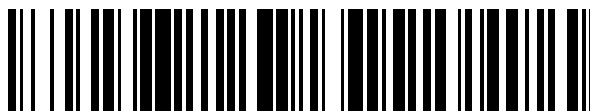


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 077 710**

51 Int. Cl.:

A61K 31/37 (2006.01)

A61K 31/568 (2006.01)

A61K 31/5685 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2021** **PCT/EP2021/079710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2022** **WO22090247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2021** **E 21798711 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2026** **EP 4232021**

54 Título: **Hormonas esteroideas C19 sulfatadas para tratar y/o prevenir proteotoxicidad en enfermedades de agregación de proteínas**

30 Prioridad:

26.10.2020 EP 20382931

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.09.2026

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (100,00%)
Ctra. de Utrera, Km. 1
41013 Sevilla, ES**

72 Inventor/es:

**MUÑOZ, MANUEL J.;
PÉREZ-JIMÉNEZ, MERCEDES M. y
CARRIÓN, ÁNGEL M.**

74 Agente/Representante:

QUIRÓS MARÍN, María

Observaciones:

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

ES 3 077 710 T3

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

DESCRIPCIÓN

Hormonas esteroideas C19 sulfatadas para tratar y/o prevenir proteotoxicidad en enfermedades de agregación de proteínas

Campo técnico de la invención

La presente invención se abarca dentro del campo de la medicina y proporciona una composición para su uso en los tratamientos y/o la prevención de enfermedades de agregación de proteínas.

Antecedentes de la invención

Los animales pueden prolongar su esperanza de vida activando diferentes rutas genéticas. Este aumento de longevidad es un proceso regulado que depende en la coordinación de diferentes tejidos y señales ambientales. Las hormonas son factores clave en los tejidos y la comunicación celular. Por consiguiente, están implicados en diferentes rutas que regulan la longevidad, entre ellas la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina, TGF β o ácidos dafacrónicos que se describe que afectan a la esperanza de vida al menos en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. La gónada es un tejido endocrino que produce hormonas esteroideas para regular diferentes aspectos fisiológicos del organismo, incluyendo la longevidad. En *C. elegans*, la ablación de la línea germinal prolonga la esperanza de vida por mecanismos no completamente comprendidos. Se necesitan diversos factores para el aumento de la longevidad, incluyendo la síntesis de ácido dafacrónico por la gónada somática, así como el factor de transcripción codificado por daf-16, homólogo al FOXO humano, y los receptores nucleares codificados por los genes daf-12, nhr-80 y nhr-492.

Se considera que la función clásica de las hormonas esteroideas es la activación de los receptores de hormonas para transcribir sus genes diana. Las hormonas esteroideas no sólo se producen en gónadas sino también en otros tejidos. Aquellas producidas en el sistema nervioso se conocen como neuroesteroides. Los neuroesteroides, además de unirse a receptores de hormonas, modulan la neurotransmisión o bien a través de la interacción directa con receptores de neurotransmisores o bien mediante otros mecanismos. Las hormonas esteroideas pueden sulfatarse mediante una enzima sulfotransferasa, generando un profundo cambio en las características químicas de la hormona que perjudica su función como activador del receptor de hormonas. Se considera que esas hormonas sulfatadas son un reservorio inactivo de hormonas que pueden activarse tras la eliminación del resto sulfato por la actividad de las hormonas sulfatasas. Las hormonas esteroideas sulfatadas también pueden actuar como neuroesteroides, regulando la neurotransmisión.

Algunas hormonas esteroideas sulfatadas, como deshidroepiandrosterona sulfatada (DHEAS), se han relacionado durante mucho tiempo con el envejecimiento. El nivel de esta hormona disminuye con la edad y en enfermedades relacionadas con la edad tales como sarcopenia o enfermedad de Alzheimer, que ha generado la especulación de un efecto causante.

En este caso se muestra que la inhibición de la sulfatasa esteroidea genera un aumento del porcentaje de hormonas sulfatadas y, asociado con eso, un aumento en la longevidad y la mejora de los síntomas relacionados con enfermedades de agregación de proteínas. Este aumento en la longevidad depende principalmente de los mismos factores descritos para la longevidad provocada por la ablación de la línea germinal. El tratamiento con STX64, un inhibidor específico de la enzima sulfatasa esteroidea, imita los efectos beneficiosos en la longevidad y las enfermedades de agregación de proteínas observadas en el mutante. Curiosamente, el tratamiento con STX64 también mejora los síntomas cognitivos y la formación de placas en un modelo mamífero de enfermedad de Alzheimer. Finalmente, los fenotipos observados se recapitulan mediante tratamiento con hormonas esteroideas androgénicas C19 sulfatadas, pero no con las formas no sulfatadas o la hormona pregnenolona C21 sulfatada, lo que indica que el efecto beneficioso causante de la inhibición de sul-2 se debe al aumento de hormonas esteroideas C19 sulfatadas en lugar de la reducción de la forma no sulfatada. Por tanto, esta invención demuestra que STX64 u hormonas esteroideas C19 sulfatadas específicas son un posible tratamiento para el envejecimiento y/o enfermedades relacionadas con el envejecimiento, más particularmente hormonas esteroideas C19 sulfatadas específicas prolongan la esperanza de vida y protegen contra la proteotoxicidad asociada al envejecimiento. El documento US 5 888 996 exponen composiciones que comprenden sulfato de androsterona (AS) para su uso en el tratamiento de, entre otras, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington.

Gouras GK *et al.*, "Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 de febrero de 2000; 97(3), 1202-5, informan del uso de testosterona para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Okun, M. S., *et al.*, "Beneficial effects of testosterone replacement for the nonmotor symptoms of Parkinson disease", Arch Neurol., nov. de 2002; 59(11), 1750-3 divulgan la testosterona para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Bianchi V. E., *et al.*, "Androgen Therapy in Neurodegenerative Diseases", Journal of the Endocrine Society, vol. 4, n.º

11, 21 de agosto de 2020 (21-08-2020) revisan terapias con andrógenos contra la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, y la enfermedad de Huntington.

El documento US 5 556 847 describe el uso de inhibidores de sulfatasas esteroideas en combinación con neuroesteroides que se producen de manera natural tales como sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS) y sulfato de pregnenolona (PS) contra la enfermedad de Alzheimer.

Pérez-Jiménez M-M., *et al.* "Steroid hormones sulfatase inactivation extends lifespan and ameliorates age-related diseases", bioRxiv, 6 de febrero de 2019 (06-02-2019) y el documento WO 2019/243453 informan del uso de inhibidores de sulfatasas esteroideas contra trastornos de agregación de proteínas tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Huntington.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. La reducción de la actividad de sul-2 aumenta la longevidad y afecta a los niveles de hormonas esteroideas sulfatadas. A) El alelo de mutación puntual sul-2(pv17) vive más tiempo que el tipo natural. B) El alelo nulo sul-2 (gk187) también aumenta la esperanza de vida. C) Árbol filogenético de sulfatasas de mamífero y las tres sulfatasas de *C. elegans*. Obsérvese que SUL-2 se agrupa con sulfatasas esteroideas (tipo C) entre otras, en azul. La relación filogenética con otras sulfatasas de *C. elegans* se indica en gris. D) La inhibición de las hormonas esteroideas sulfatadas por STX64 (1 µg/ml) aumenta la esperanza de vida en animales de tipo natural, pero no en el trasfondo genético de sul-2 (gk187). Se cultivaron gusanos en *E. coli* inactivada con UV. E) La delección de sul-2 genera un aumento en el porcentaje de hormonas esteroideas en la etapa sulfatada. Se muestran los datos de tres ensayos independientes. Prueba de la t de Mann-Whitney unilateral.

Figura 2. Interacciones genéticas y ubicación celular de la expresión de sul-2. El análisis genético muestra que sul-2 imita la mayor parte de la interacción genética descrita para animales sin línea germinal, pero no afecta a la fertilidad. a. sul-2 potencia la longevidad en un trasfondo genético de daf-2(e1370). b. El factor de transcripción daf-16 es necesario para la longevidad de sul-2. c, d, e. Los factores esenciales para la longevidad a la pérdida de línea germinal kri-1(ok1251), tcer-1(tm1452) y parcialmente nhr-80(tm1011) son necesarios para la longevidad de sul-2. f. nhr-49(nr2041) no suprime el aumento de esperanza de vida de sul-2. g, h. La delección de sul-2 no presenta un aumento significativo de la longevidad en mutantes sin línea germinal glp-1(e2141) y mes-1(bn7). i. El tamaño de la prole de mutantes de sul-2 no es significativamente diferente al tipo natural. Media±EEM; prueba de ANOVA de un factor; ns. j. El periodo reproductivo de los mutantes de sul-2 no se ve afectado (25 °C). k. Las condiciones de restricción dietética (DR) muestran una longevidad mejorada en el trasfondo genético de delección de sul-2. l. el factor de transcripción daf-12 es necesario para la longevidad de sul-2. m. La oxigenasa de tipo Rieske daf-36 es necesaria para el aumento de la longevidad tras la inhibición de la hormona esteroidea sulfatasa, STX64 (1 µg/ml). n. sul-2 se expresa transcripcionalmente en neuronas sensitivas, principalmente ADF y ASE en la cabeza, y PHA y PHB en la cola. Barra de escala de 10 µm.

Figura 3. La reducción de la actividad de la hormona esteroidea sulfatasa mejora los síntomas de los modelos de proteotoxicidad en *C. elegans* y el modelo murino. a. cepa NL5901 que expresa α -sinucleína en células musculares reduce la movilidad con la edad a una velocidad más lenta en un trasfondo genético de sul-2(gk187) ($n \geq 17$ por día). Prueba estadística frente al control de α -sinucleína o b. bajo tratamiento con STX64 (1 µg/ml) ($n \geq 9$ al día). Se muestran ensayos de réplicas biológicas adicionales en las figuras 12 a y c. c, d. La neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas (DA) en la cepa UA44 que expresa α -sinucleína humana se reduce en el trasfondo genético de sul-2(gk187). Una imagen representativa de cada condición y cuantificación de neuronas supervivientes el día 9. Escala de 50 µm. Se muestran los datos de dos réplicas biológicas, $n = 37$, e. Los agregados de Q35 se reducen en trasfondo genético de sul-2 (gk187) ($n \geq 6$), gusanos de 8 días de edad o f. mediante tratamiento con STX64 (1 µg/ml) en el trasfondo genético de Q40 ($n \geq 12$), gusanos de 5 días de edad. Las cepas AM140 y AM141 respectivamente. g. La expresión de β -amiloide humano en músculo provoca una parálisis termodependiente en etapa adulto joven L4 en la cepa GMC101, el fenotipo de parálisis mejora en el mutante con delección sul-2. Se presentan los datos procedentes de cuatro réplicas biológicas independientes, $n=125$. h. o mediante tratamiento con STX64 (1 µg/ml). Se presentan los datos procedentes de seis réplicas biológicas independientes, $n \geq 215$. i, j. El efecto de la administración intrahipocámpica y oral de STX64 en la prueba de evitación pasiva en ratones de tipo natural a los que se les inyectaron oligómeros de β -amiloide en el hipocampo. El número de ratones en cada grupo fue >5 . k. Imágenes representativas inmunorreactivas para β -amiloide evaluadas en la corteza frontal y el hipocampo de ratones APP-PS1 mayores de 15 meses de edad después de 3-4 semanas de consumo de vehículo o STX64 (0,005 mg/ml en agua potable). l-n. Cuantificación del porcentaje de área de β -amiloide (c), densidad de deposición (d) y tamaño promedio de placa (e) en la corteza frontal y el hipocampo de ratones APP-PS1 de >15 meses de edad después de 3-4 semanas de administración oral de STX64 o vehículo. $n=4$ ratones por grupo. o. Evolución temporal de la deposición de β -amiloide en ratones APP-PS1 y el efecto del tratamiento oral con STX64 de 3-4 semanas en el área de β -amiloide en la corteza frontal (panel superior) y el hipocampo (panel inferior). El número de microfotografías usadas fue mayor de 3 en todos los ratones usados. p. El efecto de la administración oral de STX64 en ratones APP-PS1 de más de 15 meses de edad, y comparación con ratones APP-PS1 y de tipo natural de más de 15 meses en la prueba de evitación pasiva. El número de ratones en cada grupo fue > 5 . En el análisis

histológico, * representa diferencias significativas entre ratones APP-PS1 a los que se les administraron vehículo y STX64. En la prueba de comportamiento, * representa diferencias significativas entre las sesiones de memoria a corto y largo plazo (STM y LTM, respectivamente) y la sesión de entrenamiento en el mismo grupo experimental; y + representa diferencias significativas entre las sesiones de STM y LTM entre cada grupo experimental y grupo de β -amiloide. Un símbolo, $p < 0,05$, dos símbolos, $p < 0,01$ y tres símbolos, $p < 0,001$.

Figura 4. Las hormonas esteroideas androgénicas C19 sulfatadas imitan la inactivación de sul-2. a. cepa NL5901 que expresa α -sinucleína en células musculares reduce la movilidad con la edad. El tratamiento con DHEAS, TS o ES mejora la movilidad (1 $\mu\text{g/ml}$). Se muestran los datos de tres réplicas biológicas, $n = 30$. b. La parálisis del modelo de enfermedad de Alzheimer GMC101 mejora con TS y ES. Se muestran los datos de seis réplicas biológicas, $n \geq 200$. Ensayos adicionales en placas normales de NGM se muestran en la figura 13a. c, d. No se observa ningún efecto con hormona esteroidea no sulfatada DHEA o testosterona (T), ni con hormona esteroidea C21 sulfatada, sulfato de pregnenolona (PregS) en el modelo de Parkinson, cepa NL5901 (1 $\mu\text{g/ml}$). Se muestran los datos de tres réplicas biológicas, $n = 30$. e. El tratamiento con abiraterona (Abi) (1 $\mu\text{g/ml}$) no afecta al fenotipo de movilidad de la cepa NL5901, pero suprime el efecto beneficioso del alelo de delección de sul-2. Se muestran los datos de tres réplicas biológicas, $n \geq 30$. f. El tratamiento con ES (1 $\mu\text{g/ml}$) aumenta la esperanza de vida en un trasfondo genético de tipo natural pero no aumenta adicionalmente en sul-2(gk187), g. DHEAS o TS (1 $\mu\text{g/ml}$) no afecta a la longevidad. En las figuras 13c y d se muestran ensayos adicionales de réplicas biológicas.

Figura 5. Los ensayos de longevidad de sul-2 e interacciones genéticas con daf-2. Los mutantes de sul-2 no muestran fenotipos visibles, pero tienen larga esperanza de vida y mejoran los fenotipos de desarrollo de los mutantes de daf-2. a. sul-2(pv17) tiene larga esperanza de vida y fer-15(b26) no afecta a su esperanza de vida. b. Los mutantes de sul-2 tienen larga esperanza de vida a 20 °C y c. a 25 °C. d. La tasa de bombeo de los mutantes de sul-2 es similar al tipo natural en el adulto de día 1, mientras que el alelo pv17 mantiene una tasa de bombeo mayor que el tipo natural en la etapa de adulto de 6 días. Se hicieron crecer gusanos a 16 °C hasta L4, luego se cambiaron a 25 °C considerando este el día 0 de la edad adulta. El bombeo se contó con el estereoscopio Leica con un aumento de 100X durante 30 segundos. Se presentan los datos procedentes de dos ensayos biológicos independientes ($n = 30$ por día). La prueba de la t de Mann-Whitney bilateral, *** $p = 0,0006$. e. La frecuencia de sacudida en sul-2(gk187) es similar al tipo natural, pero es ligeramente menor en sul-2 (pv17) a 25 °C el día 1 de la edad adulta. En el día 6 a 25 °C de la edad adulta, la frecuencia de sacudida en sul-2(gk187) es menor que la de tipo natural y sul-(pv17), sin diferencias entre estas últimas cepas. La población de sul-2(gk187) el día 6 parece distribuirse en dos poblaciones diferentes, una sin apenas frecuencia de sacudida y otra con valores similares a sul-2(pv17) de tipo natural. Se presentan los datos procedentes de dos ensayos biológicos independientes ($n = 20$ por día). f. sul-1(gk151) y sul-3(tm6179) no aumentan la esperanza de vida. g. Un pequeño porcentaje de animales daf-2(e979) detiene el desarrollo en fase de larvas dauer a 16 °C, el mutante de sul-2(pv17) no muestra ninguna detención larval, pero potencia la detención en fase dauer de daf-2(e979). h. La mayor parte de los animales daf-2(e1370) se detiene en la fase dauer cuando se desarrollan a 25 °C, pero un pequeño porcentaje se detiene en la fase L1. En esta condición, todos los animales de mutantes dobles de daf-2(e1370); sul-2(pv17) se detienen en la fase L1. De manera similar, más del 50 % de los animales se detienen en la fase L1 en el trasfondo genético de daf-2(m577); sul-2(pv17), mientras que ninguno de los mutantes individuales muestra este fenotipo. i. Ejemplo de larvas de sul-2(pv17), detención en fase de larvas dauer de daf-2(e1370) o detención en fase L1 de daf-2(e1370); sul-2(pv17) y daf-2(e1370); sul-2(gk187) a 25 °C. Se hicieron crecer los animales hasta L4 a 16 °C, luego se cambiaron a 25 °C, la progenie se puntuó o se sometió a obtención de imágenes después de 72 horas. Las fotografías se tomaron en un visor Leica.

Figura 6. Identificación del alelo pv17 y secuencia depurada de SUL-2. a. El alelo pv17 es una mutación de cambio de sentido que cambia la glicina indicada con asterisco a un residuo de ácido aspártico. La mutación se ubica cerca de una región evolutivamente restringida (ECR), indicada con la barra en la parte inferior y también cerca del núcleo catalítico de sulfatasas (en verde). b. La secuencia de ADN identificada en el sul-2 de tipo natural difiere de la publicada en WormBase (SUL-2_wormbase) e identificada como ortólogo a ARSA (<http://www.wormbase.org>), esta secuencia pierde 459 pb, también descrita recientemente por Li *et al.* (2015) y predicha como parte de un nuevo exón [wormbase_170818 gw3] basado en datos de RNA-seq (SUL-2_modificada). La secuencia de proteínas obtenida mediante secuenciación de ADNc del clon yk387h10 (SUL-2_depurada) difiere de la predicha en tres aminoácidos (en negrita). Obsérvese que los tres aminoácidos identificados en esta secuencia están presentes también en otras especies (CRE: *C. remanei*, CBR: *C. brigssae*). c. Composición de intrones y exones de sul-2 de tipo natural y región delecionada en el alelo gk187 (en rojo). La lesión mutante está disponible en WormBase (http://www.worm-base.org/species/c_elegans/variation/WBVar00145594#02-45-3). Este alelo deleciona la secuencia que codifica para el núcleo catalítico de sulfatasas (en verde) y genera un desplazamiento de marco de lectura, conservando sólo los cuatro primeros aminoácidos de la secuencia original; por tanto, se considera gk187 un alelo nulo. La ubicación del alelo pv17 se indica con asterisco, el nuevo fragmento de ADN se identifica en amarillo y el nuevo exón se identifica en morado.

Figura 7. El tratamiento con STX64 produce fenocopias de longevidad e interacción genética de mutantes de sul-2. a. STX64 en *E. coli* no inactivado con UV aumenta la esperanza de vida del tipo natural. b, c. Las curvas de dosis de STX64 en *E. coli* no inactivado con UV muestran un efecto significativo a 1 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$. d. Fotografías de tipo

natural y daf-2 (e1370) a 25 °C. El DMSO (vehículo con STX64) no afecta al desarrollo de tipo natural, ni el tratamiento con STX64, daf-2(e1370) se detiene principalmente en la fase dauer a 25 °C, pero se detiene principalmente en L1 cuando se trata con STX64, también se observa interacción similar en los mutantes de sul-2. Las fotografías se tomaron en un visor Leica. Cabezas de flecha: dauer, flechas: L1.

Figura 8. Interacciones genéticas del alelo sul-2(pv17). El alelo pv17 de mutación puntual de sul-2 muestra fenotipos similares en interacciones de longevidad sometidas a ensayo que delección de sul-2, excepto en trasfondo genético de glp-1. a, b. sul-2(pv17) potencia la longevidad de dos alelos de daf-2, e1370 y m577. c, d. La longevidad de sul-2(pv17) se suprime por dos alelos de daf-16, mu86 y m26. e. La longevidad de sul-2(pv17) se suprime por tcer-1(tm1452). f. La longevidad de sul-2(pv17) se suprime parcialmente por nhr-80(tm1011). g. La longevidad de sul-2(pv17) no se suprime por nhr-49(nr2041). h. sul-2(pv17) aumenta la esperanza de vida en el trasfondo genético de glp-1. i. La longevidad de sul-2(pv17) se suprime por daf-12(m20).

Figura 9. Los mutantes de sul-2 afectan a la ubicación de DAF-16 en células intestinales, pero no afectan a la reproducción o morfología de las gónadas. a. Las micrografías muestran imágenes representativas de la ubicación de Pdaf-16::gfp::daf-16 en tipo natural (panel izquierdo) y mutantes de sul-2 (paneles central y derecho). Ambos mutantes de sul-2 aumentan la ubicación nuclear de DAF-16 en células intestinales, como en animales sin línea germinal. Escala de 20 µm. b. Cuantificaciones de fluorescencia nuclear en las células intestinales anteriores. Datos procedentes de dos ensayos independientes, n ≥ 34 núcleos por condición. Prueba de ANOVA de un factor. c. Los mutantes de sul-2 tienen un tamaño de prole similar al control a 20 °C. Prueba ANOVA de un factor; ns. d. El periodo reproductivo de los mutantes de sul-2 no se ve afectado a 20 °C. e. Los mutantes de sul-2 muestran una morfología normal de las gónadas. Se muestran las micrografías de un grupo gonadal representativo en L4 tardía para cada cepa.

Figura 10. sul-2 se expresa en neuronas sensitivas anfidaes y fasmidiales. Los gusanos transgénicos extracromosómicos expresan mCherry bajo el promotor de sul-2 y su 3'UTR sólo en pocas neuronas sensitivas. a. un indicador transcripcional para sul-2 se expresa en neuronas sensitivas. Imágenes obtenidas en fluorescencia y fusionadas con el campo claro. b. Imágenes representativas de la expresión extracromosómica de sul-2 en anfidios, la mayoría de los animales transgénicos expresan sul-2 en dos pares de neuronas anfidaes, panel izquierdo, y una parte muestra la expresión en otras neuronas además de aquellas, panel derecho. n=64. c. Colocación de neuronas sul-2 con tinciones con FITC. El panel superior muestra la ubicación en la cabeza con los anfidios del par más anterior, posiblemente neuronas ASK, ADF o ADL, pero no con el par más posterior, ASG o ASE. En la cola, panel inferior, las cuatro neuronas donde sul-2 se expresa se cubren con tinción con FITC en neuronas fasmidiales PHA o PHB. d. Identificación de los dos pares principales de anfidios donde sul-2 se expresa por ubicación con el promotor específico de neurona tph-1 para ADF, panel superior, y las neuronas posteriores expresadas por el promotor flp-6, anfidios ASE, panel inferior. Barra de escala 20 µm. En el intestino, las señales son inespecíficas de autofluorescencia en las condiciones sometidas a obtención de imágenes (cabezas de flecha de color cian).

Figura 11. sul-2 no se expresa en tejidos gonadales y no se ve afectada en funciones neuronales. Un indicador de mCHERRY integrado de la unidad transcripcional de sul-2 sólo se expresa en neuronas sensitivas, no hay expresión en otros tejidos. Imágenes obtenidas en fluorescencia y fusionadas con la imagen de campo claro. b. Inserto de gusanos integrados, i) En cabezas, sul-2 se expresa en pocas neuronas anfidaes (flechas blancas). En el intestino, las señales son inespecíficas de autofluorescencia en las condiciones sometidas a obtención de imágenes (puntas de flechas de color cian). ii) No hay señales específicas en la vulva, embriones o zona de línea germinal proliferativa. iii) No hay señales específicas en la gónada u ovocitos maduros. iv) En la cola, no hay señales significativas en fasmidos. Barra de escala 50 µm. c. Aparte de expresarse en la neurona de detección de Cl⁻ y Na⁺ (ASE), los mutantes de sul-2 responden a Cl⁻ de manera similar al tipo natural. Datos procedentes de tres réplicas independientes. d. Los mutantes de sul-2 responden a Na⁺ de manera similar al tipo natural. tax-4(p678) es un control negativo. Datos procedentes de tres réplicas independientes. En todos los gráficos se muestra la media±EEM. e. La delección de sul-2 potencia la longevidad del mutante de daf-10(m79) de larga esperanza de vida, que se ve afectado en las neuronas sensitivas.

Figura 12. Los fenotipos de neurodegeneración mejoran durante el envejecimiento cuando se reduce la función sulfatasa esteroidea, y disminuye la agregación de α-sinucleína. a. sul-2 tiene un efecto beneficioso durante la edad adulta en el modelo de enfermedad de Parkinson muscular. Se presentan los datos procedentes de dos réplicas biológicas independientes, n ≥ 31 por día y condición. b. y sul-2 tiene menos flexiones corporales con respecto al control de tipo natural en las mismas condiciones experimentales, n ≥ 15 por día y condición (20 °C). c. El efecto protector de STX64 en el modelo de enfermedad de Parkinson muscular está presente durante todo el envejecimiento. Se presentan los datos procedentes de dos réplicas biológicas independientes, n ≥ 12 por día y condición. d, e. sul-2 reduce significativamente el número de agregados de α-sinucleína en el músculo a los 7 días de edad. Fotografías de ejemplo de animales y cuantificaciones, respectivamente. n=18. Barra de escala 25 µm. f. La expresión de β-amiloide humano en músculo provoca parálisis con la edad (cepa CL2006) que mejora en el mutante con delección de sul-2 o g. por tratamiento con STX64. Prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox), para la delección de sul-2 p=0,0027, y tratamiento con STX p=0,007.

Figura 13. El tratamiento con hormonas esteroideas C19 sulfatadas produce fenocopias de la inactivación de sul-2. a. Fenotipo de parálisis de la cepa GMC101, modelo de enfermedad de Alzheimer, se reduce con TS y ES, pero no con DHEAS (1 µg/ml). Ensayos realizados con placas normales de NGM. Se presentan los datos procedentes de tres réplicas biológicas independientes, n>130. b. Similar a daf-2(e1370); sul-2, porcentaje de detención en fase L1 en daf-2 (e1370) aumenta con DHEAS, TS o ES. c, d. Réplicas biológicas adicionales de la curva de longevidad con hormonas esteroideas C19 sulfatadas. ES (1 µg/ml) aumenta la esperanza de vida en el trasfondo genético de tipo natural pero no aumenta adicionalmente en sul-2(pv17), mientras que DHEAS y TS no afectan (1 µg/ml).

Figura 14. Modelo de regulación de longevidad por SUL-2. La sulfatasa SUL-2 y la sulfotransferasa (probablemente ssu-1) regulan el nivel de hormonas esteroideas sulfatadas. Un alto nivel de hormona esteroidea sulfatada provoca un aumento de la longevidad, que depende de los mismos factores para la longevidad generada por la reducción de la línea germinal (daf-16, daf-12, kri-1, tcer-1). El hecho de que tanto sulfatasa como sulfotransferasa se expresen en neuronas sensitivas sugiere una coordinación del estado sulfatado de las hormonas con señales ambientales.

Figura 15. El tratamiento con sulfato de androsterona (AS) mejora los síntomas del modelo de Alzheimer en *Caenorhabditis elegans*. La cepa GMC101 expresa el β-amiloide humano en células musculares y genera parálisis con la edad. El tratamiento con 1 mg/ml o 5 mg/ml reduce este efecto. Datos procedentes de 5 réplicas biológicas. La parálisis se monitorizó durante la edad adulta. Se consideró la parálisis cuando los nematodos no se movieron después de la estimulación con una púa de platino. Se analizaron más de 200 nematodos. Los nematodos se sincronizaron y se sometieron a ensayo a 20 °C.

Descripción de la invención

Definiciones

Los términos “individuo”, “paciente” o “sujeto” se usan indistintamente en la presente solicitud para designar un ser humano y no se pretende que sean limitativos de ninguna manera. El “individuo”, “paciente” o “sujeto” puede ser de cualquier edad, sexo y estado físico. El término “animal”, tal como se usa en la presente solicitud, se refiere a cualquier heterótrofo eucariota multicelular que no es un humano. En una realización preferida, el animal se selecciona de un grupo que consiste en gatos, perros, cerdos, hurones, conejos, jerbos, hámsteres, cobayas, caballos, gusanos, ratas, ratones, vacas, ovejas, cabras, alpacas, camellos, burros, llamas, yaks, jirafas, elefantes, suricatos, lémures, leones, tigres, canguros, koalas, murciélagos, monos, chimpancés, gorilas, osos, dugongos, manatís, focas y rinocerontes.

Tal como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “diluyente farmacéuticamente aceptable” significa cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El término “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier sustancia formulada junto con el principio activo de un medicamento, incluido con el propósito de estabilización a largo plazo, aumento de volumen de formulaciones sólidas que contienen principios activos potentes en pequeñas cantidades, o para conferir una potenciación terapéutica al principio activo en la forma de dosificación final, tal como facilitar la absorción de fármacos, reducir la viscosidad o potenciar la solubilidad. Los excipientes también pueden ser útiles en el procedimiento de fabricación, para ayudar en la manipulación de la sustancia activa en cuestión, tal como facilitando la fluidez del polvo o propiedades antiadherentes, además de ayudar en la estabilidad *in vitro*, tal como la prevención de la desnaturalización o agregación durante la vida útil esperada. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y, sin limitar el alcance de la presente invención, incluyen: agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihidroxilados; aminoácidos, tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico y treonina; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitols (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona. También pueden incluirse otros portadores, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22ª edición, Pharmaceutical press (2012), ISBN-13: 9780857110626.

Los términos “tratamiento” y “terapia”, tal como se usan en la presente solicitud, se refieren a un conjunto de medios higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos usados con la intención de curar y/o aliviar una enfermedad y/o síntoma con el objetivo de remediar el problema de salud. Los términos “tratamiento” y “terapia” incluyen métodos preventivos y curativos, ya que ambos se refieren al mantenimiento y/o restablecimiento de la salud de un individuo o animal. Independientemente del origen de los síntomas, enfermedad e incapacidad, la administración de un

medicamento adecuado para aliviar y/o curar un problema de salud debe interpretarse como una forma de tratamiento o terapia dentro del contexto de esta solicitud.

El término “prevención”, tal como se usa en la presente solicitud, se refiere a un conjunto de medios higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos usados para prevenir la aparición y/o el desarrollo de una enfermedad y/o síntomas. El término “prevención” abarca métodos profilácticos, ya que estos se usan para mantener la salud de un animal o individuo.

El término “inhibidor de sulfatasas” se refiere a cualquier sustancia capaz de reducir la actividad de una enzima de la clase esterasa que cataliza la hidrólisis de ésteres de sulfato. La sustancia puede ser una molécula que se une a cualquiera de los siguientes elementos: el gen que codifica para la enzima sulfatasa, factores de transcripción de dicho gen, cualquiera de los productos de expresión de dicho gen, por ejemplo, sin limitarse a los mismos, el ARN mensajero o la enzima sulfatasa, y disminuye o inhibe la expresión y la actividad de la molécula a la que se une, y/o su señalización intracelular o extracelular, conduciendo así a la inhibición total o parcial de la actividad de la enzima sulfatasa. El inhibidor puede seleccionarse de la lista que consiste en, sin limitarse a los mismos: antagonistas (preferiblemente químicos) contra la enzima sulfatasa, ARN de silenciamiento o anticuerpo específico contra la enzima sulfatasa (preferiblemente, el anticuerpo es monoclonal); en la presente invención, este anticuerpo puede definirse como un anticuerpo neutralizante contra el efecto de la enzima sulfatasa. Ejemplos de inhibidores químicos de la actividad de la enzima sulfatasa son, sin limitarse a ellos, sustratos alternativos tales como los de la serie 2-(hidroxifenil)indol sulfato, esteroides sintéticos o naturales que presentan actividad inhibidora contra STS, tales como 5-androsteno-3 β , 17 β -diol-3 sulfato, inhibidores competitivos tales como E1-MTP o EMATE, inhibidores no estrógenos tales como DU-14 (n.º CAS: 186303-55-9), COUMATE (4-metilcumarin-7-O-sulfamato) o STX64 (es decir, el compuesto de fórmula (II) tal como se describe en el documento WO2019/243453), u otros, tales como KW-2581 o STX213, cuya CI50 contra la enzima sulfatasa se ha determinado en diferentes estudios (Purohit & Foster, 2012, J. Endocrinol., 212(2):99-110).

El término “hormona esteroidea sulfatasa” (“STS”) se refiere a cualquier enzima sulfatasa implicada en el metabolismo de esteroides. En particular, las enzimas catalizan la conversión de precursores de esteroides sulfatados en el esteroide libre. Se ha secuenciado una STS a modo de ejemplo hallada en humanos, caracterizado y los datos se han depositado en la base de datos UniProtKB con el número de registro P08842. El término “inhibidor de la hormona esteroidea sulfatasa” se refiere a cualquier sustancia capaz de reducir la actividad de una hormona esteroidea sulfatasa. La sustancia puede ser una molécula que se une a cualquiera de los siguientes elementos: el gen que codifica para la enzima STS, factores de transcripción de dicho gen, cualquiera de los productos de expresión de dicho gen, por ejemplo, sin limitarse a ellos, el ARN mensajero o la enzima STS, y disminuye o inhibe la expresión y la 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 STS. El inhibidor puede seleccionarse de la lista que consiste en, sin limitarse a ellos: antagonistas (preferiblemente químicos) contra la enzima STS, ARN de silenciamiento o anticuerpo específico contra la enzima STS (preferiblemente, el anticuerpo es monoclonal); en la presente invención, este anticuerpo puede definirse como un anticuerpo neutralizante contra el efecto de la enzima STS. Ejemplos de inhibidores químicos de la actividad de la enzima STS son, sin limitarse a ellos, sustratos alternativos tales como los de la serie 2-(hidroxifenil)indol sulfato, esteroides sintéticos o naturales que presentan actividad inhibidora contra STS, tales como 5-androsteno-3 β , 17 β -diol-3 sulfato, inhibidores competitivos tales como E1-MTP o EMATE, inhibidores no estrógenos tales como DU-14, COUMATE (4-metilcumarin-7-O-sulfamato) o STX64 (es decir, el compuesto de fórmula (II) tal como se describe en el documento WO2019/243453), u otros, tales como KW-2581 o STX213, cuya CI50 contra la enzima sulfatasa se ha determinado en diferentes estudios (Purohit & Foster, 2012, J. Endocrinol., 212(2):99-110).

Los términos “enfermedad de agregación de proteínas”, “proteopatía”, “proteinopatía” o “enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas” se refieren a cualquier enfermedad en la que determinadas proteínas se vuelven estructuralmente anómalas y de ese modo alteran la función de las células, tejidos y órganos del cuerpo. A menudo, las proteínas no se pliegan en su configuración normal; en este estado plegado de manera incorrecta, las proteínas pueden volverse tóxicas de alguna manera o pueden perder su función normal. Los ejemplos no limitativos de enfermedades de agregación de proteínas incluyen amiloidosis AL sistémica, enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiforme transmisible, por ejemplo, encefalopatía espongiforme bovina, insomnio familiar letal, enfermedad de Huntington, carcinoma medular de tiroides, arritmias cardíacas, aterosclerosis, artritis reumatoide, amiloide de la capa media de la aorta, prolactinomas, polineuropatía amiloide familiar, amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria, amiloidosis relacionada con diálisis, amiloidosis de tipo finlandés, distrofia reticular de la córnea, angiopatía amiloide cerebral, angiopatía amiloide cerebral (tipo islandés), miositis por cuerpos de inclusión esporádica, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), encefalopatías espongiformes o relacionadas con priones, tales como Creutzfeld-Jacob, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal con parkinsonismo, ataxias espinocerebelosas, ataxia espinocerebelosa, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentatorubro-pálidoluisiana hereditaria, demencia británica familiar, demencia danesa familiar, enfermedades localizadas no neuropáticas, tales como en diabetes mellitus de tipo II, carcinoma medular de tiroides, amiloidosis auricular, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, prolactinoma hipofisario, amiloidosis localizada en el sitio de inyección, amiloidosis de la capa media de la aorta, distrofia reticular de la córnea hereditaria, amiloidosis de la córnea asociada con triquiasis, cataratas, tumores odontógenos epiteliales

calcificantes, proteinosis alveolar pulmonar, miositis por cuerpos de inclusión, amiloidosis de liquen cutáneo y amiloidosis sistémica no neuropática, tales como amiloidosis AL, amiloidosis AA, poliserositis familiar recurrente, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar, amiloidosis relacionada con hemodiálisis, amiloidosis ApoAI, amiloidosis ApoAII, amiloidosis ApoAIV, amiloidosis hereditaria de tipo finlandés, amiloidosis por lisozima, amiloidosis por fibrinógeno, angiopatía amiloide cerebral hereditaria de tipo islandés, amiloidosis familiar y amiloidosis sistémica que se produce en múltiples tejidos, tales como amiloidosis de cadena ligera, y otros diversos trastornos neurodegenerativos.

El término “agregado de proteínas” se refiere a cualquier acumulación de proteínas plegadas de manera anómala que provocan y/o se asocian con la progresión negativa de una enfermedad de agregación de proteínas.

El término “amiloide” se refiere a una forma de agregados de proteínas en la que los agregados forman fibras no ramificadas que se unen al rojo Congo y luego muestran birrefringencia verde cuando se observan entre polarizadores cruzados (por ejemplo, véase Eisenberg & Jucker, 2012. Cell. 148(6):1188-203 y Sipe *et al.*, 2012. Amyloid. 19(4):167-70).

El término “oligómero” se refiere a cualquier acumulación de proteínas plegadas de manera anómala que provocan y/o se asocian con la progresión negativa de una enfermedad de agregación de proteínas y no satisface la definición de un amiloide. Por ejemplo, los oligómeros de poliglutamina provocan y/o se asocian con la progresión negativa de la enfermedad de Huntington (véase Hoffner & Dijan, 2014. Brain Sci. 4(1): 91-122).

Descripción

La gónada es un tejido clave en la regulación de la esperanza de vida. La línea germinal regula la longevidad inhibiendo la producción de ácido dafacrónico en las gónadas somáticas. Por consiguiente, la ablación de la línea germinal o mutaciones que suprimen la generación de la línea germinal, aumentan la esperanza de vida mediante la activación de la síntesis de ácido dafacrónico. Las gónadas también son el tejido clásico que produce esteroides sexuales, aunque no es el único. Los datos de los presentes inventores indican que la inhibición de la actividad sulfatasa mediante mutación o mediante STX64 aumenta el nivel de un conjunto muy específico de hormonas esteroideas sulfatadas, que de hecho generan un aumento en la longevidad. Este aumento en la longevidad depende de factores comunes implicados en la prolongación de la esperanza de vida producida por la pérdida de la línea germinal, lo que sugiere que ambos procesos están de hecho ligados. No puede distinguirse si el efecto prolongevidad de las hormonas esteroideas sulfatadas participa en la misma ruta o actúa en paralelo con la longevidad de la línea germinal que comparte algún elemento de esta ruta. El hecho de que la inhibición de sul-2 no dependa de NHR-49, o sólo dependa parcialmente de NHR-80, que son esenciales para la longevidad mediada por la línea germinal, apunta a la segunda opción.

También se ha estudiado el nivel de hormonas esteroideas sulfatadas en el mutante de glp-1 sin línea germinal, y no se observa un aumento en las hormonas sulfatadas. Esos datos favorecen la idea de que las gónadas producen hormonas esteroideas, que se modifican por sulfatación. Estas hormonas esteroideas sulfatadas, que probablemente alteran la neurotransmisión, producen un aumento en la longevidad, a través de factores comunes a los animales sin línea germinal. El hecho de que las enzimas implicadas en la modificación con sulfato de hormonas esteroideas (sulfatasa SUL-2 y sulfotransferasa SSU-1) se expresen en neuronas sensitivas sugiere que la alteración del estado de las hormonas puede actuar en la integración de señales ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, con el estado reproductivo, que son dos procesos vinculados.

En *C. elegans*, la proliferación celular de las células somáticas sólo se produce durante el desarrollo y en fases larvarias, pero no en la fase adulta; por tanto, el aumento de la longevidad se debe al mantenimiento de las células posmitóticas. Un estrés observado en células adultas de *C. elegans* es la agregación de proteínas endógenas, que genera una disfunción celular. Esta formación de agregados relacionada con la edad también se observa tras la expresión ectópica de proteínas propensas a la agregación, como β -amiloide o α -sinucleína. Los mutantes que tienen larga esperanza de vida tales como daf-2 o glp-1 retrasan la toxicidad de agregación a través de un mecanismo diferente que incluye la expresión y degradación de chaperonas por proteasoma o autofagia. En el presente documento se muestra que la inhibición de la actividad sulfatasa o el tratamiento con algunas hormonas androgénicas C19 sulfatadas específicas afecta no sólo a la longevidad, sino que también reduce la agregación de proteínas y sus consecuencias tóxicas en modelos de *C. elegans* de enfermedades de agregación de proteínas.

La regulación de hormonas esteroideas por sulfatación es un proceso conservado. En mamíferos, las sulfotransferasas y sulfatasas se expresan en diferentes tejidos, incluyendo el sistema nervioso, similar a lo que se observa en *C. elegans*. En humanos, las hormonas esteroideas C19 también han estado implicadas en la longevidad. Por ejemplo, el sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS) disminuye con la edad y se ha usado como marcador del envejecimiento, lo que da lugar a las especulaciones de un efecto causante sobre la sarcopenia, la función cognitiva deficiente y otras enfermedades asociadas con el envejecimiento, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. Los datos de los presentes inventores muestran que la inhibición de la sulfatasa esteroidea por mutación o por tratamiento con STX64 prolonga la esperanza de vida en *C. elegans* y protege frente a la proteotoxicidad asociada al envejecimiento en nematodos. Curiosamente, se observaron efectos similares tras el tratamiento con

algunas hormonas esteroideas C19 sulfatadas específicas.

Más particularmente y en relación con dichas hormonas esteroideas C19 sulfatadas específicas, en mamíferos, se ha considerado desde hace tiempo que las hormonas sulfatadas son formas inactivas que funcionan principalmente como reservorios y se activan por sulfatasas esteroideas. En la presente invención, para determinar si el efecto beneficioso de la inhibición de sul-2 se debe a la reducción de hormonas no sulfatadas o al aumento de hormonas sulfatadas, se sometieron a prueba las hormonas esteroideas sulfatadas disponibles comercialmente que están altamente presentes en el mutante (tabla 1). Se observó que los andrógenos C19 sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS), sulfato de testosterona (TS) y sulfato de epitestosterona (ES) mejoraban la movilidad en el modelo de Parkinson de *C. elegans*, con un resultado notable para ES (figura 4a). Se obtuvieron resultados similares en el modelo de Alzheimer con TS y ES, pero no con DHEAS (figura 4b y figura 13a). El DHEA no sulfatado o la testosterona no sulfatada no mostraron ningún efecto, ni el sulfato de pregnenolona, que pertenece al grupo C21 de hormonas esteroideas (figuras 4c-d). Estos resultados indican que al menos algunos andrógenos C19 sulfatados están implicados en el efecto protector contra enfermedades de agregación de proteínas y sugieren fuertemente que el efecto beneficioso de la inhibición de sul-2 se debe a los niveles aumentados de este tipo de hormonas. De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con el compuesto antiandrógeno abiraterona (Abi)36 no afectó a los animales de tipo natural, pero suprimió el efecto beneficioso de la mutación de sul-2 (figura 4e).

Después, se sometieron a prueba esas hormonas para determinar si también están implicadas en los otros fenotipos observados en el mutante de sul-2. El tratamiento con cualquiera de esas hormonas sulfatadas generó un aumento de la detención en fase L1 en un trasfondo genético de daf-2(e1370) tal como se observa en animales tratados con STX 64 o sul-2 (figura 13b). Curiosamente, el tratamiento con ES, pero no con TS ni DHEAS, aumentó la longevidad en un trasfondo genético de tipo natural y no aumentó adicionalmente la longevidad en trasfondos genéticos de mutantes de sul-2 (figuras 4f-g y figuras 13c-d), lo que indica que ambas intervenciones comparten el mismo mecanismo molecular. Por tanto, la adición de ES recapituló todos los fenotipos descritos para la inhibición de sul-2 y sugiere fuertemente que el efecto causante de la mutación de sul-2 se debe al aumento de hormonas androgénicas C19 sulfatadas relacionadas con ES.

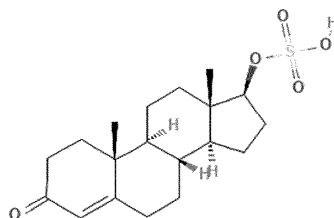
Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporcionar una composición, que incluye una composición farmacéutica o nutricional o un complemento alimenticio, que comprende un andrógeno C19 sulfatado seleccionado del grupo que consiste en sulfato de testosterona (TS), o cualquier sal del mismo, o sulfato de epitestosterona (ES), o cualquier sal del mismo, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de proteotoxicidad en una enfermedad de agregación de proteínas, en la que la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

A continuación se proporcionan realizaciones preferidas para las composiciones de la presente invención.

Andrógenos C19 sulfatados de la presente invención

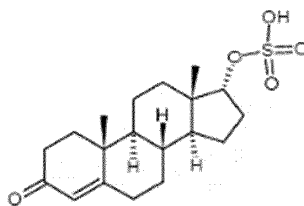
En una realización preferida, el andrógeno C19 sulfatado es sulfato de testosterona (TS) o sulfato de epitestosterona (ES).

El sulfato de testosterona (TS) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Testosterone-sulfate>) es un esteroide endógeno que se produce de manera natural y metabolito urinario menor de la testosterona, de nombre químico hidrogenosulfato de [(8R,9S,10R,13S,14S,17S)-10,13-dimetil-3-oxo-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidrociclopenta[a]fenantren-17-ilo], y fórmula:



Otros nombres. 17β-sulfato de testosterona; ácido 17β-sulfúrico de testosterona; 17β-(sulfooxi)androst-4-en-3-ona.

La epitestosterona difiere estructuralmente de la testosterona sólo en la configuración en el carbono que porta hidroxilo, C17. Sulfato de epitestosterona (ES) también conocido como 17α-sulfato de testosterona tiene el siguiente nombre químico hidrogenosulfato de N,N-dietiletanamina;[(8R,9S,10R,13S,14S,17R)-10,13-dimetil-3-oxo-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidrociclopenta[a]fenantren-17-ilo], y fórmula:



Cabe señalar en el presente documento que cualquiera de los andrógenos C19 sulfatados mencionados anteriormente incluye las sales correspondientes de los mismos. Preferiblemente, cualquiera de los andrógenos C19 sulfatados mencionados anteriormente incluye las sales farmacéuticamente aceptables correspondientes de los mismos.

Enfermedad de agregación de proteínas

Los agregados de proteínas tales como amiloides y oligómeros se han asociado con varias enfermedades. En algunos casos, estos agregados de proteínas pueden volverse tóxicos y pueden provocar un daño significativo a las células y al tejido. Se cree que esta toxicidad es uno de los factores contribuyentes que provocan y/o contribuyen a la patología de las enfermedades de agregación de proteínas.

Además, el procesamiento y plegamiento anómalos de una proteína vinculada a una enfermedad de agregación de proteínas puede comenzar décadas antes de que puedan observarse los síntomas externos de la enfermedad de agregación de proteínas (Jack *et al.*, 2010. *Lancet Neurol.* 9(1):119-28). Por tanto, en una realización preferida, se eliminan los amiloides y/u oligómeros, y/o se evita su formación en el paciente y/o animal como resultado de la administración de una cualquiera de las composiciones de la presente invención, preferiblemente cualquier composición, incluyendo composiciones farmacéuticas o nutricéuticas o complementos alimenticios. Además, en una realización preferida, los andrógenos C19 sulfatados tratan y/o previenen la proteotoxicidad en una enfermedad de agregación de proteínas, en la que la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson. El término "proteotoxicidad" se refiere a cualquier deterioro de la función celular provocado por el plegamiento erróneo de una proteína.

Al seleccionar como diana directamente la formación de agregados de proteínas, las composiciones de la presente invención son capaces de tratar y/o prevenir una enfermedad de agregación de proteínas en pacientes y/o animales que están en los estadios tempranos de una enfermedad de agregación de proteínas pero aún no muestran ningún síntoma externo, en donde la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson. Además, las composiciones de la presente invención también tratan los estadios avanzados de una enfermedad de agregación de proteínas, en donde la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

En una realización preferida, el paciente y/o animal han experimentado los cambios fisiopatológicos que provocan la agregación de proteínas, pero aún no han alcanzado el estadio de la enfermedad donde pueden observarse síntomas externos. Dicho de otro modo, el paciente y/o animal está en un estadio temprano de la enfermedad. El término "síntoma externo" se refiere a cualquier síntoma que pueda ser observado por un médico usando cualquier procedimiento no invasivo.

En una realización preferida, los andrógenos C19 sulfatados ralentizan la progresión de una enfermedad de agregación de proteínas, en donde la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, inhibiendo la formación de agregados de proteínas y/o los andrógenos C19 sulfatados retrasan la aparición de una enfermedad de agregación de proteínas inhibiendo la formación de agregados de proteínas.

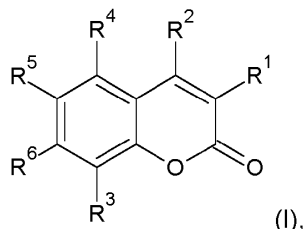
Por tanto, la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

En una realización preferida, la enfermedad de agregación de proteínas se selecciona de una lista que consiste en enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson y los andrógenos C19 sulfatados de la presente invención se seleccionan de la lista que consiste en sulfato de testosterona (TS) o sulfato de epitestosterona (ES). Más preferiblemente, dichos andrógenos C19 sulfatados están en forma de una composición farmacéutica o nutricéutica o en forma de complementos alimenticios.

En una realización preferida, la enfermedad de agregación de proteínas es una enfermedad de agregación de proteínas localizada en el sistema nervioso central, una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. El término "*enfermedad neurodegenerativa*" se refiere a cualquier trastorno caracterizado por la pérdida progresiva de estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una enfermedad de agregación de proteínas y un ejemplo de una enfermedad neurodegenerativa.

Realizaciones combinadas de inhibidores de sulfatasa y enfermedades de agregación de proteínas

En una realización preferida, la presente invención se refiere a una combinación de los andrógenos C19 sulfatados de la presente invención, sulfato de testosterona (TS) o sulfato de epitestosterona (ES), y un inhibidor de sulfatasa seleccionado de la lista que consiste en 2-(hidroxifenil) indol sulfato, 5-androsteno-3 β , DU-14, 17 β -diol-3 sulfato, E1-MTP, EMATE, COUMATE, STX64, KW-2581, STX213, morfolina, ARN de silenciamiento y anticuerpo específico contra la enzima STS; o el inhibidor de sulfatasa de fórmula (I):



en la que:

(a) R₁-R₆ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno (flúor, cloro, bromo, yodo o astatina), hidroxilo, sulfamato (OSO₂NH₂), alquilo y sales de los mismos;

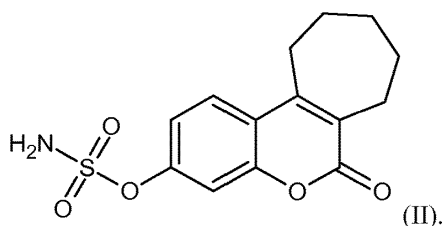
(b) al menos uno de R₁-R₆ es un grupo sulfamato; y

dos o más de R₁-R₆ se unen entre sí para formar una estructura cíclica adicional; y

para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad de agregación de proteínas, seleccionada de una lista que consiste en enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

En una realización preferida, el inhibidor de sulfatasa es STX64 (es decir, el compuesto de fórmula (II) tal como se describe en el documento WO2019/243453) y la combinación es para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad de agregación de proteínas seleccionada de una lista que consiste en enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. En una realización preferida, el inhibidor de sulfatasa es STX64 y la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Alzheimer. En una realización preferida, el inhibidor de sulfatasa es STX64 y la enfermedad de agregación de proteínas es la enfermedad de Parkinson.

Cabe señalar que el inhibidor de sulfatasa de fórmula (II) tal como se describe en el documento WO2019/243453 (STX64) es el compuesto de fórmula:



Incluyendo cualquier sal del mismo, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Composiciones farmacéuticas

En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica que comprende además, opcionalmente, un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición farmacéutica puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento también puede contener otras sustancias. Estas sustancias incluyen, pero no se limitan a, crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de carga, antioxidantes, y agentes estabilizantes. En algunas realizaciones, puede liofilizarse la composición farmacéutica.

El término “*crioprotector*”, tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a las composiciones frente a estrés inducidos por congelación. Los crioprotectores también pueden ofrecer protección durante el secado primario y secundario y el almacenamiento de producto a largo plazo. Los ejemplos no limitativos

de crioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, manosa, y lactosa; polímeros, tales como dextrano, hidroxietil-almidón y polietilenglicol; tensioactivos, tales como polisorbatos (por ejemplo, PS-20 o PS-80); y aminoácidos, tales como glicina, arginina, leucina, y serina. Generalmente se usa un crioprotector que presenta baja toxicidad en sistemas biológicos.

En una realización, se añade un lioprotector a una composición farmacéutica descrita en el presente documento. El término "*lioprotector*", tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a las composiciones durante el procedimiento de secado por congelación o deshidratación (ciclos de secado por congelación primario y secundario). Esto ayuda a minimizar la degradación del producto durante el ciclo de liofilización, y mejorar la estabilidad del producto a largo plazo. Los ejemplos no limitativos de lioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido, tal como glutamato de monosodio, glicina o histidina no cristalina; una metilamina, tal como betaína; una sal liotrópica, tal como sulfato de magnesio; un poliol, tal como alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic; y combinaciones de los mismos. La cantidad de lioprotector añadida a una composición farmacéutica es generalmente una cantidad que no conduce a una cantidad inaceptable de degradación cuando se liofiliza la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, se incluye un agente de carga en la composición farmacéutica. El término "*agente de carga*", tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan la estructura del producto secado por congelación sin interactuar directamente con el producto farmacéutico. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden conferir cualidades útiles con respecto a modificar la temperatura de colapso, proporcionar protección frente a congelación-descongelación, y potenciar la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. Los ejemplos no limitativos de agentes de carga incluyen manitol, glicina, lactosa, y sacarosa. Los agentes de carga pueden ser cristalinos (tales como glicina, manitol, o cloruro de sodio) o amorfos (tales como dextrano, hidroxietil-almidón) y se usan generalmente en formulaciones en una cantidad desde el 0,5 % hasta el 10 %.

Otros portadores, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980) o Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22^a edición, Pharmaceutical press (2012), ISBN-13: 9780857110626 también pueden incluirse en una composición farmacéutica descrita en el presente documento, siempre que no afecten de manera adversa a las características deseadas de la composición farmacéutica.

Para las composiciones farmacéuticas sólidas, pueden usarse portadores sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares de calidad farmacéutica. Para la disolución para inyección, la composición farmacéutica puede comprender además crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de carga, antioxidantes, agentes estabilizantes y portadores farmacéuticamente aceptables. Para la administración en aerosol, las composiciones farmacéuticas se administran generalmente en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propelente. Por supuesto, el tensioactivo no debe ser tóxico, y es generalmente soluble en el propelente. Son representativos de tales agentes los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen desde 6 hasta 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linoléico, olestérico y oleico con un alcohol polihidroxilado alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. Según se desee también puede incluirse un portador, tal como, por ejemplo, lecitina para administración intranasal. Para supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos.

En una realización preferida, la composición de la presente invención se prepara para administración oral, sublingual, bucal, intranasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y/o mediada por inhalación.

Cabe señalar que composiciones distintas de las composiciones farmacéuticas, incluyendo composiciones nutricéuticas o complementos alimenticios, también forman parte de la invención.

Administración

Las composiciones de la presente invención, incluyendo composiciones farmacéuticas o nutricéuticas o complementos alimenticios, pueden administrarse usando cualquier vía conocida por el experto. En una realización preferida, la composición de la presente invención se administra por vía transdérmica, sublingual, intravenosa, intranasal, intracerebroventricular, intraarterial, intracerebral, intramuscular, intraperitoneal, oral o mediante inhalación.

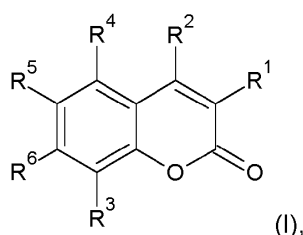
En una realización preferida, la composición de la presente invención se administra por vía transdérmica, sublingual, intravenosa, intraperitoneal, oral o mediante inhalación. Cuando la composición se administra mediante inhalación, la composición puede aerosolizarse y administrarse mediante, por ejemplo, una máscara de anestesia.

En una realización preferida, la composición de la presente invención se administra por vía transdérmica, sublingual,

intravenosa, subcutánea, oral o mediante inhalación. Preferiblemente, la composición se administra por vía oral o sublingual.

En una realización preferida, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los andrógenos C19 sulfatados de la presente invención, sulfato de testosterona (TS) o sulfato de epitestosterona (ES). El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de andrógenos C19 sulfatados de la presente invención, sulfato de testosterona (TS) o sulfato de epitestosterona (ES), en una composición que tiene un efecto terapéutico y que es capaz de tratar y/o prevenir una enfermedad de agregación de proteínas.

En una realización preferida, la composición se usa en una terapia de combinación con cualquier otro tratamiento o terapia usados habitualmente para tratar y/o prevenir una enfermedad de agregación de proteínas. En una realización preferida, la composición se usa en una terapia de combinación con un inhibidor de sulfatasa seleccionado de la lista que consiste en 2-(hidroxifenil) indol sulfato, 5-androsteno-3 β , DU-14, 17 β -diol-3 sulfato, E1-MTP, EMATE, COUMATE, STX64, KW-2581, STX213, morfolina, ARN de silenciamiento y un anticuerpo específico contra la enzima STS; o el inhibidor de sulfatasa de fórmula (I):



en la que

(a) R₁-R₆ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno (flúor, cloro, bromo, yodo o astatina), hidroxilo, sulfamato (OSO₂NH₂), alquilo y sales de los mismos;

(b) al menos uno de R₁-R₆ es un grupo sulfamato; y

dos o más de R₁-R₆ se unen entre sí para formar una estructura cíclica adicional.

En una realización preferida, el inhibidor de sulfatasa es STX64 (es decir, el compuesto de fórmula (II) tal como se describe en el documento WO2019/243453).

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse una vez o más de una vez. Un experto en la técnica será capaz de determinar el régimen de dosificación más eficaz para el paciente. Por ejemplo, el régimen de dosificación más eficaz puede ser uno en el que al paciente se le administra la composición dos veces al día, una vez al día, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez al mes, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses o una vez al año.

Los siguientes ejemplos ilustran simplemente la presente invención, pero no limitan la misma.

Ejemplos

Identificación de sul-2 como regulador de longevidad

Descifrar nuevos elementos que gobiernan el control genético del envejecimiento es clave para mejorar la comprensión de este intrincado proceso biológico y mejorar la esperanza de vida saludable humana. Con este objetivo, se aislaron mutantes termotolerantes de *Caenorhabditis elegans* y se identificó un alelo pv17 del gen sul-2, que codifica para uno de los tres miembros de la familia8 de sulfatasas de *C. elegans*.

Los gusanos que portaban o bien el alelo aislado (pv17) o el alelo nulo (gk187) de sul-2 vivían más tiempo que el tipo natural, aunque el alelo gk187 mostró una curva bimodal con una subpoblación que tenía una mortalidad temprana (figuras 1a-b y figura 5a). En general para el alelo pv17, la frecuencia de bombeo y la movilidad durante el envejecimiento disminuyeron de manera similar o más lenta que el tipo natural, lo que sugiere una esperanza de vida más saludable (figuras 5d-e). La delección de los otros dos genes de sulfatasas, sul-1 y sul-3, no aumentó la esperanza de vida, lo que indica que la sulfatasa sul-2 desempeña un papel principal en la regulación de la longevidad (figura 5f). Las mutaciones en sul-2 también potenciaron los fenotipos de desarrollo de mutantes en el receptor daf-2 del factor de crecimiento similar a insulina (IGF)/insulina (figuras 5g-i), que se usó para el cartografía e identificación génica. El alelo pv17 introduce una sustitución de un único aminoácido (G46D) que da como resultado una reducción del fenotipo de función. La secuencia depurada difiere ligeramente de la publicada (figura 6).

sul-2 codifica para una sulfatasa de hormonas esteroideas

Las sulfatasas son una gran familia de proteínas implicadas en diferentes procesos biológicos y con una amplia gama de sustratos. La colocación de sul-2 depurada en el árbol filogenético de sulfatasas es incierta, pero cuando se compara con sulfatasas de mamífero, la sul-2 se agrupa más cercana a las arilsulfatasas de tipo H, F, E, D y la sulfatasa esteroidea de tipo C (figura 1c) que probablemente se originaron a partir de un gen progenitor común. sul-1 y sul-3 pertenecen a una familia diferente de sulfatasas (figura 1c). Se supuso que sul-2 puede ejercer su actividad modificando hormonas esteroideas sulfatadas. Las hormonas esteroideas sulfatasas son proteínas conservadas que participan, entre otros procesos, en la estimulación de la proliferación en cánceres dependientes de hormonas. Se han generado inhibidores específicos para este tipo de enzimas, tal como STX6410, que se ha usado para tratar pacientes con cánceres dependientes de hormonas. Se trataron animales de tipo natural con STX64 y se observó un aumento en la longevidad (figura 1d y figuras 7a-c). El tratamiento con STX64 también produce fenocopias de otros fenotipos de mutantes de sul-2 (figura 7d). STX64 no aumenta adicionalmente la longevidad de mutantes con delección de sul-2, sugiriendo que STX64 aumenta la longevidad inhibiendo la actividad sulfatasa de SUL-2 (figura 1d).

Se midieron los niveles de hormonas esteroideas sulfatadas mediante una HPLC-TOF-MS de alta resolución en el mutante de sul-2 y se halló una proporción más alta de hormonas sulfatadas en esta cepa en comparación con gusanos de tipo natural (figura 1e). Todos estos datos sugieren que SUL-2 puede actuar como una hormona esteroidea sulfatasa y regula la longevidad a través de la alteración del estado sulfatado de una o varias hormonas esteroideas. La longevidad aumentada de sul-2 depende de genes que median en la longevidad gonadal. Para investigar si sul-2 actúa en una ruta de longevidad conocida, se realizaron estudios de interacción genética con alelos conocidos que afectan a la longevidad. Las mutaciones en el receptor de IGF daf-2 aumentan la esperanza de vida a través del factor de transcripción DAF-16/FOXO12. Las mutaciones de sul-2 prolongan además la esperanza de vida de la reducción de daf-2 de mutantes de función (figura 2a, figuras 8a-b), lo que sugiere que sul-2 actúa en una ruta diferente para regular la longevidad. Sin embargo, la longevidad aumentada de los mutantes de sul-2 se suprime principalmente por la pérdida de función de DAF-16 (figura 2b y figuras 8c-d). La longevidad conferida por la falta de línea germinal también requiere DAF-1612, 13, que se transloca a los núcleos principalmente en células intestinales. Sin embargo, en mutantes de señalización de insulina, DAF-16 se localiza en el núcleo de la mayoría de las células. En mutantes de sul-2, DAF-16 se localiza predominantemente en núcleos intestinales (figuras 9a-b), sugiriendo un papel para sul-2 en la longevidad mediada por la línea germinal. Otros factores esenciales para la longevidad mediada por la línea germinal, tales como la proteína de repetición de anquirina intestinal KRI-1/KRIT-1 y el factor de elongación de transcripción TCER-1/TCERG1 también son necesarios para una longevidad completamente aumentada de mutantes de sul-2, aunque se observa un efecto leve con el receptor de hormona nuclear NHR-80 y no se observó ningún efecto en NHR-49, que también son necesarios para la longevidad mediada por la línea germinal (figuras 2c-f y figuras 8e-g). Además, la delección de sul-2 tiene poco efecto sobre la longevidad de las mutantes sin línea germinal glp-1 o mes-1 longevidad18 (figuras 2g-h); sin embargo, se observa un efecto aditivo en la reducción del alelo de función pv17 en un trasfondo genético de glp-1 (figura 8h), que puede sugerir algún efecto adicional de la proteína mutada.

Todos estos datos sugieren que sul-2 media en la señalización de la gónada para regular la longevidad. Curiosamente, las mutaciones de sul-2 no afectan a la fertilidad, la edad reproductiva o la morfología de las gónadas (figuras 2i-j y figuras 9c-e). Tomados en conjunto, los hallazgos de la presente invención sugieren que sul-2 afecta a una señal que regula la longevidad para ajustar la esperanza de vida al estado reproductivo sin afectar a la función gonadal. De manera similar a la ablación de la línea germinal, también se observa que los mutantes de sul-2 aumentan adicionalmente la longevidad en la restricción dietética, lo que sugiere que sul-2 no está implícito en esta intervención que afecta a la longevidad (figura 2k). En animales sin línea germinal, la activación del receptor nuclear DAF-12 por esteroides similares a ácidos biliares denominados ácidos dafacrónicos (DA) desencadena un aumento en la longevidad 20. Se observó que daf-12 también es necesario para el aumento de la longevidad de los mutantes de sul-2 (figura 2l y figura 8i), lo que indica que la inactivación de sul-2 provoca la alteración del conjunto de hormonas esteroideas sulfatadas, generando una señal anterior de DAF-12 que imita las señales de longevidad de los animales con gónadas extirpadas. DAF-36 convierte el colesterol en 7-deshidrocolesterol en la primera etapa de la ruta biosintética de Δ^7 -DA21, 22. Por tanto, DAF-36 también es necesario para el aumento de la longevidad de los animales23 sin línea germinal. De manera similar, DAF-36 es necesario para la longevidad conferida por el inhibidor de sulfatasa esteroidea STX64 (figura 2m) colocando la señal generada por hormonas esteroideas sulfatadas antes o en paralelo a la biosíntesis de los DA.

sul-2 se expresa en neuronas sensitivas

Se ha estudiado la ubicación anatómica de la expresión de sul-2 de una matriz extracromosómica y en cepas transgénicas de inserción de una sola copia. Se encontró que sul-2 se expresa sólo en unas pocas neuronas sensitivas, principalmente en ADF y ASE de anfidios, y fasmidos PHA y PHB. No hay expresión detectable en la línea germinal en ninguna cepa transgénica (figura 2n y figuras 10, 11a-b). Las neuronas ASE son responsables de la respuesta atractiva de Na⁺ y Cl⁻, entre otras. Los defectos en la detección de olores afectan a la longevidad. Por tanto, se ha sometido a prueba la capacidad de los mutantes de sul-2 para responder a Cl⁻ o Na⁺ y no se encontraron diferencias en comparación con los animales de tipo natural (figuras 11c-d). Además, la mutación de

sul-2 aumenta la longevidad de daf-10(m79), un mutante de larga esperanza de vida defectuoso en la formación de cilios sensoriales (figura 11e). Estos resultados muestran que el fenotipo de longevidad observado en mutantes de sul-2 no se debe a la funcionalidad deteriorada de las neuronas sensitivas. La reducción de sul-2 mejora las enfermedades asociadas con el envejecimiento en *C. elegans*. El envejecimiento se considera el principal factor de riesgo para la aparición de trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Parkinson, Huntington, o Alzheimer. Estos trastornos son provocados por la disminución progresiva de la proteostasis, lo que da como resultado la agregación de proteínas que compromete las funciones celulares y finalmente provoca la muerte celular. *C. elegans* deficiente en línea germinal retrasa los síntomas derivados de la proteotoxicidad de β -amiloide (β A) humano expresado ectópicamente. Se sometió a prueba si las mutaciones de sul-2 o el tratamiento con STX64 mejoran los síntomas de los modelos de *C. elegans* para enfermedades neurodegenerativas. En un modelo de enfermedad de Parkinson de *C. elegans*, en el que la expresión de α -sinucleína humana en células musculares provoca parálisis dependiente de la edad, la mutación de sul-2 o el tratamiento con STX64 mejoró significativamente la movilidad (figuras 3a-b, figuras 12a-c).

La pérdida de función de SUL-2 disminuyó el número de agregados de α -sinucleína (figuras 12d-e), lo que sugiere una mejor manipulación de los agregados de proteínas en gusanos con actividad sulfatasa esteroidea reducida. Para someter a ensayo adicionalmente el efecto neuroprotector de la actividad reducida de sul-2, se sometió a ensayo una cepa que expresa α -sinucleína en neuronas dopaminérgicas. En este modelo, las neuronas dopaminérgicas marcadas con GFP mueren debido a la toxicidad de α -sinucleína. Por consiguiente, los mutantes de sul-2 mostraron supervivencia neuronal aumentada en comparación con gusanos de control, lo que indica una acción neuroprotectora de la actividad hormona esteroidea sulfatasa reducida (figuras 3c-d). En un modelo neurodegenerativo de Huntington que expresa repeticiones de poliglutamina fusionadas con YFP, un constructo que se agrega en gusanos adultos, se halló que tanto la mutación de sul-2 como el tratamiento con STX64 redujeron el número de agregados (figuras 3e-f). También se sometieron a ensayo dos cepas diferentes de la enfermedad de Alzheimer (EA) en gusanos, donde la inmovilidad está provocada por la expresión de la proteína β A en células musculares. Por consiguiente, la mutación de sul-2 y el tratamiento con STX64 retrasaron la parálisis (figuras 3g-h y figuras 12f-g). Todos estos datos muestran que la inhibición de sul-2 protege al nematodo contra la proteotoxicidad relacionada con el envejecimiento.

Reducción de actividad de sul-2 mejora el Alzheimer en un modelo de mamífero

Como STX64 mejoró la neurodegeneración en modelos de *C. elegans*, se sometió a ensayo el efecto de este fármaco en las alteraciones cognitivas provocadas por la infusión de oligómeros de β A intrahipocámpicos, un modelo de mamífero con EA aguda (figura 3i). Previamente, se ha descrito que la administración local de DU-14, un inhibidor de hormonas esteroideas sulfatasas, podría aliviar la pérdida de memoria provocada por la administración intrahipocámpica de oligómeros de β A en un modelo de mamífero. Se observó que los tratamientos tanto locales como sistémicos con STX64 revirtieron las deficiencias cognitivas, medidas por la prueba de evitación pasiva, provocadas por la administración intrahipocámpica de oligómeros de β A (figura 3j). Para evaluar el efecto del tratamiento oral con STX64 sobre la patología amiloide en un modelo de ratones con EA crónica, se evaluó el efecto de 3-4 semanas de tratamiento oral con STX64 sobre la deposición de amiloide en la neocorteza (la corteza cerebral y el hipocampo) de ratones APP-PS1 de >15 meses de edad (figura 4k). A esta edad correspondiente a una etapa tardía de la deposición de amiloide en la neocorteza del modelo APP218 PS1, el análisis de la densidad y el tamaño de la placa de β A reveló una reducción significativa, excepto por el tamaño de la placa en el hipocampo, en ratones tratados con STX64. Además, el área inmunorreactiva de β A se reduce en ambos tejidos (figuras 4k-n). Curiosamente, cuando se compara la deposición de β A en ratones APP-PS1 viejos (>15 meses de edad) tratados con STX64 con la evolución temporal normal de la deposición de amiloide en ratones APP-PS1 no tratados, se observó que STX64 reduce la deposición de β A en ratones APP-PS1 de más de 15 meses en comparación con la observada en ratones APP-PS1 de 10-12 meses de edad (figura 4o). Todos estos resultados indican que el tratamiento con STX64 en ratones APP-PS1 reduce la deposición de β A. Los inventores se preguntan si esta mejora histológica se correlacionó con la mejora del déficit de comportamiento cognitivo. Para ello, se compararon las capacidades cognitivas en ratones APP-PS1 de más de 15 meses tratados con vehículo o STX64 durante 3-4 semanas. Mientras que los ratones APP-PS1 tratados con vehículo mostraron un déficit en la prueba de evasión pasiva (figura 4p), aquellos ratones tratados con STX64 revirtieron completamente las deficiencias cognitivas, alcanzando niveles similares a los ratones de tipo natural de <15 meses de edad. Todos estos resultados señalan que las alteraciones en el metabolismo de β A provocadas por STX64 reducen las deficiencias del comportamiento cognitivo inducidas por la acumulación de β A en modelos de ratones con EA aguda y crónica, lo que sugiere un potencial para STX64 como terapia farmacológica contra enfermedades neurodegenerativas.

Las hormonas androgénicas C19 sulfatadas recapitulan el efecto beneficio de la reducción de la actividad sul-2

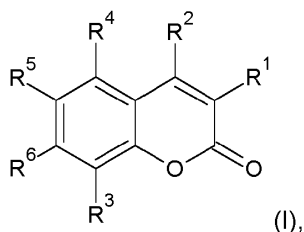
En mamíferos, se ha considerado desde hace tiempo que las hormonas sulfatadas son formas inactivas que funcionan principalmente como reservorios y son activadas por sulfatasas esteroideas⁶, aunque se ha observado una acción directa de las hormonas sulfatadas en el sistema reproductivo y nervioso. En este último tejido, esas hormonas se denominan neuroesteroides y su función principal es la modulación de la neurotransmisión. Con el fin de determinar si el efecto beneficioso de la inhibición de sul-2 se debe a la reducción de hormonas no sulfatadas o al

aumento de hormonas sulfatadas, se sometieron a ensayo las hormonas esteroideas sulfatadas disponibles comercialmente que están altamente presentadas en el mutante (tabla 1). Se observa que los andrógenos C19 sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS), sulfato de testosterona (TS) y sulfato de epitestosterona (ES) mejoraban la movilidad en el modelo de Parkinson de *C. elegans*, con un mejor resultado para ES (figura 4a). Se obtienen resultados similares en el modelo de Alzheimer con TS y ES, pero no con DHEAS (figura 4b y figura 13a). La DHEA no sulfatada o la testosterona no sulfatada no mostraron ningún efecto, ni el sulfato de pregnenolona, que pertenece al grupo C21 de hormonas esteroideas (figuras 4c-d). Estos resultados indican que al menos algunos andrógenos C19 sulfatados están implicados en el efecto protector contra enfermedades de agregación de proteínas y sugieren fuertemente que el efecto beneficioso de la inhibición de sul-2 se debe a los niveles aumentados de este tipo de hormonas. De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con el compuesto antiandrógeno abiraterona (Abi)36 no afectó a los animales de tipo natural, pero suprimió el efecto beneficioso de la mutación de sul-2 (figura 4e).

Luego se sometieron a prueba esas hormonas para determinar si también están implicadas en los otros fenotipos observados en el mutante de sul-2. El tratamiento con cualquiera de esas hormonas sulfatadas generó un aumento de la detención en fase L1 en un trasfondo genético de daf-2(e1370) tal como se observa en animales tratados con STX 64 o sul-2 (figura 13b). Curiosamente, el tratamiento con ES, pero no con TS ni DHEAS, aumentó la longevidad en un trasfondo genético de tipo natural y no aumentó adicionalmente la longevidad en trasfondos genéticos de mutantes de sul-2 (figuras 4f-g y figuras 13c-d), lo que indica que ambas intervenciones comparten el mismo mecanismo molecular. Por tanto, la adición de ES recapituló todos los fenotipos descritos para la inhibición de sul-2 y sugiriendo fuertemente que el efecto causante de la mutación de sul-2 se debe al aumento de las hormonas androgénicas C19 sulfatadas relacionadas con ES.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende andrógenos C19 sulfatados seleccionados del grupo que consiste en sulfato de testosterona (TS), o cualquier sal del mismo, o sulfato de epitestosterona (ES), o cualquier sal del mismo, en la que el andrógeno C19 sulfatado es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de proteotoxicidad en una enfermedad de agregación de proteínas, en la que la enfermedad de agregación de proteínas es enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
2. Composición que comprende andrógenos C19 sulfatados seleccionados del grupo que consiste en sulfato de testosterona (TS), o cualquier sal del mismo, o sulfato de epitestosterona (ES), o cualquier sal del mismo, en la que el andrógeno C19 sulfatado es para su uso en ralentizar la progresión de una enfermedad de agregación de proteínas inhibiendo la formación de agregados de proteínas y/o retrasar la aparición de una enfermedad de agregación de proteínas inhibiendo la formación de agregados de proteínas, en la que la enfermedad de agregación de proteínas es enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
3. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la composición se usa simultáneamente o posteriormente con un inhibidor de sulfatasa seleccionado de la lista que consiste en 2-(hidroxifenil) indol sulfato, 5-androsteno-3 β , DU-14 (N-[2-[4-[(aminosulfonil)oxi]fenil]etil]-tetradecanamida), COUMATE (4-metilcumarin-7-O-sulfamato), EMATE (estrone 3-O-sulfamato), o el inhibidor de sulfatasa de fórmula (I):



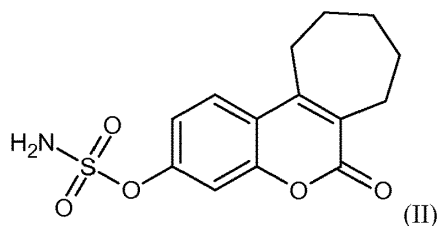
en la que:

R1-R6 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno (flúor, cloro, bromo, yodo o astatina), hidroxilo, sulfamato (OSO₂NH₂), alquilo y sales de los mismos;

al menos uno de R1-R6 es un grupo sulfamato; y

dos o más de R1-R6 se unen entre sí para formar una estructura cíclica adicional.

4. Composición para su uso según la reivindicación 3, en la que el inhibidor de sulfatasa es el compuesto STX64 de fórmula (II):



o cualquier sal del mismo.

5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición es una composición farmacéutica que comprende los andrógenos C19 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y opcionalmente un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición es una composición nutricional que comprende los andrógenos C19 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición es un complemento alimenticio que comprende los andrógenos C19 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición se administra por vía oral.

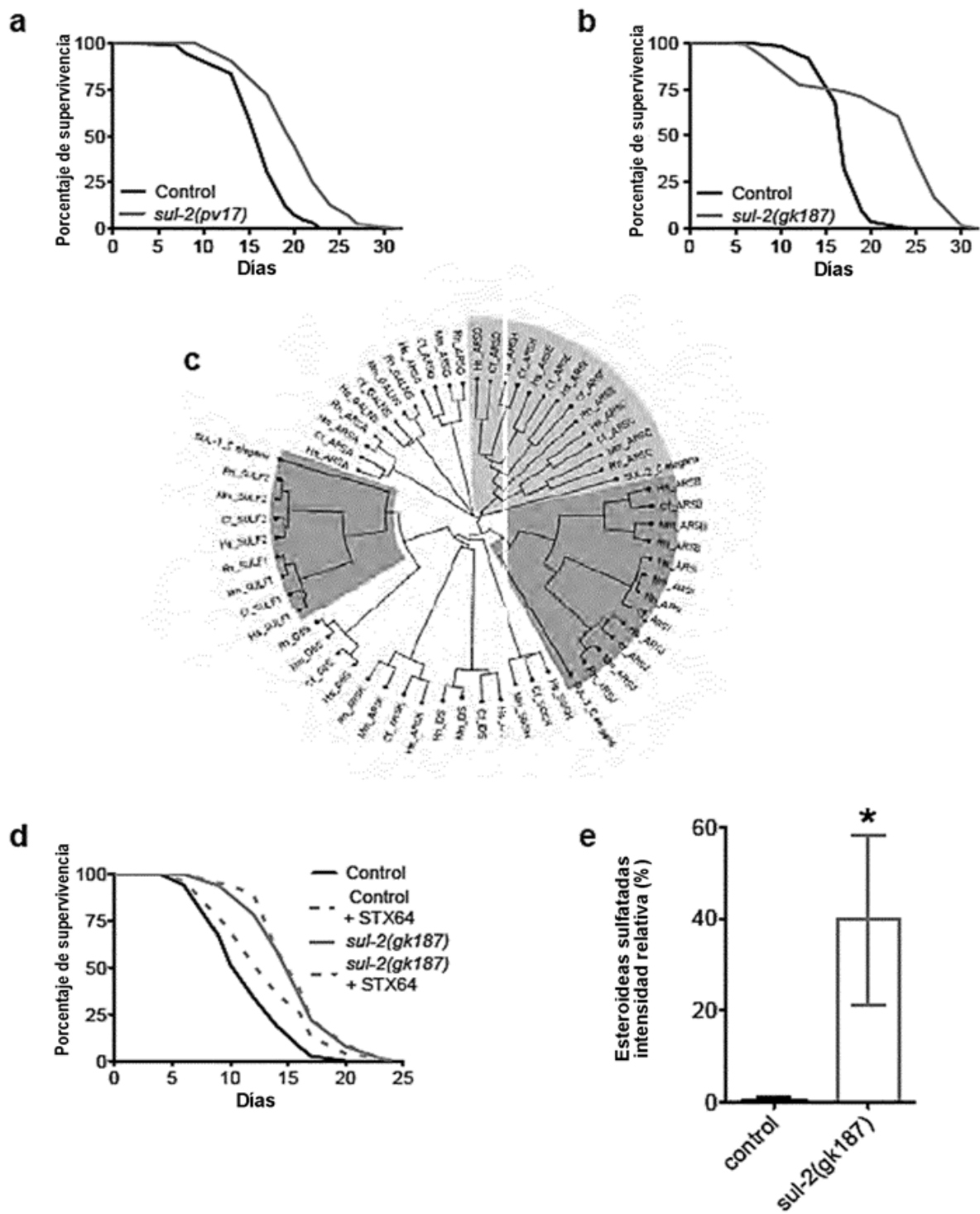


Fig. 1



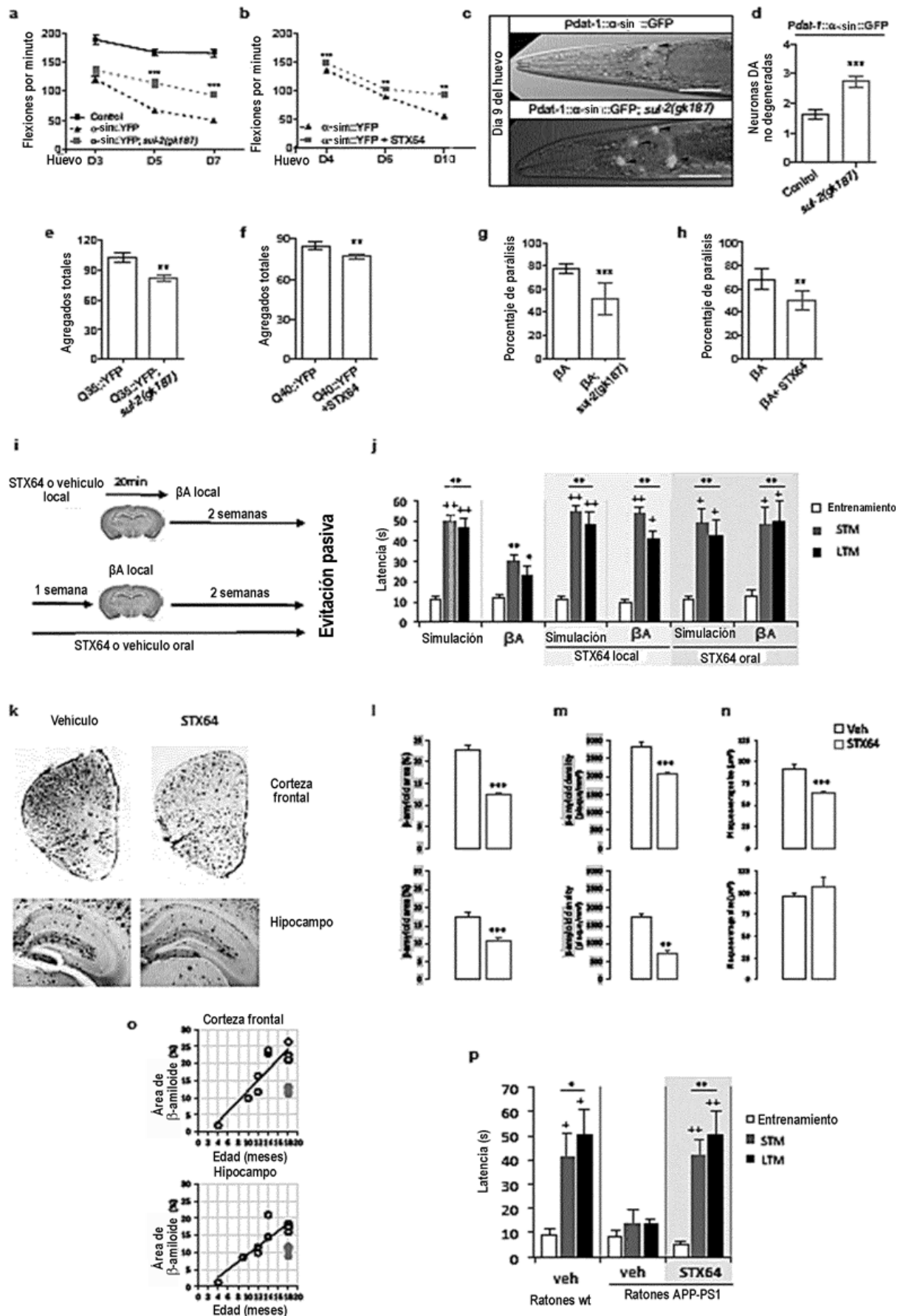


Fig. 3

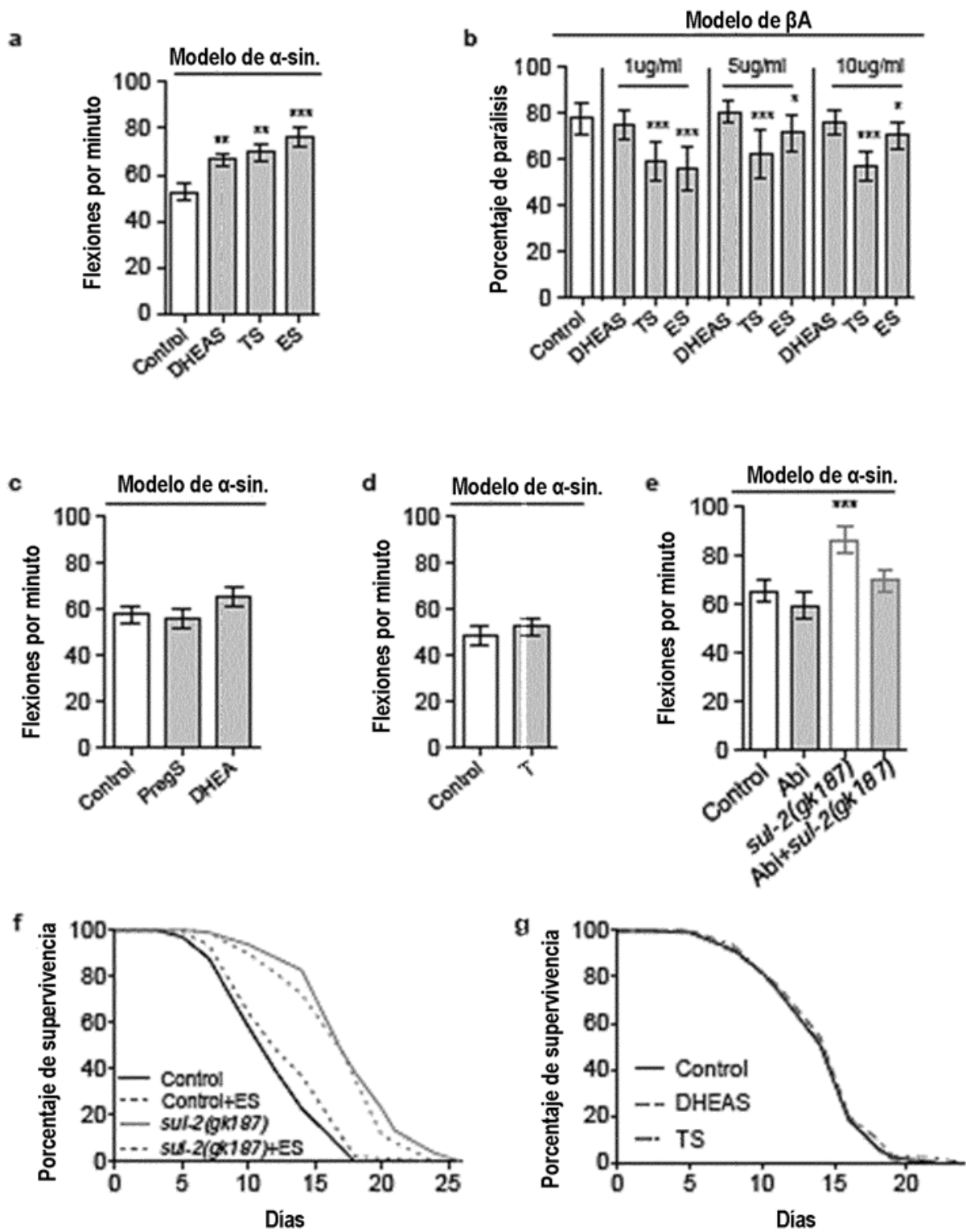


Fig. 4

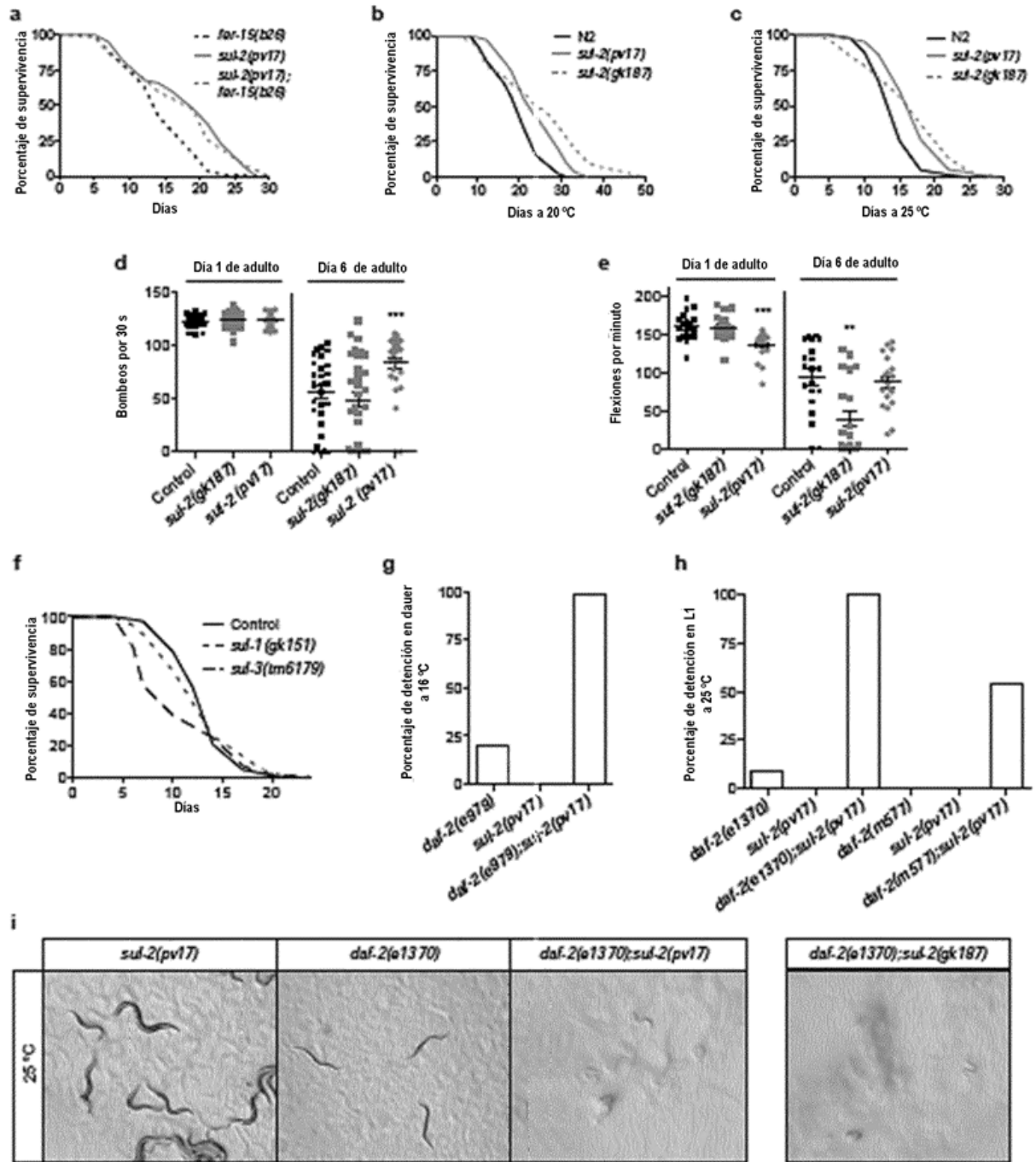


Fig. 5

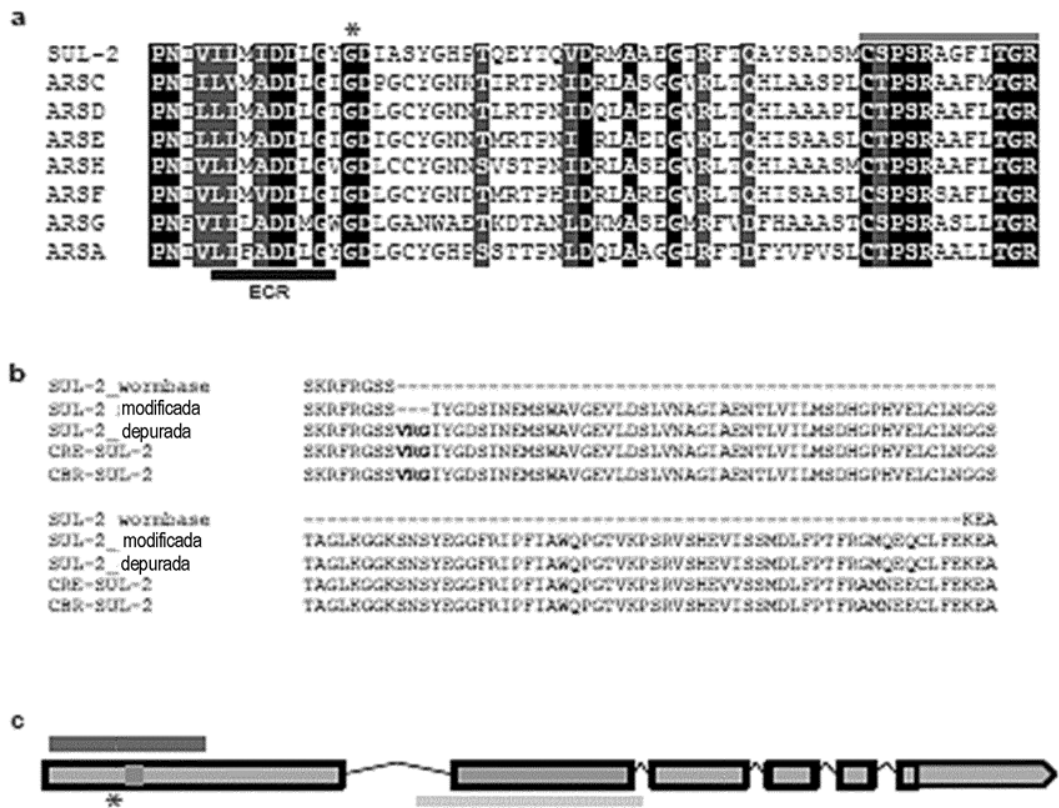


Fig. 6

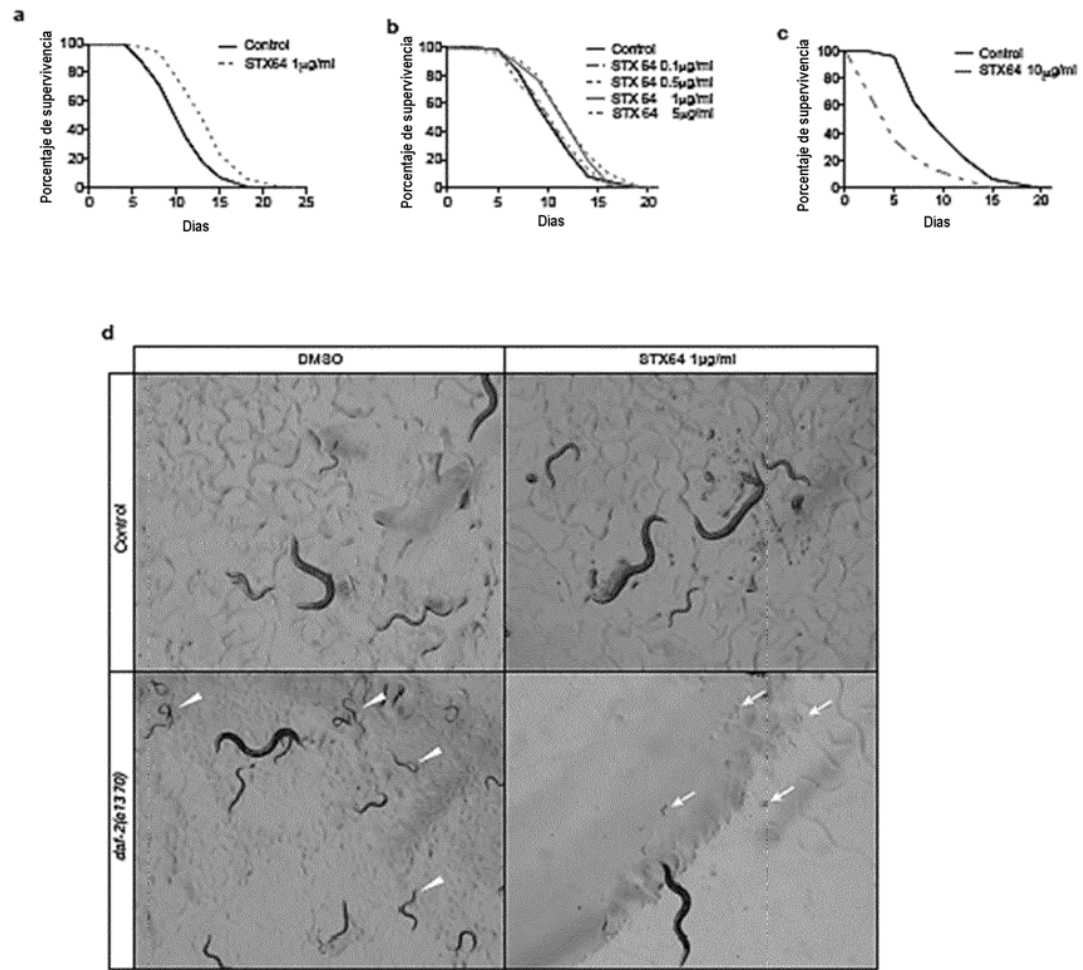


Fig. 7

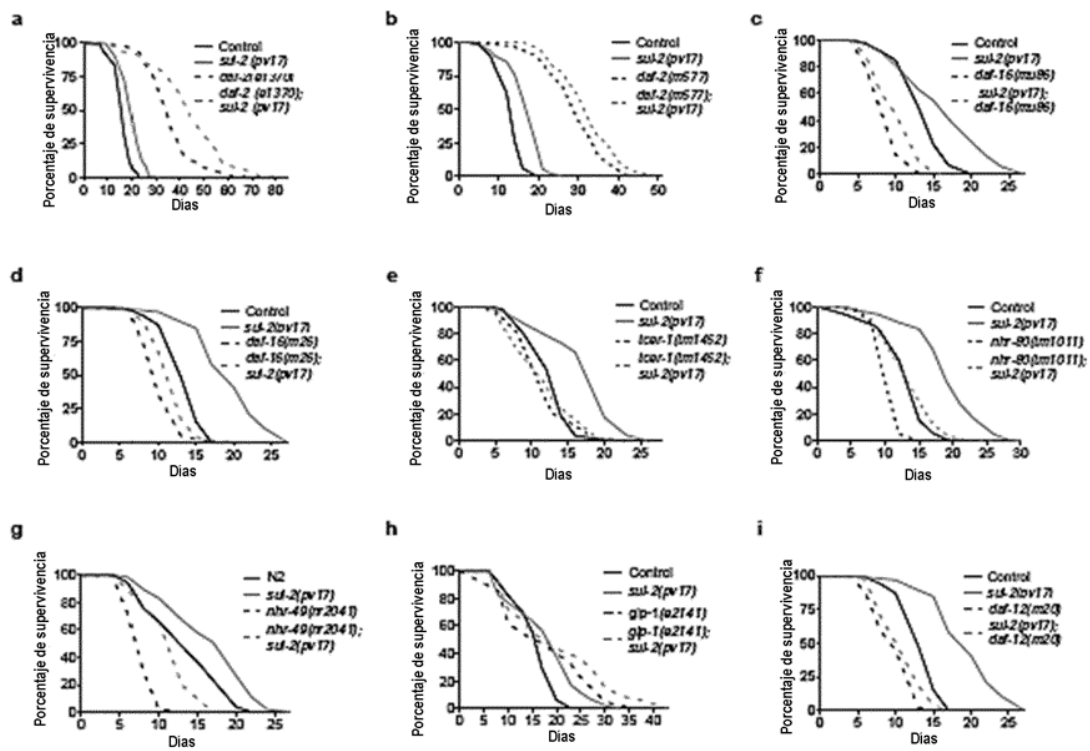


Fig. 8

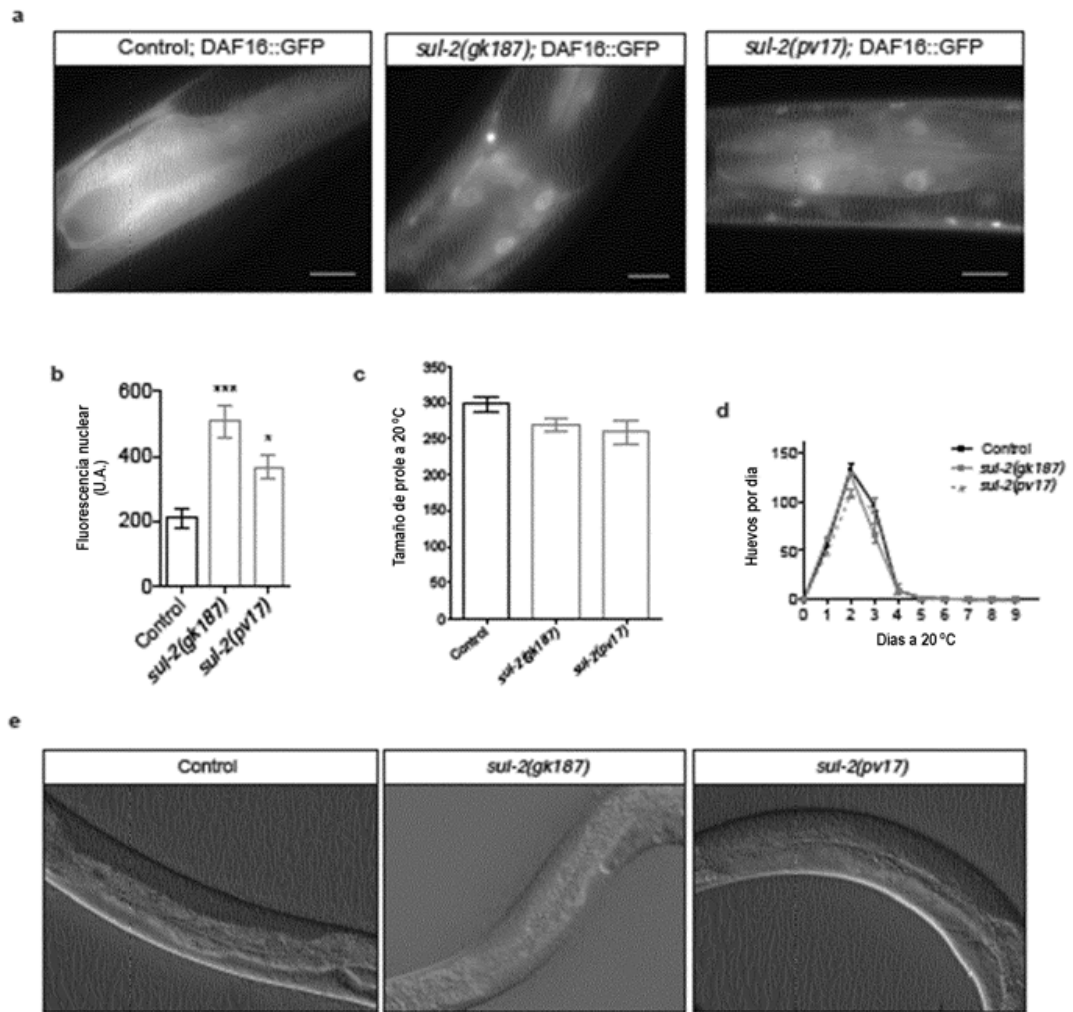


Fig. 9

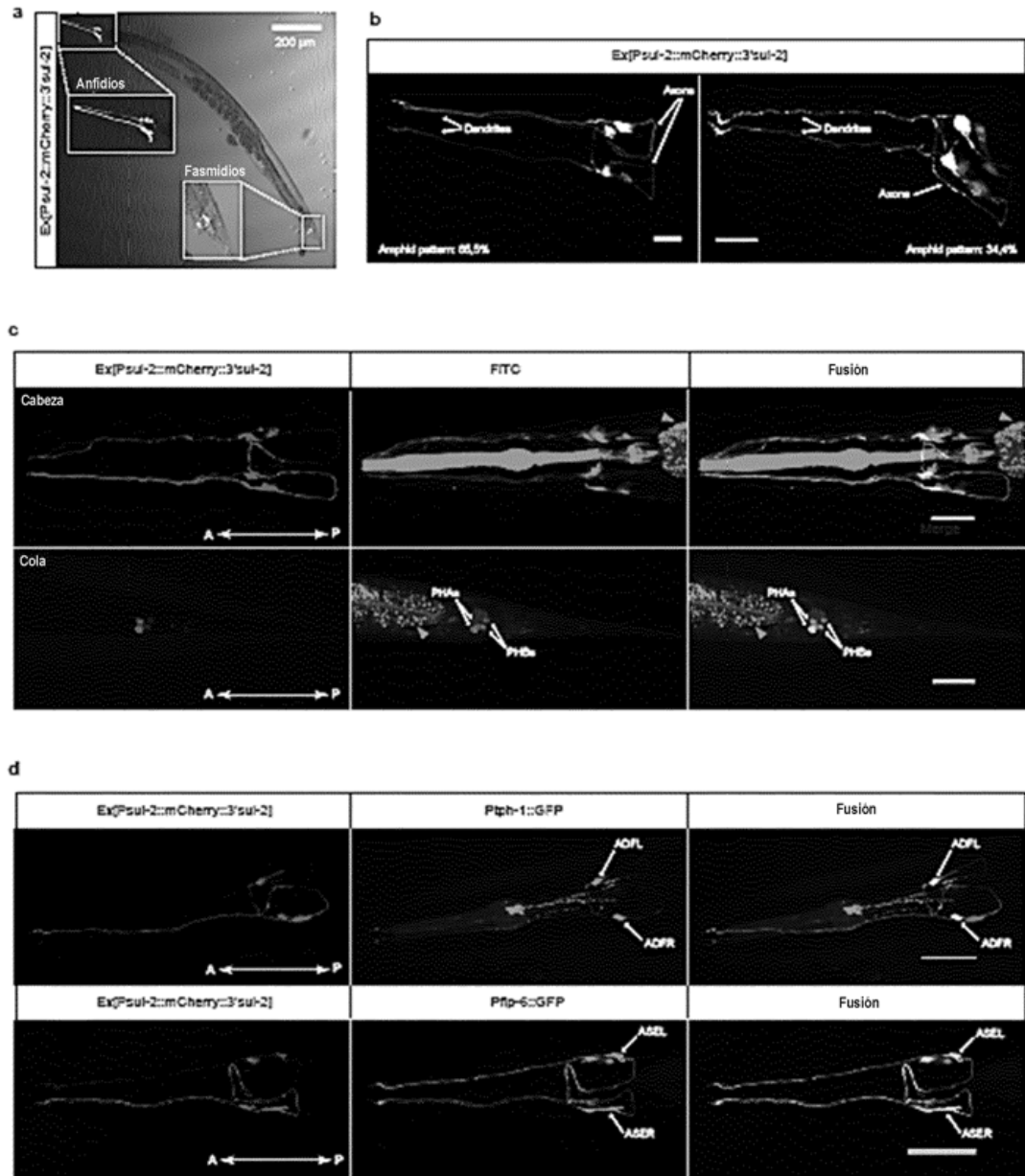


Fig.10

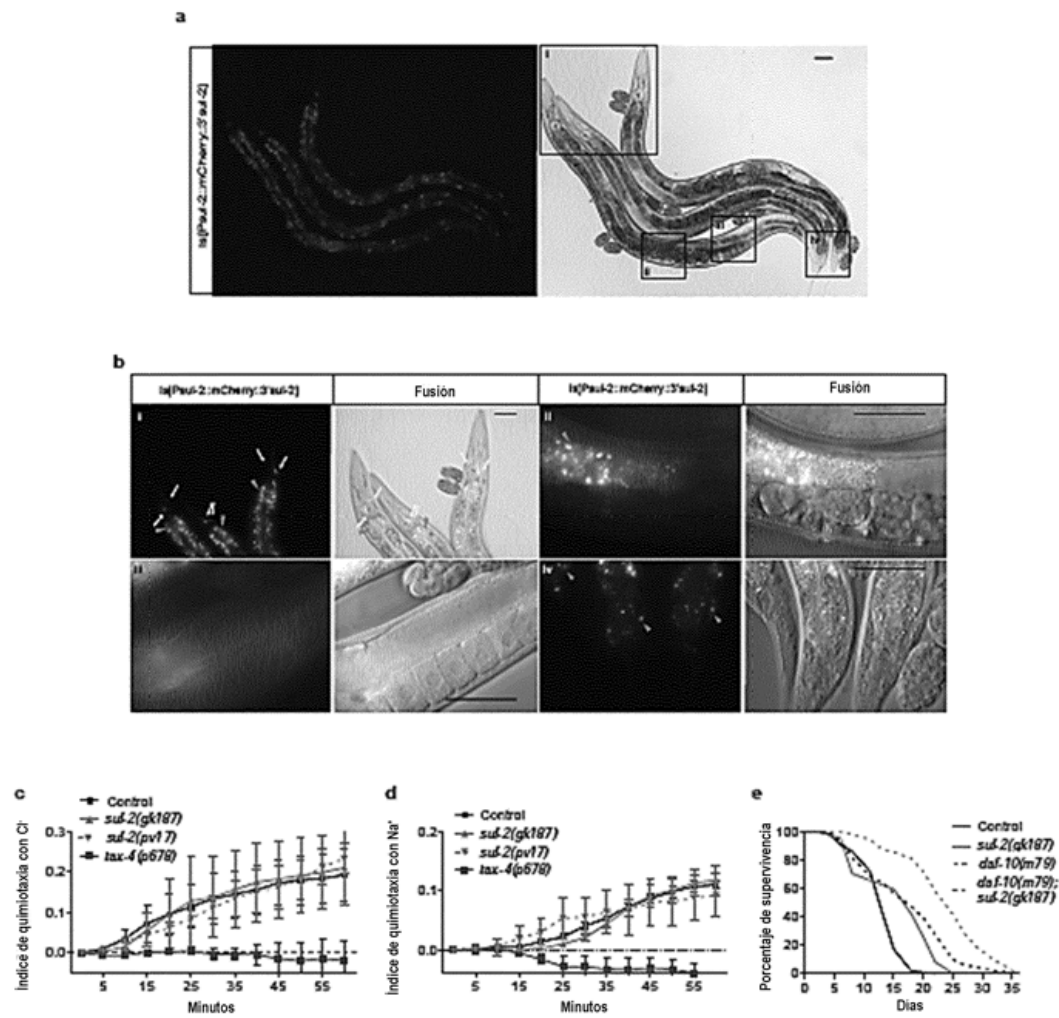


Fig. 11

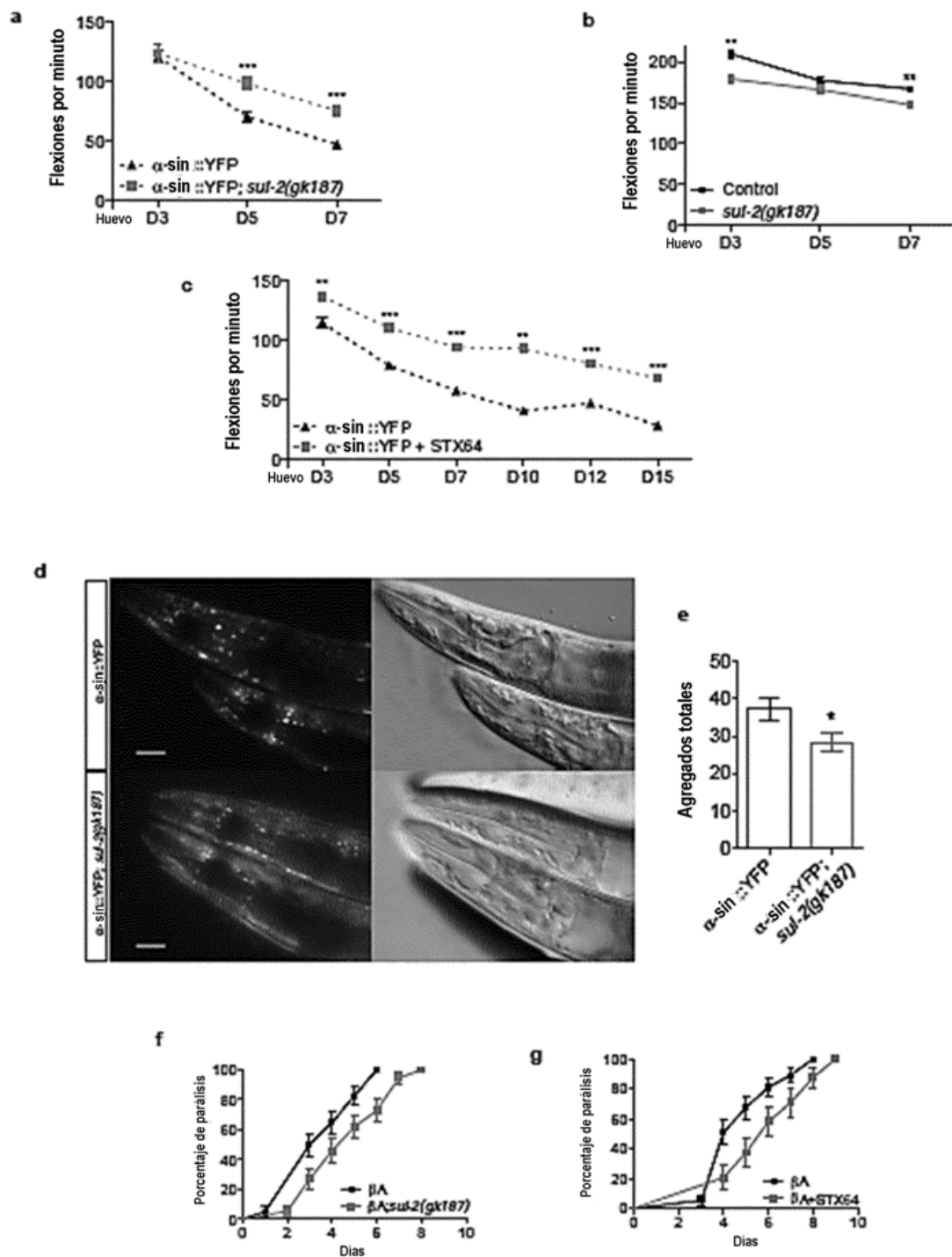


Fig. 12

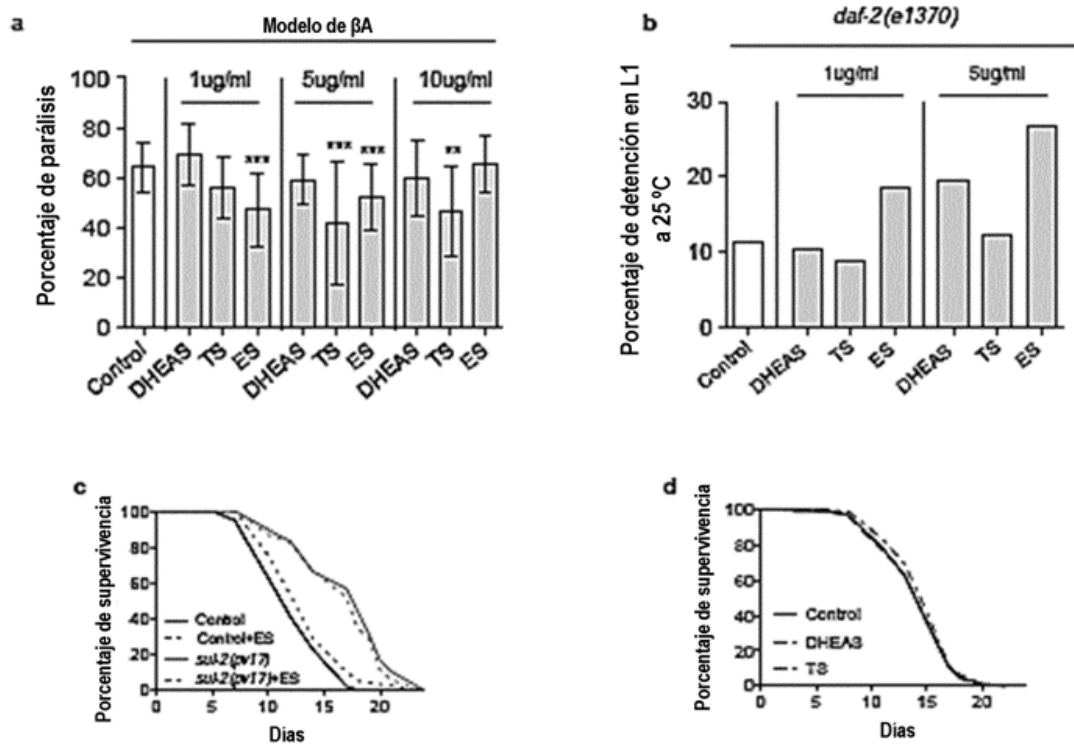


Fig. 13

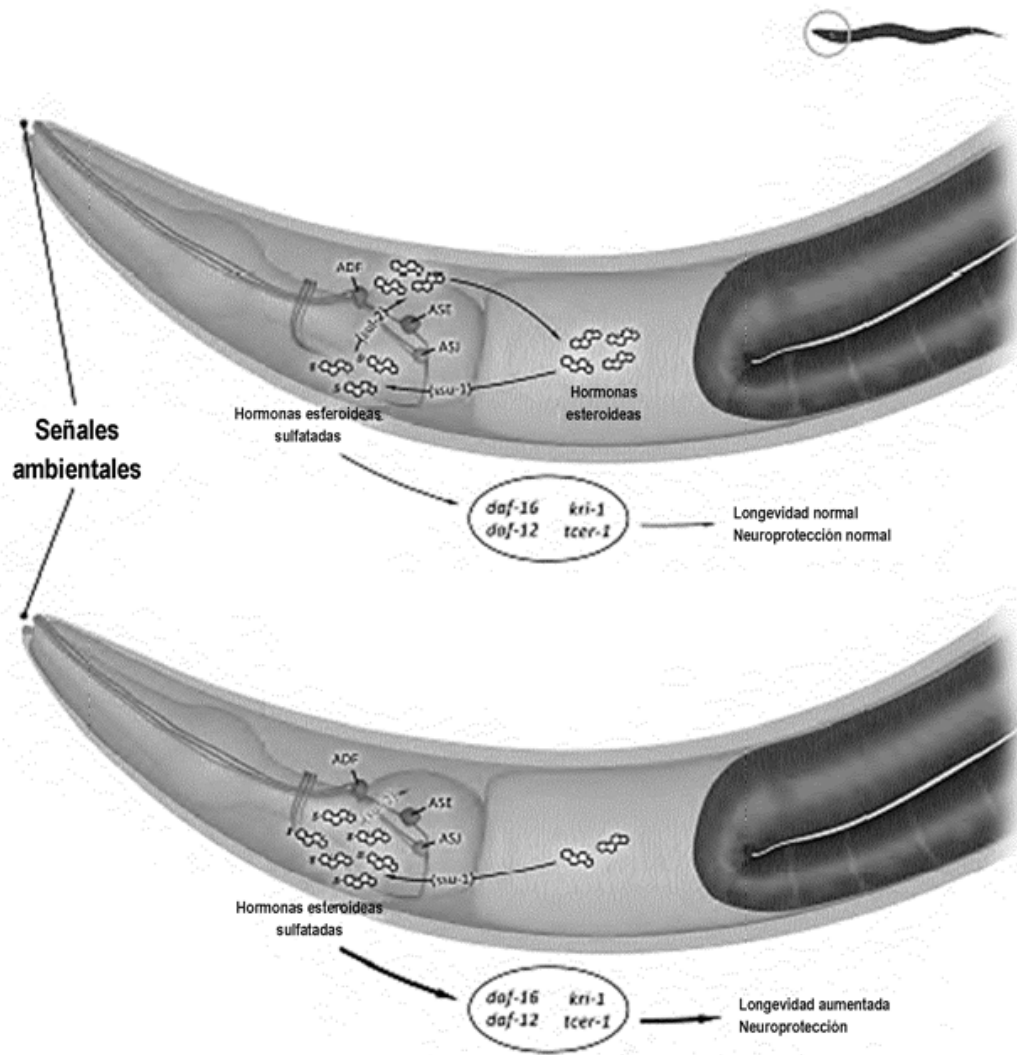
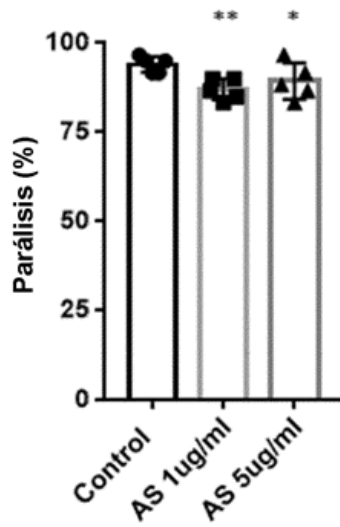


Fig. 14

Modelo de Alzheimer tratado con AS (sulfato de androsterona)

Cepa : GMC101

Fenotipo: Parálisis



5 réplicas biológicas

N>200 gusanos

Ji cuadrado bilateral (total n):

* ≤ 0.05

** ≤ 0.01

Fig. 15