEJECIMIENTO

DESCRIPCIÓN

La presente invención se encuadra en el campo de la medicina, veterinaria y la cosmética, específicamente dentro de los compuestos y composiciones útiles para tratar o retrasar los efectos indeseables asociados al envejecimiento e incrementar la longevidad de personas o animales.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El envejecimiento es un problema que afecta a toda la humanidad y en una sociedad con una esperanza de vida cada vez mayor la incidencia de enfermedades relacionas con el envejecimiento es creciente. Por tanto, retrasar los efectos de éste se ha convertido durante muchos años en un objetivo muy interesante para la industria farmacéutica.

Actualmente, existe un creciente interés en la búsqueda de compuestos que retrasen el envejecimiento y algunos de los compuestos más prometedores son el resveratrol, los extractos de bayas o el tirosol.

Numerosos estudios en organismos modelo han mostrado que el resveratrol, una fitoalexina presente en una gran variedad de alimentos, como las uvas y sus derivados, tiene efectos beneficiosos contra enfermedades como la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Por sus propiedades antioxidantes se ha propuesto como compuesto contra el envejecimiento. Sin embargo, en humanos los ensayos con este compuesto no han conseguido mostrar el efecto antienvejecimiento esperado (Chung *et al.*, 2012, *Trends Cell Biol.*, 22(10):546-554).

Existe un interés creciente por los beneficios nutricionales de frutas y verduras y su papel en la prevención de enfermedades degenerativas, en especial los constituyentes de algunas bayas como los arándanos, los cuales están ya siendo distribuidos como

suplementos alimenticios en zumos concentrados y extractos (Krenn *et al.*, 2007, Pharmazie, 62(11):803-812).

El tirosol es un compuesto fenólico presente en vinos, blancos y tintos, el aceite de oliva virgen, el vermut y la cerveza. Su actividad antioxidante se ha demostrado *in vitro*, en humanos y en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (Cañuelo *et al.*, 2012, *Mech Ageing Dev.*, 133(8):563-74).

Por otro lado, la sulfatasa esteroidea (STS) regula la formación de estrona y dehidroepiandrosterona (DHEA), capaces de promover el crecimiento tumoral, mediante la desulfatación de sus correspondientes conjugados sulfatados. El uso de inhibidores de sulfatasas esteroideas es un procedimiento en auge por su potencial efecto terapéutico como droga antitumoral para diversos tipos de cáncer dependientes de hormonas, como el de mama, próstata, útero, endometrio o tiroides (EP1568381A1). El inhibidor irreversible de sulfatasas esteroideas conocido con los nombres 667 COUMATE, STX 64, BN83495 o Irosustat ha sido el primer compuesto de este tipo que pasó a la fase de ensayos clínicos como terapia para cánceres dependientes de hormonas esteroideas (Purohit & Foster, 2012, *J Endocrinol.*, 212(2):99-110).

Además, distintos inhibidores de sulfatasas esteroideas también están en el punto de mira por su posible efecto terapéutico en el tratamiento de la endometriosis, la infertilidad, enfermedades autoinmunes, demencia o enfermedad de Alzheimer (EP1193250A1). También se han propuesto para controlar las respuestas inmunológica e inflamatoria (EP0758230B1).

Por tanto, en la actualidad no existe ningún compuesto para el tratamiento efectivo del envejecimiento. Como consecuencia, es necesaria la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos con relevancia clínica o cosmética que permitan desarrollar compuestos que puedan usarse para el tratamiento de los efectos adversos asociados al envejecimiento y así retrasar el mismo.

DESCRIPCION DE LA INVENCIÓN

La presente invención propone el uso de inhibidores de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea (STS) para el tratamiento del envejecimiento. Los ejemplos mostrados más adelante demuestran que la inhibición, total o parcial, de la actividad de esta enzima supone un retraso en el envejecimiento y, por tanto, un incremento significativo en la longevidad de los individuos tratados en comparación con los sujetos control.

Ante la falta de estrategias terapéuticas o cosméticas efectivas para el tratamiento farmacológico del envejecimiento y de sus efectos asociados, la presente invención proporciona una solución al problema de tratar el envejecimiento mediante el uso de inhibidores de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea.

Por ello, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de al menos un inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea para el tratamiento del envejecimiento o efectos asociados en humanos y/o animales, o alternativamente, al uso de al menos un inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea para la elaboración de una composición para el tratamiento del envejecimiento o efectos asociados en humanos y/o animales. En adelante, para referirnos al uso descrito en este párrafo se empleará el término “uso de la presente invención” o “uso de la invención”.

La “enzima sulfatasa esteroidea”, “STS”, “esteril-sulfatasa”, “arilsulfatasa”, “ASC” o “esteril-sulfatasa sulfohidrolasa” es la enzima microsomal que escinde grupos sulfato de las formas inactivas (sulfatadas) de varias hormonas esteroideas. Esta desulfatación de esteroides juega un papel importante en varios procesos fisiológicos tales como la maduración de células epidérmicas, la gestación y la respuesta inmune. Esta enzima se encuentra presente en una diversidad de organismos como por ejemplo en *Homo sapiens, Pongo abelii, Nomascus leucogenys, Pan troglodytes, Macaca mulatta, Macaca fascicularis, Callithrix jacchus, C. elegans, Loxodonta africana, Ailuropoda melanoleuca, Canis lupus familiaris, Equus caballus, Felis catus, Cavia porcellus*, etc. En una realización preferida, la enzima sulfatasa esteroidea a la que se refiere la presente invención es la enzima de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3, o enzima Sul-2 de *C. elegans,* la cual está codificada por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, la enzima sulfatasa

esteroidea a la que se refiere la presente invención es la enzima de humano EC 3.1.6.2, de 583 aminoácidos y SEQ ID NO: 1.

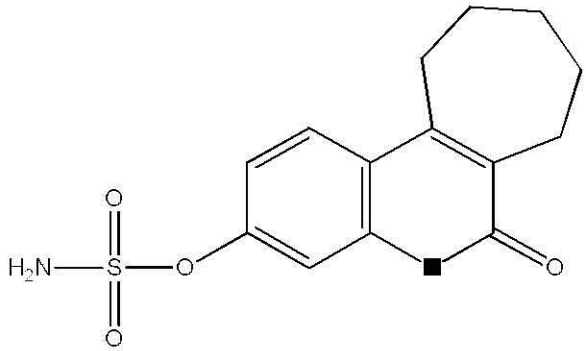
En la presente invención se demuestra de forma clara y no ambigua que mediante la inhibición específica de la actividad de la enzima STS se consigue aumentar la esperanza de vida de individuos a los que se les han administrado inhibidores de dicha actividad. En los ejemplos de la presente invención se demuestra, por tanto, que los antagonistas químicos específicos para la enzima STS, así como mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica para la enzima, solucionan el problema técnico de la presente invención, suponiendo estos ejemplos una demostración clara de que inhibidores de muy diferente naturaleza tienen el mismo efecto técnico, por tanto la presente invención no debe limitarse al uso de los inhibidores concretos ensayados, sino que debe referirse a otros inhibidores conocidos para inhibir parcial o totalmente la actividad de la enzima en la fecha de presentación de la presente invención. En definitiva, la presente invención aporta al estado de la técnica que la inhibición de dicha actividad enzimática, mediante cualquier medio o producto, es útil en el tratamiento del envejecimiento.

El término “inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una molécula que se une a cualquiera de los siguientes elementos: gen que codifica para la enzima sulfatasa esteroidea, factores de transcripción de dicho gen, cualquiera de los productos de expresión de dicho gen, por ejemplo, aunque sin limitarnos, al RNA mensajero o a la enzima sulfatasa esteroidea, y disminuye o inhibe la expresión y actividad de la molécula a la que se une, y/o su señalización intracelular, conduciendo así a una inhibición total o parcial de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea. En otra realización preferida, dicho inhibidor se selecciona de la lista que consiste, pero sin que sirva de limitación, en: antagonistas de la enzima sulfatasa esteroidea (preferiblemente químicos), ARN de silenciamiento o anticuerpo específico frente a la enzima sulfatasa esteroidea (preferiblemente el anticuerpo es monoclonal), en la presente invención este anticuerpo puede denominarse anticuerpo neutralizante del efecto de la enzima sulfatasa esteroidea. Ejemplos de inhibidores químicos de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea son, aunque sin limitarnos, los sustratos alternativos como los de la serie 2-(hidroxifenil) indol sulfato, los esteroides sintéticos o naturales con actividad

inhibitoria del STS como el 5-androsteno-3β, 17β-diol-3 sulfato, los inhibidores competitivos como E_1-MTP o EMATE, los inhibidores no estrogénicos como COUMATE o STX64, u otros como KW-2581 o STX213, cuyas IC50 sobre la enzima STS ha sido determinada en distintos trabajos (Purohit & Foster, 2012, *J Endocrinol.*, 212(2):99-110). Por ello, en una realización preferida, el inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea se selecciona de la lista que consiste en: 2-(hidroxifenil) indol sulfato, 5-androsteno-3β, 17β-diol-3 sulfato, E_1-MTP, EMATE, COUMATE o STX64, KW-2581 y STX213, morfolino, ARN de silenciamiento y anticuerpo específico frente a la enzima sulfatasa esteroidea.

En una realización más preferida, el inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea al que se refiere la presente invención es STX 64.

El inhibidor "STX 64" o "667 COUMATE", "BN83495" o "Irosustat" es el compuesto de número CAS 288628-05-7, fórmula $C_{14}H_{15}NO_5S$ y fórmula (I):



(I)

Los inhibidores de la presente invención, puede existir en forma de enantiómeros o diastereómeros. En la presente invención también se contempla el uso de solvatos del antagonista (como por ejemplo, pero sin limitarse, hidratos), prodrogas (sinónimo de profármacos), o clatratos. Las sales farmacéuticamente aceptables se seleccionan de entre cloruro, bromuro ioduro o cualquier otra sal farmacéuticamente aceptable.

Los antagonistas de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea de la presente invención, pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros

individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

En la presente invención, el término "sales farmacéuticamente aceptables" de los compuestos antagonistas, se refiere a sales preparadas de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos orgánicos o inorgánicos. Los ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos se seleccionan de la lista que comprende, pero sin limitarse: acético, algínico, antranílico, bencenosulfónico, benzoico, camforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fórmico, fumárico, furoico, glucónico, glutámico, glucorénico, galacturónico, glicídico, hidrobrómico, hidroclórico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanesulfónico, múcico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, propiónico, fosfórico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico o p-toluenosulfónico.

Los inhibidores a los que se refiere la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente y farmacológicamente aceptables, es decir, solvatos del antagonista de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea, que pueden ser utilizados en la elaboración de una composición, preferiblemente de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente y farmacológicamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran las prodrogas o profármacos de los antagonistas de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea. El término “profármaco” o “prodroga” tal como aquí se utiliza incluye cualquier compuesto derivado del antagonista, por ejemplo y no de forma limitativa: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, fosfatos

biohidrolizables. Otros ejemplos de prodrogas incluyen compuestos que comprenden grupos -NO, $-NO_2$, -ONO, o $-ONO_2$- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho antagonista en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del antagonista cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del antagonista en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica, siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el antagonista de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea en un compartimento biológico del mismo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los términos "amidas biohidrolizables", "ésteres biohidrolizables", "carbamatos biohidrolizables", "ureidos biohidrolizables", "fosfatos biohidrolizables", se refieren a carbamato, carbonato, ureido y fosfato, respectivamente, de un compuesto que: 1) no interfiera con la actividad biológica del complejo pero que confiere al compuesto propiedades ventajosas *in vivo*, como absorción, duración del efecto, o del inicio del efecto; o 2) es biológicamente inactivo, pero se convierte in vivo a compuesto biológicamente activo.

Otros inhibidores a los que se refiere la invención son aquellos que impidan o inhiban la producción de la enzima sulfatasa esteroidea afectando, la expresión, o/y la traducción o/y la estabilidad del ARN, como morfolinos o ARN antisentidos o de silenciamento. En cuanto a los ARN de silenciamiento, para mejorar su función se pueden añadir los nucleótidos (tt) o (tg) en el extremo 3´ de la cadena sentido o en el extremo 5´ de la cadena antisentido del siRNA que actúa como inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea. De esta forma estos nucleótidos son salientes, no hibridando con ningún otro nucleótido de la cadena complementaria. La adición de estos nucleótidos en los extremos 3´ o 5´ no afecta al reconocimiento del ARN mensajero correspondiente.

El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos adversos causados como consecuencia del envejecimiento en un sujeto (animal, y preferiblemente humano) que incluye:

(i) retrasar el desarrollo del envejecimiento; y/o

(ii) aliviar los efectos asociados al envejecimiento;

El término “envejecimiento” o “senescencia” se refiere al conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos, preferiblemente sobre el humano, que supone una disminución de la capacidad de adaptación de cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, así como de la capacidad de respuesta a los estímulos y agentes externos que indicen en el individuo. Los principales síntomas o efectos asociados al envejecimiento son, aunque sin limitarnos, pérdida progresiva de capacidad visual, como presbicia, miopía, cataratas, etc., hipoacusia progresiva, pérdida de elasticidad muscular, alteración del sueño, pérdida de la agilidad y capacidad de reacción refleja, degeneración de estructuras óseas, lo que generalmente lleva asociada la aparición de deformaciones debidas a acromegalias, osteoporosis, artritis reumatoides, etc., demencia senil, como por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, distensión de los tejidos de sostén muscular, pérdida progresiva de la fuerza muscular, aumento de la hipertensión arterial, alteración de la próstata, pérdida de la capacidad inmunitaria frente a agentes infecciosos, disminución del colágeno de la piel y de la capacidad de absorción de proteínas, pérdida progresiva del sentido del gusto y pérdida progresiva de la líbido, disminución de la espermatogénesis en el hombre y menopausia en la mujer. Los inhibidores de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea propuestos en la presente invención son de utilidad para mitigar y/o retrasar estos efectos asociados al envejecimiento.

El término “composición” se refiere a cualquier preparación cosmética o medicamentosa. La composición a la que se refiere la presente invención puede comprender uno o varios inhibidores de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea, preferiblemente de los descritos en la presente invención, en cualquiera de sus mezclas.

En otra realización preferida, la composición a la que se refiere la presente invención es una composición cosmética.

En otra realización preferida, la composición a la que se refiere la presente invención es un medicamento. El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o

combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento del envejecimiento o de los efectos asociados al mismo en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento del envejecimiento o de los efectos asociados al mismo en animales no humanos o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. También se considerarán "medicamentos veterinarios" las "premezclas para piensos medicamentosos" elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

En una realización más preferida, la composición a la que se refiere la presente invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo. Dicha composición puede comprender además un excipiente.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición a la que se refiere la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como aquella materia que, incluida en las "formas galénicas", se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición y su biodisponibilidad.

La “forma galénica o forma farmacéutica” es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

El “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “portador”, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes de la misma hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la compoisición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, el excipiente y el vehículo deben estar permitidos y evaluados de modo que no causen daño a los organismos a los que se les administra.

Por otra parte, la composición descrita puede comprender además opcionalmente otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, donde dicha composición puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de al menos un inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea y otro agente terapéutico. El término “principio activo” es toda materia, cualquiera que sea su origen, humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento. En una realización más preferida, el otro principio activo incluido en la composición es un compuesto para el tratamiento del envejecimiento. Ejemplos de compuestos para el tratamiento del envejecimiento son, aunque sin limitarnos, los polifenoles, tales como el resveratrol, o en general cualquier compuesto con propiedades antioxidantes.

Preferiblemente, la composición de la invención comprende un inhibidor de la sulfatasa esteroidea, en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad

terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de dicho inhibidor, que produzca el efecto deseado sin causar efectos adversos. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición farmacéutica de la invención.

La composición de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición farmacéutica de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardíaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía vaginal o vía rectal, mediante la administración de un supositorio, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

En cada caso la forma de presentación de la composición se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición a la que se refiere la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. La composición se puede presentar en una forma adaptada a, por ejemplo aunque sin limitarnos, la administración oral, sublingual,

nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, vaginal, transdérmica, inhalada, tópica o parenteral. Preferiblemente, la composición está formulada para su administración oral, tópica o parenteral. Por otra parte, el inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea puede ir asociado, por ejemplo, pero sin limitarse, a liposomas o micelas.

Otro aspecto de la invención, se refiere a una composición cosmética que comprende un inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea seleccionado de la lista que consiste en: 2-(hidroxifenil) indol sulfato, 5-androsteno-3β, 17β-diol-3 sulfato, E_1-MTP, EMATE, COUMATE o STX64, KW-2581, STX213, morfolino, ARN de silenciamiento, y anticuerpo específico frente a la enzima sulfatasa esteroidea.

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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Representa la curva de longevidad a 25ºC. En la gráfica se observa la vida media de una población de *C. elegans* silvestre y de una población mutante sul-2(gk187), que muestra una diferencia significativa con $p<0,0001$, $n>100$.

Fig. 2. Representa la curva de longevidad a 25ºC. En la gráfica se observa la vida media de una población de *C. elegans* mutante *sul-2(pv17)* y de una población de *C. elegans* silvestre, que muestra una diferencia significativa con $p<0,0001$, $n>100$.

Fig. 3. Representa las curvas de longevidad de un silvestre suplementado con 0,5 µg/ml o 1 µg/ml de STX64 a 25ºC. La población en presencia del inhibidor de sulfatasas esteroideas STX64 es significativamente más longeva en ambos casos que la población control expuesta al disolvente del inhibidor (DMSO), $p=0,0139$, $n>100$.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que demuestran la eficacia del uso de inhibidores de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea para el tratamiento y/o prevención del envejecimiento y, por tanto, para el incremento en la longevidad de los individuos tratados. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante muestran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1. La reducción de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea retrasa el envejecimiento.

En el organismo modelo *C. elegans* se observó, como se verá en este ejemplo, que la reducción de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea mediante mutación genética retrasaba el envejecimiento.

Para la realización de las curvas de longevidad, las cepas de estudio y sus controles pertinentes fueron en primera instancia sometidos a una preparación de huevos con objeto de evitar contaminaciones y sincronizar en estadio embrión, e incubados a 16ºC. Para evitar interferencias por estreses fisiológicos por este proceso, se dejaron crecer hasta la siguiente generación. Entonces se transfirieron 5 ó 6 L4 por placa en 4 placas, que se volvieron a incubar a 16ºC hasta L4, estadio seleccionado para iniciar las curvas de longevidad.

En el día cero se transfirieron 120 L4 de cada cepa a placas nuevas, 20 gusanos por placa, y se incubaron a la temperatura a la que se realizó posteriormente el ensayo, es decir, 25 ºC.

Durante la primera semana de las curvas, los nematodos fueron cambiados de placa cada 2 días, para evitar confusiones con posibles descendientes. Posteriormente, fueron revisados cada 2 ó 3 días, eliminándose del estudio aquellos ejemplares extraviados o muertos por causas no fisiológicas. Los individuos se cambiaron de

placa cada cinco días para mantener las condiciones óptimas de crecimiento en placa. Se consideraron muertos aquellos ejemplares que dejaron de responder al ser tocados suavemente con el asa de platino.

Se estudió la longevidad en presencia del inhibidor de sulfatasa esteroidea STX64 (SIGMA, S1950-5MG) diluido en DMSO a 5μg/μl. Las placas utilizadas fueron de 35mm de diámetro con un volumen de medio NGM constante de 2ml, la adición del inhibidor se realizó un par de horas antes de poner los nematodos, con una concentración de 1μg/ml volumen final. La preparación y sincronización de los nematodos hasta el día=0 fue igual que en el caso anterior, la única diferencia fue que los nematodos fueron cambiados a placas frescas cada dos o tres días hasta el final de la curva.

Para la representación de las curvas de longevidad se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (Versión 5.0a, para Mac OS X. 1992-2008 GraphPad Software, Inc.), en el modo de curva de supervivencia y se usó el método de Kaplan-Meier para el análisis estadístico de las mismas. En las figuras de la presente invención se representa el error estándar de la media, SEM, de cada punto mediante barras de error y para comprobar si había diferencias entre las curvas se aplicó el Test Log-rank.

Se generaron en primer lugar mutantes del gen *sul-2* de *C. elegans.* La secuencia nucleotídica nativa de dicho gen es la SEQ ID NO: 2. Dicho gen codifica una proteína de SEQ ID NO: 3 homóloga a la sulfatasa esteroidea de mamíferos. Los organismos que expresaban la proteína mutante mostraron un incremento de longevidad significativo respecto al silvestre. Se comprobó que tanto la deleción del gen *sul-2(gk187)*, resultante en una proteína de SEQ ID NO: 5, como el alelo aislado *pv17,* resultante en una proteína de SEQ ID NO: 4, un mutante de reducción de función, conducían a un incremento de la longevidad (Figuras 1 y 2). Y no sólo eso, sino que además estos mutantes mantenían las funciones motrices incluso después de que gran parte de la población silvestre hubiera muerto.

Esto indicó que la inhibición de la función de las sulfatasas esteroideas, puede usarse como tratamiento antienvejecimiento. Por ello, posteriormente se realizó un ensayo en

C. elegans con el inhibidor de sulfatasas esteroideas STX 64, y se observó que el tratamiento retrasaba el envejecimiento (Figura 3).

REIVINDICACIONES

1. Uso del inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea STX64 para la elaboración de una composición para el tratamiento del envejecimiento.

2. Uso según la reivindicación 1, donde la enzima sulfatasa esteroidea es la enzima de SEQ ID NO: 1.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la composición es una composición cosmética.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la composición es un medicamento.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la composición además comprende otro principio activo.

6. Uso según la reivindicación 5, donde el otro principio activo es un compuesto para el tratamiento del envejecimiento.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición está formulada para su administración oral, tópica o parenteral.

8. Composición cosmética que comprende el inhibidor de la actividad de la enzima sulfatasa esteroidea STX64.

FIG. 1

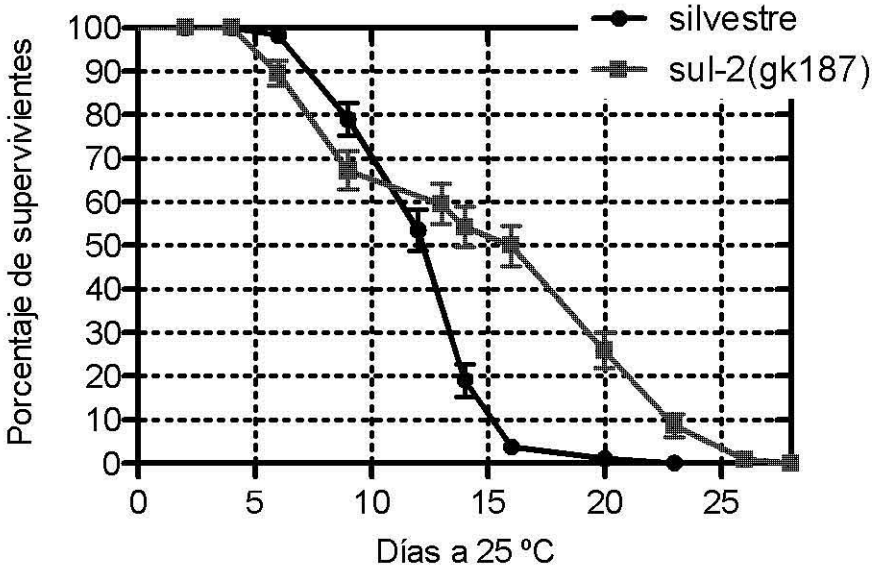

silvestre
sul-2(gk187)
Porcentaje de supervivientes
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
Días a 25 ºC

FIG. 2

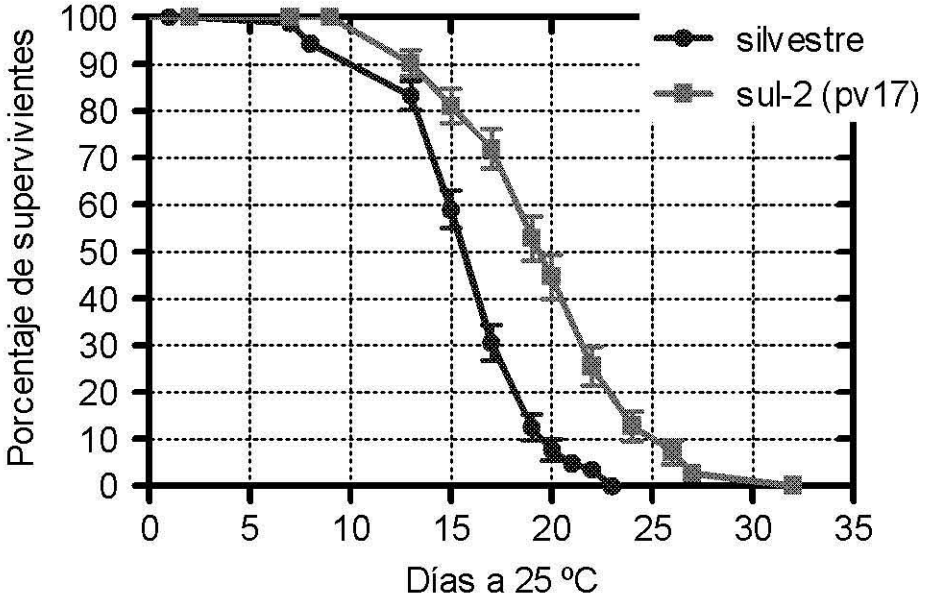
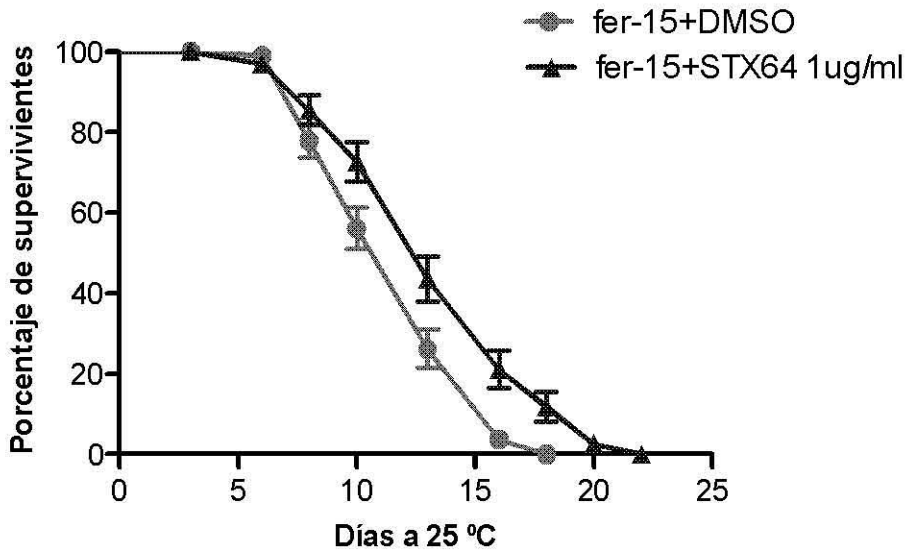
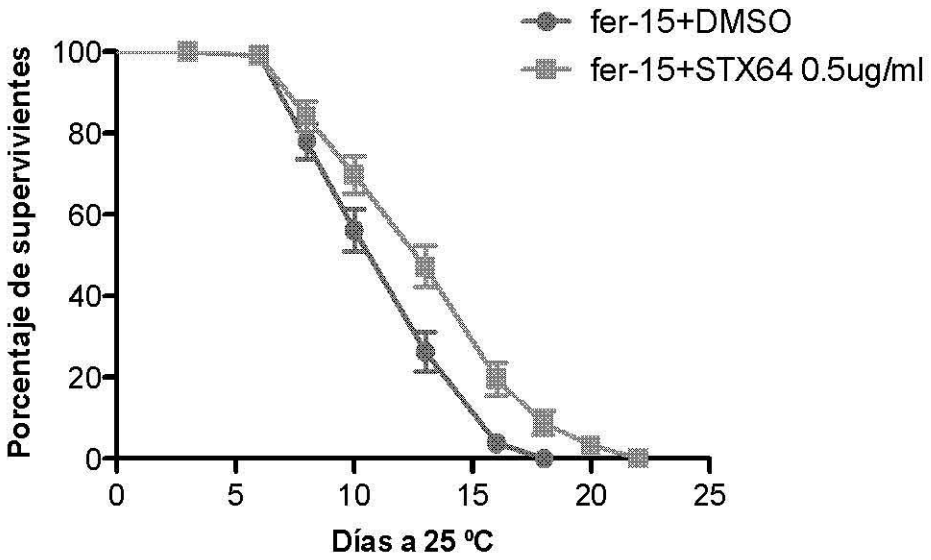

silvestre
sul-2 (pv17)
Porcentaje de supervivientes
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Días a 25 ºC

FIG. 3


fer-15+DMSO
fer-15+STX64 1ug/ml
Porcentaje de supervivientes
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
Días a 25 ºC


fer-15+DMSO
fer-15+STX64 0.5ug/ml
Porcentaje de supervivientes
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
Días a 25 ºC

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Pablo de Olavide

<120> "USO DE INHIBIDORES DE SULFATASAS ESTEROIDEAS PARA EL TRATAMIENTO DEL ENVEJECIMIENTO"

<130> ES2762.3

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 583
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Leu Arg Lys Met Lys Ile Pro Phe Leu Leu Leu Phe Phe Leu
1 5 10 15

Trp Glu Ala Glu Ser His Ala Ala Ser Arg Pro Asn Ile Ile Leu Val
20 25 30

Met Ala Asp Asp Leu Gly Ile Gly Asp Pro Gly Cys Tyr Gly Asn Lys
35 40 45

Thr Ile Arg Thr Pro Asn Ile Asp Arg Leu Ala Ser Gly Gly Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln His Leu Ala Ala Ser Pro Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala
65 70 75 80

Ala Phe Met Thr Gly Arg Tyr Pro Val Arg Ser Gly Met Ala Ser Trp
85 90 95

Ser Arg Thr Gly Val Phe Leu Phe Thr Ala Ser Ser Gly Gly Leu Pro
100 105 110

Thr Asp Glu Ile Thr Phe Ala Lys Leu Leu Lys Asp Gln Gly Tyr Ser
115 120 125

Thr Ala Leu Ile Gly Lys Trp His Leu Gly Met Ser Cys His Ser Lys
130 135 140

Thr Asp Phe Cys His His Pro Leu His His Gly Phe Asn Tyr Phe Tyr
145 150 155 160

Gly Ile Ser Leu Thr Asn Leu Arg Asp Cys Lys Pro Gly Glu Gly Ser
165 170 175

Val Phe Thr Thr Gly Phe Lys Arg Leu Val Phe Leu Pro Leu Gln Ile
180 185 190

Val Gly Val Thr Leu Leu Thr Leu Ala Ala Leu Asn Cys Leu Gly Leu
195 200 205

Leu His Val Pro Leu Gly Val Phe Phe Ser Leu Leu Phe Leu Ala Ala
210 215 220

Leu Ile Leu Thr Leu Phe Leu Gly Phe Leu His Tyr Phe Arg Pro Leu
225 230 235 240

Asn Cys Phe Met Met Arg Asn Tyr Glu Ile Ile Gln Gln Pro Met Ser
245 250 255

Tyr Asp Asn Leu Thr Gln Arg Leu Thr Val Glu Ala Ala Gln Phe Ile
260 265 270

Gln Arg Asn Thr Glu Thr Pro Phe Leu Leu Val Leu Ser Tyr Leu His
275 280 285

Val His Thr Ala Leu Phe Ser Ser Lys Asp Phe Ala Gly Lys Ser Gln
290 295 300

His Gly Val Tyr Gly Asp Ala Val Glu Glu Met Asp Trp Ser Val Gly
305 310 315 320

Gln Ile Leu Asn Leu Leu Asp Glu Leu Arg Leu Ala Asn Asp Thr Leu
325 330 335

Ile Tyr Phe Thr Ser Asp Gln Gly Ala His Val Glu Glu Val Ser Ser
340 345 350

Lys Gly Glu Ile His Gly Gly Ser Asn Gly Ile Tyr Lys Gly Gly Lys
355 360 365

Ala Asn Asn Trp Glu Gly Gly Ile Arg Val Pro Gly Ile Leu Arg Trp
370 375 380

Pro Arg Val Ile Gln Ala Gly Gln Lys Ile Asp Glu Pro Thr Ser Asn
385 390 395 400

Met Asp Ile Phe Pro Thr Val Ala Lys Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro
405 410 415

Glu Asp Arg Ile Ile Asp Gly Arg Asp Leu Met Pro Leu Leu Glu Gly
420 425 430

Lys Ser Gln Arg Ser Asp His Glu Phe Leu Phe His Tyr Cys Asn Ala
435 440 445

Tyr Leu Asn Ala Val Arg Trp His Pro Gln Asn Ser Thr Ser Ile Trp
450 455 460

Lys Ala Phe Phe Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro Val Gly Ser Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Ala Thr His Val Cys Phe Cys Phe Gly Ser Tyr Val Thr His
485 490 495

His Asp Pro Pro Leu Leu Phe Asp Ile Ser Lys Asp Pro Arg Glu Arg
500 505 510

Asn Pro Leu Thr Pro Ala Ser Glu Pro Arg Phe Tyr Glu Ile Leu Lys
515 520 525

Val Met Gln Glu Ala Ala Asp Arg His Thr Gln Thr Leu Pro Glu Val
530 535 540

Pro Asp Gln Phe Ser Trp Asn Asn Phe Leu Trp Lys Pro Trp Leu Gln
545 550 555 560

Leu Cys Cys Pro Ser Thr Gly Leu Ser Cys Gln Cys Asp Arg Glu Lys
565 570 575

Gln Asp Lys Arg Leu Ser Arg
580

<210> 2
<211> 1686
<212> DNA
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 2
atgtccccgg tgagcctatt actacttctt ctattcccat tgagcacttt tcaacaacga 60

gaagattgca cagtgcagcc accatctcca cgtcatccga acattgtgat tcttatgatt 120

gacgacttgg gttacggtga cattgcgtca tacggtcacc cgactcaaga atacacacaa 180

gtcgatcgga tggcagcaga aggcacccgg tttacacaag catattcagc agatagtatg 240

tgctcaccta gcagagctgg attcattact ggacgattac ctattcgatt aggtatagtt 300

ggaggacgga gagtttttgt tccttatgat attggaggcc ttccaaaaag tgagacaaca 360

atggctgaaa tgcttcaaga agcaggatat gcaactggca tggttggaaa atggcatctt 420

ggaattaatg aaaacaatgc aactgatggt gcacatttgc cttcaaagcg aggatttgag 480

tatgttggag tcaacttgcc gtttaccaac gtctggcagt gcgatacaac aagagaattt 540

tacgacaaag gacctgatcc atcactttgt ttcctctatg atggagatga tatcgttcaa 600

caaccaatga aatttgagca tatgacagaa aatcttgttg gagactggaa aaggtttttg 660

atgacaaggt tggcacaaga tcaacacgag agaccattct tcttctattt ctcatttcca 720

caagtccact caacacagtt tgcaagcaaa cgatttagag gatcatcggt tagaggaatc 780

tatggagact ctatcaatga gatgtcatgg gcagttggag aggttttaga cagtcttgta 840

aatgctggaa ttgctgaaaa tacattggtt attttaatgt ctgatcatgg accacatgtt 900

gaactatgtc taaatggtgg atcaacagct ggattgaaag gaggaaagtc gaatagttat 960

gagggaggat tccgaattcc tttcattgct tggcagccag ggacagtgaa accatcccga 1020

gtatcgcatg aagtcatttc cagtatggac ttgtttccaa ctttccgagg aatgcaagaa 1080

caatgcttat ttgagaaaga agcactccgt tctgacggaa ttgatatctc tgacgaattg 1140

cgtggtgaga gtgaagatgt ggaaggaagc ctcggaaagg ctcgtccgat catctactac 1200

tgtaatactc atctgatggc tattaggatg ggagactaca aagttcacta caaaacatct 1260

ccaatcttct ttaataattc agttgatcca aatcttgatt atttctgtcc aaatggaaaa 1320

ccaaagtctg attggtacgt ttcacaagtc tgtcctgatg agcatctaca aaaacattat 1380

cctccacttg ttttcgatct tattcgtgat ccatatgagc agtatccatt gcaaaatact 1440

gtaaaatcac aagagataag attccaagct atgcagcggc tgtctgaaca caaatcgtcg 1500

ctggtcaaag ttaaaaatgt gctcggaagc tacaataaaa cattgatacc ttgctgcaat 1560

ccgccaagtt gcaaatgtga caaattatca aggcccacag aatttgacga aagtcggcca 1620

gattatgttg gtctggtgcc tgatcttgaa aagaccgaat acgaacttct tcacagattc 1680

ttctaa 1686

<210> 3
<211> 561
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 3

Met Ser Pro Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Ser Thr
1 5 10 15

Phe Gln Gln Arg Glu Asp Cys Thr Val Gln Pro Pro Ser Pro Arg His
20 25 30

Pro Asn Ile Val Ile Leu Met Ile Asp Asp Leu Gly Tyr Gly Asp Ile
35 40 45

Ala Ser Tyr Gly His Pro Thr Gln Glu Tyr Thr Gln Val Asp Arg Met
50 55 60

Ala Ala Glu Gly Thr Arg Phe Thr Gln Ala Tyr Ser Ala Asp Ser Met
65 70 75 80

Cys Ser Pro Ser Arg Ala Gly Phe Ile Thr Gly Arg Leu Pro Ile Arg
85 90 95

Leu Gly Ile Val Gly Gly Arg Arg Val Phe Val Pro Tyr Asp Ile Gly
100 105 110

Gly Leu Pro Lys Ser Glu Thr Thr Met Ala Glu Met Leu Gln Glu Ala
115 120 125

Gly Tyr Ala Thr Gly Met Val Gly Lys Trp His Leu Gly Ile Asn Glu
130 135 140

Asn Asn Ala Thr Asp Gly Ala His Leu Pro Ser Lys Arg Gly Phe Glu
145 150 155 160

Tyr Val Gly Val Asn Leu Pro Phe Thr Asn Val Trp Gln Cys Asp Thr
165 170 175

Thr Arg Glu Phe Tyr Asp Lys Gly Pro Asp Pro Ser Leu Cys Phe Leu
180 185 190

Tyr Asp Gly Asp Asp Ile Val Gln Gln Pro Met Lys Phe Glu His Met
195 200 205

Thr Glu Asn Leu Val Gly Asp Trp Lys Arg Phe Leu Met Thr Arg Leu
210 215 220

Ala Gln Asp Gln His Glu Arg Pro Phe Phe Phe Tyr Phe Ser Phe Pro
225 230 235 240

Gln Val His Ser Thr Gln Phe Ala Ser Lys Arg Phe Arg Gly Ser Ser
245 250 255

Val Arg Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Ile Asn Glu Met Ser Trp Ala Val
260 265 270

Gly Glu Val Leu Asp Ser Leu Val Asn Ala Gly Ile Ala Glu Asn Thr
275 280 285

Leu Val Ile Leu Met Ser Asp His Gly Pro His Val Glu Leu Cys Leu
290 295 300

Asn Gly Gly Ser Thr Ala Gly Leu Lys Gly Gly Lys Ser Asn Ser Tyr
305 310 315 320

Glu Gly Gly Phe Arg Ile Pro Phe Ile Ala Trp Gln Pro Gly Thr Val
325 330 335

Lys Pro Ser Arg Val Ser His Glu Val Ile Ser Ser Met Asp Leu Phe
340 345 350

Pro Thr Phe Arg Gly Met Gln Glu Gln Cys Leu Phe Glu Lys Glu Ala
355 360 365

Leu Arg Ser Asp Gly Ile Asp Ile Ser Asp Glu Leu Arg Gly Glu Ser
370 375 380

Glu Asp Val Glu Gly Ser Leu Gly Lys Ala Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr
385 390 395 400

Cys Asn Thr His Leu Met Ala Ile Arg Met Gly Asp Tyr Lys Val His
405 410 415

Tyr Lys Thr Ser Pro Ile Phe Phe Asn Asn Ser Val Asp Pro Asn Leu
420 425 430

Asp Tyr Phe Cys Pro Asn Gly Lys Pro Lys Ser Asp Trp Tyr Val Ser
435 440 445

Gln Val Cys Pro Asp Glu His Leu Gln Lys His Tyr Pro Pro Leu Val
450 455 460

Phe Asp Leu Ile Arg Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Pro Leu Gln Asn Thr
465 470 475 480

Val Lys Ser Gln Glu Ile Arg Phe Gln Ala Met Gln Arg Leu Ser Glu
485 490 495

His Lys Ser Ser Leu Val Lys Val Lys Asn Val Leu Gly Ser Tyr Asn
500 505 510

Lys Thr Leu Ile Pro Cys Cys Asn Pro Pro Ser Cys Lys Cys Asp Lys
515 520 525

Leu Ser Arg Pro Thr Glu Phe Asp Glu Ser Arg Pro Asp Tyr Val Gly
530 535 540

Leu Val Pro Asp Leu Glu Lys Thr Glu Tyr Glu Leu Leu His Arg Phe
545 550 555 560

Phe

<210> 4
<211> 561
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Mutante Sul-2 (pv17)

<400> 4

Met Ser Pro Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Ser Thr
1 5 10 15

Phe Gln Gln Arg Glu Asp Cys Thr Val Gln Pro Pro Ser Pro Arg His
20 25 30

Pro Asn Ile Val Ile Leu Met Ile Asp Asp Leu Gly Tyr Asp Asp Ile
35 40 45

Ala Ser Tyr Gly His Pro Thr Gln Glu Tyr Thr Gln Val Asp Arg Met
50 55 60

Ala Ala Glu Gly Thr Arg Phe Thr Gln Ala Tyr Ser Ala Asp Ser Met
65 70 75 80

Cys Ser Pro Ser Arg Ala Gly Phe Ile Thr Gly Arg Leu Pro Ile Arg
85 90 95

Leu Gly Ile Val Gly Gly Arg Arg Val Phe Val Pro Tyr Asp Ile Gly
100 105 110

Gly Leu Pro Lys Ser Glu Thr Thr Met Ala Glu Met Leu Gln Glu Ala
115 120 125

Gly Tyr Ala Thr Gly Met Val Gly Lys Trp His Leu Gly Ile Asn Glu
130 135 140

Asn Asn Ala Thr Asp Gly Ala His Leu Pro Ser Lys Arg Gly Phe Glu
145 150 155 160

Tyr Val Gly Val Asn Leu Pro Phe Thr Asn Val Trp Gln Cys Asp Thr
165 170 175

Thr Arg Glu Phe Tyr Asp Lys Gly Pro Asp Pro Ser Leu Cys Phe Leu
180 185 190

Tyr Asp Gly Asp Asp Ile Val Gln Gln Pro Met Lys Phe Glu His Met
195 200 205

Thr Glu Asn Leu Val Gly Asp Trp Lys Arg Phe Leu Met Thr Arg Leu
210 215 220

Ala Gln Asp Gln His Glu Arg Pro Phe Phe Phe Tyr Phe Ser Phe Pro
225 230 235 240

Gln Val His Ser Thr Gln Phe Ala Ser Lys Arg Phe Arg Gly Ser Ser
245 250 255

Val Arg Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Ile Asn Glu Met Ser Trp Ala Val
260 265 270

Gly Glu Val Leu Asp Ser Leu Val Asn Ala Gly Ile Ala Glu Asn Thr
275 280 285

Leu Val Ile Leu Met Ser Asp His Gly Pro His Val Glu Leu Cys Leu
290 295 300

Asn Gly Gly Ser Thr Ala Gly Leu Lys Gly Gly Lys Ser Asn Ser Tyr
305 310 315 320

Glu Gly Gly Phe Arg Ile Pro Phe Ile Ala Trp Gln Pro Gly Thr Val
325 330 335

Lys Pro Ser Arg Val Ser His Glu Val Ile Ser Ser Met Asp Leu Phe
340 345 350

Pro Thr Phe Arg Gly Met Gln Glu Gln Cys Leu Phe Glu Lys Glu Ala
355 360 365

Leu Arg Ser Asp Gly Ile Asp Ile Ser Asp Glu Leu Arg Gly Glu Ser
370 375 380

Glu Asp Val Glu Gly Ser Leu Gly Lys Ala Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr
385 390 395 400

Cys Asn Thr His Leu Met Ala Ile Arg Met Gly Asp Tyr Lys Val His
405 410 415

Tyr Lys Thr Ser Pro Ile Phe Phe Asn Asn Ser Val Asp Pro Asn Leu
420 425 430

Asp Tyr Phe Cys Pro Asn Gly Lys Pro Lys Ser Asp Trp Tyr Val Ser
435 440 445

Gln Val Cys Pro Asp Glu His Leu Gln Lys His Tyr Pro Pro Leu Val
450 455 460

Phe Asp Leu Ile Arg Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Pro Leu Gln Asn Thr
465 470 475 480

Val Lys Ser Gln Glu Ile Arg Phe Gln Ala Met Gln Arg Leu Ser Glu
485 490 495

His Lys Ser Ser Leu Val Lys Val Lys Asn Val Leu Gly Ser Tyr Asn
500 505 510

Lys Thr Leu Ile Pro Cys Cys Asn Pro Pro Ser Cys Lys Cys Asp Lys
515 520 525

Leu Ser Arg Pro Thr Glu Phe Asp Glu Ser Arg Pro Asp Tyr Val Gly
530 535 540

Leu Val Pro Asp Leu Glu Lys Thr Glu Tyr Glu Leu Leu His Arg Phe
545 550 555 560

Phe

<210> 5
<211> 430
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

Listado de secuencias_ES2762.3_ST25

<223> Mutante Sul-2 (gk187)

<400> 5

Met Ser Pro Val Gly Lys Trp His Leu Gly Ile Asn Glu Asn Asn Ala
1 5 10 15

Thr Asp Gly Ala His Leu Pro Ser Lys Arg Gly Phe Glu Tyr Val Gly
20 25 30

Val Asn Leu Pro Phe Thr Asn Val Trp Gln Cys Asp Thr Thr Arg Glu
35 40 45

Phe Tyr Asp Lys Gly Pro Asp Pro Ser Leu Cys Phe Leu Tyr Asp Gly
50 55 60

Asp Asp Ile Val Gln Gln Pro Met Lys Phe Glu His Met Thr Glu Asn
65 70 75 80

Leu Val Gly Asp Trp Lys Arg Phe Leu Met Thr Arg Leu Ala Gln Asp
85 90 95

Gln His Glu Arg Pro Phe Phe Phe Tyr Phe Ser Phe Pro Gln Val His
100 105 110

Ser Thr Gln Phe Ala Ser Lys Arg Phe Arg Gly Ser Ser Val Arg Gly
115 120 125

Ile Tyr Gly Asp Ser Ile Asn Glu Met Ser Trp Ala Val Gly Glu Val
130 135 140

Leu Asp Ser Leu Val Asn Ala Gly Ile Ala Glu Asn Thr Leu Val Ile
145 150 155 160

Leu Met Ser Asp His Gly Pro His Val Glu Leu Cys Leu Asn Gly Gly
165 170 175

Ser Thr Ala Gly Leu Lys Gly Gly Lys Ser Asn Ser Tyr Glu Gly Gly
180 185 190

Phe Arg Ile Pro Phe Ile Ala Trp Gln Pro Gly Thr Val Lys Pro Ser
195 200 205

Arg Val Ser His Glu Val Ile Ser Ser Met Asp Leu Phe Pro Thr Phe
210 215 220

Arg Gly Met Gln Glu Gln Cys Leu Phe Glu Lys Glu Ala Leu Arg Ser
225 230 235 240

Asp Gly Ile Asp Ile Ser Asp Glu Leu Arg Gly Glu Ser Glu Asp Val
245 250 255

Glu Gly Ser Leu Gly Lys Ala Arg Pro Ile Ile Tyr Tyr Cys Asn Thr
260 265 270

His Leu Met Ala Ile Arg Met Gly Asp Tyr Lys Val His Tyr Lys Thr
275 280 285

Ser Pro Ile Phe Phe Asn Asn Ser Val Asp Pro Asn Leu Asp Tyr Phe
290 295 300

Cys Pro Asn Gly Lys Pro Lys Ser Asp Trp Tyr Val Ser Gln Val Cys
305 310 315 320

Pro Asp Glu His Leu Gln Lys His Tyr Pro Pro Leu Val Phe Asp Leu
325 330 335

Ile Arg Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Pro Leu Gln Asn Thr Val Lys Ser
340 345 350

Gln Glu Ile Arg Phe Gln Ala Met Gln Arg Leu Ser Glu His Lys Ser
355 360 365

Ser Leu Val Lys Val Lys Asn Val Leu Gly Ser Tyr Asn Lys Thr Leu
370 375 380

Ile Pro Cys Cys Asn Pro Pro Ser Cys Lys Cys Asp Lys Leu Ser Arg
385 390 395 400

Pro Thr Glu Phe Asp Glu Ser Arg Pro Asp Tyr Val Gly Leu Val Pro
405 410 415

Asp Leu Glu Lys Thr Glu Tyr Glu Leu Leu His Arg Phe Phe
420 425 430