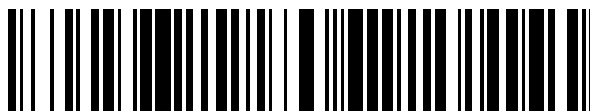


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 628**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/04** (2006.01)

**A61K 33/06** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 39/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2012 PCT/MX2012/000086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2012 E 12840653 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2756757**

54 Título: **Preparación y composiciones de azufre a cerovalencia con alta biodisponibilidad y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**14.09.2011 US 201161534585 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.02.2020**

73 Titular/es:

**NUEVAS ALTERNATIVAS NATURALES S.A. DE C.V. (100.0%)**  
**Rio Grijalva No. 208, Col. Mitras Norte**  
**Monterrey, Nuevo Leon C.P 64320, MX**

72 Inventor/es:

**GOJÓN ROMANILLOS, GABRIEL y**  
**GOJÓN ZORRILLA, GABRIEL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 739 628 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

Preparación y composiciones de azufre a cerovalencia con alta biodisponibilidad y usos de las mismas

5 **Antecedentes de la invención**

[0001] En general, la invención presenta composiciones y métodos de preparación, formulación, y la prevención de cerovalencia ricos en azufre y el tratamiento de condiciones patológicas asociadas con estrés oxidativo.

10 [0002] A pesar de la abundancia de medicamentos para bajar la presión arterial, reducir el colesterol y tratar afecciones cardiovasculares, la enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de muerte en los Estados Unidos. Es probable que la incidencia de problemas cardiovasculares continúe su aumento constante a medida que la generación "Baby Boomer" envejece y las tasas de obesidad y diabetes continúan aumentando. Por lo tanto, el desarrollo de mejores terapias es de suma importancia.

15 [0003] El sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) es una molécula de señalización endógena reconocida que se ha demostrado que modula la función inmune y mitocondrial, actuar tanto directa como indirectamente como un antioxidante, y aumentar el flujo sanguíneo por una variedad de mecanismos. Además, el sulfuro de hidrógeno es un potente agente antiinflamatorio y modulador de la muerte celular. Esta plétora de propiedades hace que el sulfuro de hidrógeno sea  
20 un candidato ideal para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cánceres, enfermedades inflamatorias, diabetes, dislipidemia, enfermedades neurodegenerativas, SIDA y otras afecciones patológicas asociadas con el estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox, y o disfunción inmune.

25 [0004] Considerando que las principales funciones fisiológicas de  $H_2S$  están en la señalización y la citoprotección en células y tejidos normales (es decir, no transformadas), ahora es evidente que en células transformadas (es decir, malignas),  $H_2S$  muestra efectos prooxidantes y proapoptóticos. Estos efectos constituyen la base para desarrollar un nuevo enfoque terapéutico y/o profiláctico para tratar afecciones asociadas con el crecimiento celular descontrolado, como el cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas.

30 [0005] El sulfuro de hidrógeno se produce endógenamente a partir de cisteína por las enzimas cistationina beta-sintasa, cistationina gamma-liasas, y sulfurotransferasa 3-mercaptopiruvato. Los profármacos de sulfuro de hidrógeno pueden proporcionar una fuente exógena de sulfuro de hidrógeno en el cuerpo; sin embargo, los profármacos de sulfuro de hidrógeno utilizados actualmente no contienen más del 57% de azufre bioactivo (azufre capaz de convertirse en sulfuro de hidrógeno *in vivo*). Por otro lado, se ha vuelto cada vez más claro que el sulfuro de hidrógeno y sodio  
35 ( $NaHS$ , también conocido como hidrosulfuro de sodio), que contiene un 57% de azufre bioactivo, libera sulfuro de hidrógeno de forma repentina e incontrolada cuando se inyecta en el cuerpo de un mamífero, mientras que es muy poco probable que las células o tejidos están siempre expuestos a  $H_2S$  generados de tal manera. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar profármacos de sulfuro de hidrógeno que sean seguros y efectivos, estén activos cuando se administran por vía oral, liberen  $H_2S$  de forma controlada y sostenida, y tengan una alta biodisponibilidad para el  
40 tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades inflamatorias, diabetes, dislipidemia, enfermedad neurodegenerativa, SIDA y otras afecciones patológicas asociadas con el estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox y/o disfunción inmune.

45 [0006] US 2009/304819 (A1) describe composiciones que contienen uno o más "compuestos de azufre activos" en combinación entre sí o con otros agentes terapéuticos. El documento US 2009/304819 también abarca diferentes modos de administración de los compuestos terapéuticos. En particular, describe un método de combinación de ingrediente activo con celulosa húmeda, que permite que la celulosa húmeda funcione como un portador entérico.

50 [0007] El documento EP 0242553 (A1) describe composiciones farmacéuticas para uso tópico en odontostomatología que contienen alantoína y azufre como principios activos.

[0008] US 5.100.653 (A) describe un producto farmacéutico para el tratamiento tópico de enfermedades e infecciones de áreas parodontales en el que trometamol en una concentración de menos del 3% se combina con azufre y alantoína.

55 **Resumen de la invención**

[0009] La invención presenta una composición que incluye 90 a 99,9% (p/p) de azufre alfa elemental y 0,01-10% (p/p) componentes altamente polares, y que comprende opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde dichos componentes altamente polares se seleccionan del grupo que consiste en politionato de sodio, politionato de potasio, politionato de amonio, politionato de calcio, ácidos politiónicos, tiosulfato de sodio,  
60 tiosulfato de potasio, tiosulfato de amonio, tiosulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de amonio, en donde la composición comprende al menos un 96% de azufre cerovalente bioactivo que se somete fácilmente a bioconversión en sulfuro de hidrógeno. En ciertas realizaciones, los componentes altamente polares se seleccionan de sulfato de sodio, politionato de sodio y tiosulfato de sodio.

65 [0010] La invención también presenta una composición que incluye un azufre elemental alfa y uno o más componentes

altamente polares en una relación de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 partes elementales de azufre alfa por 1 parte de componentes altamente polares (p/p) para la administración enteral, tópica, o administración parenteral, en donde dichos componentes altamente polares se seleccionan del grupo que consiste en politionato de sodio, politionato de potasio, politionato de amonio, politionato de calcio, ácidos politiónicos, tiosulfato de sodio, tiosulfato de potasio, tiosulfato de amonio, tiosulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, y sulfato de amonio, en donde la composición comprende al menos un 96% de azufre cerivalente bioactivo que se somete fácilmente a la bioconversión en sulfuro de hidrógeno. En ciertas realizaciones, la proporción de azufre alfa elemental a componentes altamente polares es 15:1, 20:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 110:1, 120:1, 130:1, 140:1, o 145:1.

**[0011]** En algunas realizaciones, una composición de la invención se formula para la administración enteral y el azufre elemental alfa y los componentes altamente polares están presentes juntos en una cantidad de 400 mg. En un aspecto de la realización, la composición es una cápsula.

**[0012]** En otras realizaciones, una composición de la invención se formula para administración tópica, y la composición incluye 1-20% de contenido de azufre de cerovalencia. En un aspecto de la realización, la composición es una crema. En un aspecto, la crema incluye (i) 5-20% de contenido de azufre valente y (ii) polietilenglicol o vaselina. En otro aspecto, la crema incluye 5-15% de contenido de azufre valente. En ciertas realizaciones, la crema incluye 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16 %, 17%, 18% o 19% de contenido de azufre valente.

**[0013]** Para cualquiera de las composiciones anteriores, los componentes altamente polares se pueden seleccionar del grupo que consiste de politionato de sodio, politionato de potasio, politionato de amonio, politionato de calcio, tiosulfato de sodio, tiosulfato de potasio, tiosulfato de amonio, tiosulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de amonio.

**[0014]** En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención incluyen además un tercer agente. En algunas realizaciones, el tercer agente es un fármaco para enfermedades cardiovasculares, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco antineurodegenerativo o un fármaco anticanceroso/antiproliferativo. En otras realizaciones, el tercer agente es un suplemento dietético. En ciertos aspectos de la invención, el azufre alfa elemental, los componentes altamente polares y el tercer agente están presentes en una cantidad eficaz para tratar una afección asociada con el estrés oxidativo. En otros aspectos, el azufre alfa elemental, los componentes altamente polares y el tercer agente están presentes en una cantidad efectiva para promover o mantener la salud general.

**[0015]** También se describe un método para preparar una composición que incluye 90 a 99,9% (p/p) de azufre alfa elemental y 0,01-10% (p/p) de componentes altamente polares, el método incluye: (a) proporcionar un primer compuesto inorgánico que incluye azufre en el estado de oxidación -2 (menos dos), (b) haciendo reaccionar el primer compuesto inorgánico con un segundo compuesto que incluye azufre en el estado de oxidación +4 (más cuatro) y opcionalmente un ácido, en donde la reacción produce una composición incluyendo 90-99,9% (p/p) de azufre alfa elemental y 0,01-10% (p/p) de componentes altamente polares.

**[0016]** En una realización, el primer compuesto inorgánico es sodio sulfuro de hidrógeno o sulfuro de sodio. En una segunda realización, el segundo compuesto inorgánico es metabisulfito de sodio, bisulfito de sodio o sulfito de sodio. En una tercera realización, el ácido es ácido sulfúrico concentrado.

**[0017]** También se describe una composición que incluye 90 a 99,9% (p/p) de azufre alfa elemental y 0,01-10% (p/p) de componentes altamente polares, y que incluye opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En ciertos aspectos, la composición también puede incluir aproximadamente el 99% (p/p) de azufre valiente y aproximadamente el 1% (p/p) de componentes altamente polares, en donde los componentes altamente polares se seleccionan de sulfato de sodio, politionato de sodio y tiosulfato de sodio.

**[0018]** En otro aspecto, se describe una composición que incluye un azufre elemental alfa y uno o más componentes altamente polares en una relación de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 partes elementales de azufre alfa por 1 parte de componentes altamente polares (p/p) para la administración enteral, tópica o parenteral.

**[0019]** En algunas realizaciones, la condición asociada con el estrés oxidativo se selecciona del grupo que consiste en: la esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome de X frágil, enfermedad de células falciformes, síndrome de fatiga crónica, la catarata osteoartritis, la degeneración macular, hepatitis tóxica, hepatitis viral, cirrosis, hepatitis crónica, estrés oxidativo por diálisis, toxicidad renal, insuficiencia renal, colitis ulcerosa, infección bacteriana, infecciones virales, como el VIH y el SIDA, herpes, infección del oído, enfermedades del tracto respiratorio superior, hipertensión, calvicie y pérdida de cabello, infertilidad masculina, síndrome de sobre-entrenamiento relacionado con el rendimiento deportivo, pie de atleta, psoriasis, eczema, esclerodermia, dermatitis atópica, polimiositis, rosácea, dermatitis herpetiforme, otras enfermedades neurodegenerativas, otras enfermedades inflamatorias y cáncer.

**[0020]** En otras formas de realización, la condición asociada con el estrés oxidativo es una enfermedad cardiovascular. En ciertos aspectos de la realización, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en: arteriosclerosis, enfermedad coronaria, isquemia, disfunción endotelial, en particular aquellas disfunciones que afectan

la elasticidad de los vasos sanguíneos, reestenosis, trombosis, angina, presión arterial alta, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca, cor pulmonale, arritmias cardíacas, endocarditis, cardiomegalia inflamatoria, miocarditis, infarto de miocardio, enfermedad cardíaca valvular, accidente cerebrovascular y enfermedad cerebrovascular, estenosis de la válvula aórtica, insuficiencia cardíaca congestiva y enfermedad arterial periférica.

**[0021]** También se describe una composición que incluye 90 a 99,9% (p/p) de azufre alfa elemental y 0,01-10% (p/p) componentes altamente polares, y que incluye opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

**[0022]** En un aspecto, la divulgación también cuenta con una composición que incluye 90 a 99,9% (p/p) de azufre alfa elemental y 0,01-10% (p/p) componentes altamente polares, y que incluye opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El método incluye los pasos de: determinar el nivel de sulfuro de hidrógeno en una muestra del sujeto, ajustar la dosis de la composición en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad cardiovascular, en donde un aumento en el nivel de sulfuro de hidrógeno o una mejora en un parámetro cardiovascular resulta en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. En ciertos aspectos, el parámetro cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en el volumen diastólico final (EDV), el volumen sistólico final (ESV), el volumen sistólico, la fracción de eyección, la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco.

#### Definiciones

**[0023]** Por "azufre alfa elemental" se entiende azufre elemental ortorrómbico que tiene la fórmula  $S_8$ . El azufre alfa elemental existe como  $S_8$  (moléculas de ciclooctasulfuro), pero también puede incluir  $S_7$  (moléculas de cicloheptasulfuro) y  $S_6$  (moléculas de ciclohexasulfuro).

**[0024]** Por "azufre beta elemental" se entiende azufre elemental monoclinico que tiene la fórmula  $S_8$  y que consiste principalmente en moléculas de ciclooctasulfuro.

**[0025]** Por "componente altamente polar" se entiende un compuesto cuyas moléculas contienen al menos un enlace iónico o un enlace covalente altamente polar. Los componentes altamente polares incluyen, por ejemplo, politionatos de sodio, politionatos de potasio, politionatos de amonio, politionatos de calcio, tiosulfato de sodio, tiosulfato de potasio, tiosulfato de amonio, tiosulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, bisulfito de sodio, bisulfito de potasio, sulfato de potasio, sulfato de sodio - sulfito, bisulfito de calcio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, acetato de sodio, palmitato de sodio, palmitato de potasio y/o laurato de amonio. Los componentes altamente polares también incluyen moléculas que contienen enlaces covalentes de OH altamente polares, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, ácidos poliónicos, ácidos carboxílicos y/o monoestearato de sorbitán. Los componentes altamente polares incluyen además compuestos cuyas moléculas contienen enlaces covalentes N-H altamente polares, por ejemplo, aminas primarias, aminoácidos, amidas primarias, péptidos y proteínas.

**[0026]** Por "politionato" se quiere decir un anión o un grupo de la fórmula  $^-\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$  (por ejemplo, donde n es un número entero de 1 a 60, preferiblemente 1-20, y más preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6).

**[0027]** Por "azufre valente" se entiende un átomo de azufre con un estado de oxidación de cero, como se calcula de acuerdo con un conjunto acordado de reglas bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, cada molécula de ciclooctasulfuro ( $S_8$ ) contiene ocho átomos de azufre valentes, cada ion tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) contiene un átomo de azufre cerovalente, y cada ion de politionato contiene átomos de azufre valentes cero "n". El azufre cerovalente se puede encontrar en los compuestos de azufre sulfónico.

**[0028]** Por "contenido de azufre de cerovalencia" se entiende la cantidad de cerovalencia de azufre presente en una composición que contiene azufre alfa elemental y componentes altamente polares, tales como, politionatos de sodio, politionatos de potasio, politionatos de amonio, politionatos de calcio, tiosulfato de sodio, tiosulfato de potasio, tiosulfato de amonio, tiosulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de amonio.

**[0029]** Por "azufre sulfano" se entiende un átomo de azufre lábil, altamente reactivo a un estado de oxidación reducido con una valencia de 0 o -1, enlazada covalentemente a otro átomo de azufre. Los compuestos de sulfuro de azufre pueden incluir, por ejemplo, persulfuros, polisulfuros, politionatos, polisulfanos, tiotaurina, tiosulfato y/o azufre elemental. Los compuestos de sulfuro de azufre se pueden formar en el metabolismo anaeróbico de cisteína azufre con la participación de enzimas como la cistationasa, 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa y/o rodaneso. El último paso en las rutas de generación de  $H_2S$  enzimáticas generalmente involucra especies que contienen sulfuro de azufre. Los compuestos que contienen sulfuro de azufre pueden participar en procesos de regulación celular mediante la activación o inactivación de enzimas como, por ejemplo, oxidorreductasa que contiene un átomo de hierro o molibdeno, por ejemplo, xantina oxidasa, aldehído oxidasa y malato deshidrogenasa).

**[0030]** Por "enteral" se entiende la administración que involucra cualquier parte del tracto gastrointestinal. La administración enteral puede incluir: por vía oral en forma de tabletas, cápsulas o gotas, por sonda de alimentación gástrica, sonda de alimentación duodenal o por vía rectal.



**[0031]** Por administración "tópica" se entiende que es local o sistémica, particularmente epicutánea, por inhalación, gotas para los ojos, y/o gotas para los oídos.

5 **[0032]** Por "parenteral" se entiende la administración de la composición de la invención por medios distintos a la ingesta oral, en particular mediante la inyección de una forma de líquido en el cuerpo. La administración parenteral puede incluir: administración intravenosa, intraarterial, intraósea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular y subcutánea.

10 **[0033]** Por "medicamento para enfermedades cardiovasculares" se entiende una clase de agentes o sustancias que se usan para tratar enfermedades que afectan el sistema cardiovascular, particularmente enfermedad cardíaca, enfermedad vascular del cerebro y riñón, y enfermedad arterial periférica.

**[0034]** Por "fármaco antiinflamatorio" se entiende un agente o sustancia que actúa reduciendo la inflamación.

15 **[0035]** Por "medicamento contra el cáncer/antiproliferativo" se entiende un agente, sustancia y/o mezcla de sustancias que reduce, previene y/o interfiere con el crecimiento descontrolado de las células, su inicio, promoción, progresión y/o diseminación a otros órganos.

20 **[0036]** Por "fármaco antineurodegenerativo" se entiende un agente, sustancia y/o mezcla de sustancias que restaura y/o mejora la función de las neuronas actuando directamente sobre las neuronas o indirectamente en vías asociadas con la función neuronal (por ejemplo, vías de transporte axonal, vías de plegamiento incorrecto de proteínas, vías de degradación de proteínas y vías de muerte celular programada).

25 **[0037]** Por "suplemento dietético" se entiende un agente, sustancia y/o mezcla de sustancias que es un complemento alimenticio o suplemento nutricional destinado a complementar la dieta y proporcionar nutrientes, como vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos o aminoácidos que pueden faltar o que no pueden consumirse en cantidades suficientes en la dieta de una persona.

30 **[0038]** Por "promover o mantener la salud general" se entiende que ayuda a lograr un estado de salud humana que se caracteriza por el equilibrio homeostático con la condición estable de propiedades tales como temperatura, pH, electrolitos y/o metabolitos.

**[0039]** Por "inorgánico" se entiende un compuesto que no es un compuesto orgánico.

35 **[0040]** Por "estado de oxidación" se entiende una medida del grado de oxidación de un átomo en una molécula de una sustancia definida como la carga que se podría imaginar que tiene un átomo cuando los electrones se cuentan de acuerdo con un conjunto de reglas acordadas bien conocidas por los expertos en la técnica.

40 **[0041]** Por "ácido" se quiere decir un ácido de Arrhenius, un ácido de Bronsted-Lowry, y/o un ácido de Lewis. Un ácido de Arrhenius es una sustancia que aumenta la concentración del ion hidronio cuando se disuelve en agua. Un ácido de Bronsted-Lowry es una especie que dona un protón a una base de Bronsted-Lowry. Un ácido de Lewis es una especie que acepta un par de electrones de otra especie.

45 **[0042]** Por "condiciones asociadas con el estrés oxidativo" se entiende una condición caracterizada o originada por un desequilibrio entre la manifestación sistémica de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico para desintoxicar fácilmente los intermedios reactivos y/o para reparar el daño resultante.

50 **[0043]** Por "sulfuro de hidrógeno" se entiende un compuesto que tiene la fórmula  $H_2S$  que se produce en pequeñas cantidades por muchas células del cuerpo de los mamíferos y tiene un número de funciones de señalización biológica (por ejemplo, un relajante del músculo liso, un vasodilatador, aumenta la respuesta del receptor de NMDA, facilita la potenciación a largo plazo y la participación en la formación de la memoria).

55 **[0044]** Por "aumento de los niveles de sulfuro de hidrógeno" se entiende un aumento en el nivel de sulfuro de hidrógeno producido en el cuerpo de los mamíferos (por ejemplo, a partir de la cisteína por las enzimas cistationina beta-sintasa y cistationina gamma-liasa) en al menos aproximadamente el 5%, 10 %, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en comparación con una muestra de referencia de control. Los niveles de sulfuro de hidrógeno se pueden determinar utilizando cualquier método útil conocido en la técnica.

60 **[0045]** Por "deficiencia nutricional de azufre" se entiende una condición caracterizada por un desequilibrio en la actividad enzimática, los niveles hormonales y la función del sistema inmunitario debido a la falta de cantidades suficientes de azufre en una dieta regular. Los síntomas de deficiencia nutricional de azufre incluyen, por ejemplo, insuficiencia hepática y renal, uñas frágiles, caída del cabello, picazón en la piel o el cuero cabelludo, eczema, acné, erupción del pañal, migrañas, flatulencia, indigestión, vómitos, diarrea, hemorroides, impotencia, menstruación dolorosa e irregular, episodios frecuentes de infecciones de origen bacteriano o viral, dolor de garganta, dolor de muelas, hemorragias nasales, sarampión, dolor en las articulaciones, fiebre del heno, fiebre, orinarse en la cama y/o problemas de lactancia.

**[0046]** Por "mejora en el parámetro cardiovascular" se entiende un cambio en un parámetro cardiovascular (por ejemplo, el volumen diastólico final (EDV), el volumen sistólico final (ESV), el volumen sistólico, la fracción de eyección, la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco) a los rangos normales (p. ej., un volumen diastólico final (EDV) de aproximadamente 65-240 ml, un volumen sistólico final (ESV) de aproximadamente 16-143 ml, un volumen de golpe de aproximadamente 55-100 ml, una fracción de eyección de aproximadamente 55-70%, una frecuencia cardíaca de aproximadamente 60-100 bpm, y/o un gasto cardíaco de aproximadamente 4,0-8,0 L/min).

**[0047]** Por "tratamiento" se entiende someter a un paciente a un régimen de manejo con el fin de combatir una enfermedad o trastorno y obtener resultados beneficiosos o deseados, como los resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, entre otros, la mejora de la calidad de vida, el alivio o la mejora de uno o más síntomas o afecciones; disminución de la extensión de la enfermedad, trastorno o afección; estabilización (es decir, no empeoramiento) de un estado de enfermedad, trastorno o afección; prevención de la propagación de enfermedades, trastornos o afecciones; retrasar o ralentizar el progreso de la enfermedad, trastorno o afección; mejora o paliación de la enfermedad, trastorno o afección; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable.

**[0048]** Por "sujeto" se entiende un mamífero (por ejemplo, un humano o un no humano).

**[0049]** Por "cantidad efectiva" de un agente se entiende la cantidad del agente suficiente para lograr un efecto beneficioso o resultado deseado (por ejemplo, tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cánceres (por ejemplo, hiperproliferación de células malignas), enfermedades inflamatorias, diabetes, dislipidemia, enfermedades neurodegenerativas, SIDA y otras afecciones patológicas asociadas con el estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox y/o disfunción inmunológica), y, como tal, una cantidad de la composición suficiente para lograr un aumento en los niveles de sulfuro de hidrógeno y/o sulfuro de sulfuro *in vivo*, en comparación con el nivel de sulfuro de hidrógeno y/o azufre de sulfano sin la administración de la composición.

**[0050]** Por "composición" se entiende un sistema que comprende una sustancia descrita en el presente documento, opcionalmente formulado con un excipiente aceptable, y fabricado o vendido con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento de la enfermedad en un mamífero o para promover y mantener la salud general. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, por ejemplo, para administración oral en forma de dosis unitaria (por ejemplo, una tableta, cápsula, comprimido, cápsula de gel o jarabe); para administración tópica (por ejemplo, como crema, gel, loción o pomada); para administración intravenosa (por ejemplo, como una solución estéril o dispersión coloidal libre de émbolos particulados y en un sistema disolvente adecuado para uso intravenoso); o en cualquier otra formulación descrita en el presente documento.

**[0051]** Por "excipiente aceptable" se entiende cualquier ingrediente que no sea la sustancia descrita en el presente documento (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender o disolver la sustancia activa y/o sustancias, por ejemplo, vaselina y polietilenglicol) y que tenga las propiedades de ser no tóxicas y no inflamatorias en un paciente. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglutinantes, recubrimientos, auxiliares de compresión, desintegrantes, tintes (colores), emolientes, emulsionantes, rellenos (diluyentes), formadores o recubrimientos de películas, sabores, fragancias, deslizantes (potenciadores de flujo), lubricantes, conservantes, tintas de impresión, sorbentes, agentes de suspensión o dispersión, estabilizadores coloidales, edulcorantes y agua. Los excipientes ejemplares incluyen, pero no se limitan a: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), estearato de calcio, croscarmelosa, polivinilpirrolidona reticulada, ácido cítrico, crospovidona, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metilcelulosa, parabeno de metilo, celulosa microcristalina, polietilglicol, pirrolidona polivinílico, almidón pregelatinizado, propilparabeno, laca, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa sódica, glicolato de almidón sódico, sorbitol, almidón (maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio y xilitol. Los excipientes también pueden incluir diluyentes (por ejemplo, soluciones salinas y soluciones tampón acuosas), vehículos acuosos y vehículos no acuosos, por ejemplo, agua, etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos., aceites vegetales, como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo.

**[0052]** Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" significa  $\pm 10\%$  del valor recitado.

**[0053]** En la Tabla 1 se proporciona una lista de abreviaturas y significados de la terminología descrita en este documento.

Tabla 1

Abreviatura	Sentido
3-MST	3-mercaptopiruvato sulfotransferasa
ACS6	Derivado donante de H <sub>2</sub> S de sildenafil
ADEM	encefalomielitis aguda diseminada
Akt	Proteína quinasa B
Akt-P <sup>Ser473</sup>	Akt fosforilado en el residuo de serina 473
Akt-P <sup>Thr308</sup>	Akt fosforilado en el residuo de treonina 308
ALS	esclerosis lateral amiotrófica
BHT	hidroxitolueno butilado
CBS	cistationina beta sintasa
CO	monóxido de carbono
CRISPs	proteínas secretoras ricas en cisteína
CS-CSE Tg	ratones transgénicos CSE específicos del corazón
CSE	cistationina gamma liasa
CSE KO	deficiente en CSE
DADS	disulfuro de dialilo
DATS	trisulfuro de dialilo
DBTS	trisulfuro de dibencilo
ED	disfuncion erectil
EDV	volumen diastólico final
eNOS	sintasa de óxido nítrico endotelial
eNOS-P <sup>Ser1177</sup>	eNOS en el residuo de serina 1177
ESV	volumen sistólico final
FEG	fenilalanina-glutamina-glicina
feG	Forma D-isomérica
GSH	glutatión
H <sub>2</sub> S	sulfuro de hidrógeno
HO-1	hemo oxigenasa 1
IJM	niveles de sulfuro de sulfano circulantes
ImSAIDs	derivados antiinflamatorios selectivos inmunes
I/R	isquemia/reperfusión
IVSd	Dimensión diastólica terminal septal intraventricular
j.JM 02/seg/mg	función respiratoria mitocondrial
LV	ventricular izquierdo
LVEDD	diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo
LVEF	fracción de eyección ventricular izquierda
LVESD	diámetro sistólico final ventricular izquierdo
MFR	formas móviles recuperadas
NaHS	sulfuro de hidrógeno de sodio
NO	óxido nítrico
NO <sub>2</sub> -	nitrito
NO <sub>3</sub> -	nitrato
NOX	NADPH oxidasa
NOx4	NADPH oxidasa 4
AINE	fármacos anti-inflamatorios no esteroideos
PDE5	fosfodiesterasa tipo 5
RCR	relación de control respiratorio
RCR	relación de control respiratorio
ROS	especies de oxígeno reactivas
S2O3-2	ion tiosulfato

(continúa)

Abreviatura	Sentido
S8	molécula de ciclooctasulfuro
SG-1002	composición rica en azufre biodisponible cerivalente altamente biodisponible
TAC	constricción aórtica transversa
TBZ	4-hidroxitobenzamida
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial
WT	tipo silvestre

### Breve descripción de las figuras

#### [0054]

**Las Figuras 1A-1H** son datos que muestran que la insuficiencia cardíaca reduce los niveles de sulfuro en humanos y ratones. Las Figuras 1A-1D muestran los picos representativos del cromatógrafo de gases y los datos de resumen de los niveles de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y sulfuro de sulfano circulantes en los controles normales y los pacientes con insuficiencia cardíaca. Figuras 1E-1F muestran niveles de  $H_2S$  libre y azufre sulfano circulante después de 6 semanas de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión (CAT) en grupos de ratones mantenidos en una comida estándar (CAT + vehículo) o mantenidos en un pienso que contiene el  $H_2S$  donante SG-1002 (CAT + SG-1002, 20 mg/kg/día). Figuras 1G-1H muestran niveles miocárdicos de  $H_2S$  libre y azufre sulfano en los grupos experimentales. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Los números en las barras representan el tamaño de la muestra. \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Simulacro.

**Las Figuras 2A-2F** son datos que muestran que la deficiencia de cistationina gamma liasa (CSE) exacerba la disfunción cardíaca después de un CAT. La Figura 2a son imágenes representativas del corazón de ratones de tipo silvestre (WT + CAT), ratones con deficiencia de CSE (KO CSE + CAT) y ratones KO CSE tratados con SG-1002 (KO CSE + CAT + SG-1002) a las 12 semanas de CAT. La Figura 2B muestra la relación entre el peso del corazón/la longitud de la tibia y el peso del pulmón/la longitud de la tibia a las 12 semanas después del CAT. La Figura 2C muestra la dimensión diastólica final del septo intraventricular (IVSd en mm). La Figura 2D muestra el diámetro diastólico final LV (LVEDD en mm), la Figura 2E muestra el diámetro sistólico final LV (LVESD en mm) y la Figura 2F muestra la fracción de eyección LV (%) después de CAT. El grosor de la pared aumentó de manera similar en todos los grupos desde 1 semana hasta 12 semanas después del CAT. Los ratones KO CSE exhibieron dilatación y disfunción a partir de las 6 semanas de CAT. Los ratones WT y KO CSE tratados con SG-1002 no mostraron cambios significativos en las dimensiones del VI y mostraron una función cardíaca preservada. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. †  $p < 0,05$ , ‡  $p < 0,01$  y #  $p < 0,001$  vs. WT. \*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Línea de base.

**Las Figuras 3A-3F** son datos que muestran la sobreexpresión específica del corazón de la CSE atenúa la dilatación cardíaca y la disfunción cardíaca después de un CAT. La Figura 3A son fotomicrografías representativas de ratones transgénicos CSE de tipo silvestre (WT + CAT) y específicos para el corazón (CS-CSE Tg+ CAT) a las 12 semanas de CAT. La Figura 3B muestra los pesos miocárdicos (mg/cm) y los pesos pulmonares (mg/cm) expresados como la relación de la longitud de la tibia a las 12 semanas de CAT. La Figura 3C muestra IVSd (mm), la Figura 3D muestra LVEDD (mm), la Figura 3E muestra LVESD (mm) y la Figura 3F muestra la fracción de expulsión del VI (%) después de CAT. El grosor de la pared aumentó de manera similar en ratones WT y CSE Tg de 1 semana a 12 semanas de CAT. Los ratones CSE Tg experimentaron significativamente menos dilatación y disfunción cardíaca en comparación con los ratones WT. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Línea de base.

**Las Figuras 4A-4H** son datos que muestran terapia exógena  $H_2S$  que previene la dilatación cardíaca y la disfunción después de CAT. La Figura 4a muestra imágenes representativas del corazón de ratones tratados con Simulacro, Vehículo (CAT + Vehículo) y SG-1002 (CAT + SG-1002) a las 12 semanas de CAT. La Figura 4B muestra la relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia. La Figura 4C muestra la relación entre el peso del pulmón y la longitud de la tibia. La Figura 4D muestra los niveles de BNP circulante (ng/mL) a las 6 y 12 semanas de CAT. La Figura 4E muestra IVSd (mm), la Figura 4F muestra LVEDD (mm), la Figura 4G muestra LVESD (mm) y la Figura 4H muestra la fracción de eyección (%) después de CAT. El grosor de la pared aumentó de manera similar en ambos grupos después de CAT. Sin embargo, la dieta SG-1002 previno la dilatación cardíaca y la disfunción a partir de las 6 semanas de CAT. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , y \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Línea de base.

**Las Figuras 5A-5C** son datos que muestran que  $H_2S$  atenúa la fibrosis intermuscular y perivascular después de CAT. La Figura 5A son fotomicrografías representativas de las secciones del corazón teñidas con Píronio y Pírosirius Red de Masson que representan fibrosis intermuscular y perivascular en corazones de ratones tratados con Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 a las 6 semanas de CAT. La Figura 5B es un resumen del área de fibrosis como % del VL calculado a partir de las secciones del Tricromo de Masson. La Figura 5C es un resumen del área de fibrosis como % del VL calculado a partir de las secciones Pírosirius

Red. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$ , y \*\*\* $p < 0,001$  vs. Simulacro.

**Las Figuras 6A-6H** son datos que muestran que  $H_2S$  regula por incremento la fosforilación de Akt, la expresión del VEGF, y activa la vía eNOS-NO después de CAT. La Figura 6A es inmunotransferencias representativas de Akt total, Akt-P<sup>Ser473</sup>, y Akt-P<sup>Thr308</sup>. La Figura 6B es un análisis densitométrico de la expresión de Akt total. La Figura 6C es un análisis densitométrico de Akt-P<sup>Ser473</sup> y Akt-P<sup>Thr308</sup> en corazones de Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 a las 6 semanas de CAT. La Figura 6D es una inmunotransferencia representativa y un análisis densitométrico de la expresión cardíaca de VEGF a las 6 semanas de CAT. Las Figuras 6E-6F son inmunotransferencias representativas y análisis densitométrico de la expresión de eNOS total y eNOS-P<sup>Ser1177</sup> en corazones de Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 a las 6 semanas de CAT. Las Figuras 6G-6H muestran nitrito y niveles de nitrato en los corazones de los grupos experimentales a las 6 semanas de CAT. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM.

**Las Figuras 7A-7F** son datos que muestran que el  $H_2S$  conserva la función respiratoria mitocondrial y atenúa el estrés oxidativo después de un CAT. La Figura 7A muestra la función respiratoria mitocondrial (j.JM 02/seg/mg) en el Estado 3 y el Estado 4 en corazones de Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 a las 6 semanas de CAT. La Figura 7B muestra la relación de control respiratorio (RCR) de los corazones de los grupos experimentales a las 6 semanas de CAT. Las Figuras 7C-7D muestran los niveles de isoprostano en plasma y corazón a las 6 semanas de CAT. La Figura 7E es inmunotransferencias representativas y análisis densitométrico de NADPH oxidasa 4 (Nox4) en corazones de los grupos experimentales a las 6 semanas de CAT. La Figura 7F es inmunotransferencias representativas y análisis densitométrico de hemooxigenasa 1 (HO-1) en corazones de los grupos experimentales a las 6 semanas de CAT. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  vs. Simulacro.

**Las Figuras 8A-8D.** La Figura 8A es inmunotransferencias representativas de cistationina gamma liasa (CSE), cistationina beta sintasa (CBS) y 3 mercaptopiruvato sulfotransferasa (3-MST) en los corazones de Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 ratones tratados a los 6 Semanas de CAT. Las Figuras 8B-8D muestran el análisis densitométrico de los grupos de CSE, CBS y 3 MST en Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 a las 6 semanas después de CAT. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Los números en las barras representan el tamaño de la muestra.

**Las Figuras 9A-9D.** La Figura 9a muestra el sulfuro de hidrógeno libre ( $H_2S$ ) en circulación y la Figura 9B muestra los niveles de sulfuro de azufre (IJM) en circulación en el control de tipo salvaje (WT), CSE deficiente (KO CSE) y KO CSE alimentados con una dieta que contiene el donante  $H_2S$  SG-1002 La Figura 9C muestra el  $H_2S$  libre y la Figura 9D muestra los niveles de sulfuro de azufre (nmol/mg peso húmedo) en los corazones de ratones WT, KO CSE y KO CSE + SG-1002. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  frente a WT.

**Las Figuras 10A-10C.** La Figura 10A muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para ratones CAT + WT, ratones CAT + KO CSE y ratones KO CSE alimentados con una dieta SG-1002 (CAT + KO CSE + SG-1002) durante el protocolo de CAT de 12 semanas. La Figura 10B muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para CAT + WT y ratones transgénicos CSE específicos para el corazón (CAT + CS-CSE Tg) después de 12 semanas de CAT. La Figura 10C muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para ratones alimentados con una dieta de control (CAT + Vehículo) y ratones alimentados con una dieta SG-1002 (CAT + SG-1002) después de 12 semanas de CAT.

**La Figura 11** es inmunotransferencias representativas de la cationina beta sintasa (CBS), y 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (3-MST) de los corazones de ratones transgénicos de tipo salvaje y CS-CSE.

**Las Figuras 12A-12D.** La Figura 12A muestra la dimensión diastólica final del septo intraventricular (IVSd, mm), la Figura 12B muestra el diámetro diastólico final de LV (LVEDD, mm), la Figura 12C muestra el diámetro sistólico final de LV (LVESD, mm) y la Figura 12D muestra la fracción de eyección del LV (%) de tratados con SG-1002 durante 6 semanas después de CAT (SG-1002), ratones tratados con SG-1002 durante 1 semana después de CAT y luego se retiró SG-1002 durante 5 semanas y ratones tratados con SG-1002 durante 3 semanas después de CAT y SG-1002 se retiraron durante 3 semanas. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. Línea de base.

**Las Figuras 13A-13D.** La Figura 13A muestra los niveles séricos (pg/mL) de VEGF-A en CAT + Vehículo, y ratones tratados con CAT + SG-1002 a las 6 semanas después de CAT. La Figura 13B es inmunotransferencias representativas para los ratones no tratados con NNOS e iNOS miocárdicos de los ratones tratados con Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 a las 6 semanas de CAT. La Figura 13C muestra un análisis densitométrico de la proteína nNOS en relación con la fibrillarina en Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 corazones. La Figura 13D muestra un gráfico de barras del análisis densitométrico de la proteína iNOS miocárdica en relación con la fibrillarina en ratones Simulacro, CAT + Vehículo y CAT + SG-1002 después de 6 semanas de CAT. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  contra Simulacro.

**La Figura 14** es un diagrama esquemático que resalta el mecanismo propuesto por el cual la cistationina gamma liasa (CSE) o el sulfuro de hidrógeno exógeno protege el corazón después de la constricción aórtica transversa (CAT). Nuestros datos sugieren (CSE) o el donante de hidrógeno con terapia con SG-1002 activa el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y, posteriormente, fosforila Akt. La activación de Akt da como resultado la fosforilación y activación de eNOS. Tras la activación de eNOS, aumenta la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) y los niveles de nitrito. Estas señales moleculares producen una reducción del estrés oxidativo del miocardio y lesiones, mejoran la respiración mitocondrial y disminuyen la

fibrosis cardíaca. En última instancia, estas acciones citoprotectoras evitan la transición de la insuficiencia cardíaca compensada a descompensada y se preserva la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (VI).

### Descripción detallada

**[0055]** Hemos descubierto un profármaco de sulfuro de hidrógeno extraordinariamente seguro y eficaz de alta biodisponibilidad. Las composiciones altamente biodisponibles de la invención de la invención contienen un contenido de al menos un 96% de azufre cero activo bioactivo que se somete fácilmente a la bioconversión en sulfuro de hidrógeno.

**[0056]** Otros precursores de sulfuro de hidrógeno utilizados actualmente no contienen más del 57% de azufre bioactivo. La Tabla 2 muestra el porcentaje de azufre bioactivo contenido en varios profármacos de sulfuro de hidrógeno de la técnica anterior y la Tabla 3 muestra los efectos del sulfuro de hidrógeno en diversas vías del cáncer. En este documento se describe la preparación y caracterización de la composición rica en azufre cero altamente biodisponible y los métodos de administración de la composición para tratar y/o prevenir enfermedades cardiovasculares, cánceres, enfermedades inflamatorias, diabetes, dislipidemia, enfermedades neurodegenerativas, SIDA y otras afecciones patológicas asociadas con estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox y/o disfunción inmune.

**Tabla 2**

Profármaco de sulfuro de hidrógeno	% azufre bioactivo (p/p)
NaHS (anhidro)	57
Trisulfuro de dialilo (DATS)	53,9
Disulfuro de dialilo (DADS)	45,1
Na <sub>2</sub> S (anhidro)	41
4-hidroxitiobenzamida (TBZ)	20,9
Sulforafano (un isotiocianato, de brócoli)	18
Anetol tritiona (un ditioneolona)	13,3
Trisulfuro de dibencilo (DBTS)	11,5
ATB 346 (un conjugado de naproxeno-TBZ)	8,8
GY 4137 (un arilmorfolinofosfinoditiato de morfolinio)	8,5
ACS 83 (un conjugado de levodopa-ditioneolona)	7,1
ACS 15* (también conocido como ATB 337) (un conjugado diclofenac-ditioneolona)	6,3
ATB 343 (un conjugado idometacina-ditioneolona)	5,6
ACS 67 (un conjugado latanoprost-ditioneolona)	5,3
ACS 6 (un conjugado de sildenafil-ditioneolona)	3,5

**Tabla 3**

	Efecto	Mediador(es)	Etapa(s) afectada(s)*			
			1	2	3	4
1	Aumento de la inmunocompetencia.	GSH (↑), Taurina (↑)				
2	Eliminación de la inflamación crónica/resolución de la inflamación aguda	GSH (↑), CAMS en leucocitos (↓), NF-κB (↓)				
3	Inhibición de la activación del procarcinógeno por las oxidasas (Cyp-450, etc.)	Ninguna (?)				
4	Desintoxicación de carcinógenos	Nrf2 (↑), GSH (↑), SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (↑)				
5	Silenciamiento epigenético de protooncogenes.	SAM (↑)				
6	Reactivación epigenética de genes supresores de tumores.	HDAC (↓)				
7	Protección/repación de ADN	GSH (↑), Trx (↑)				
8	Inhibición de la translocación nuclear de <u>Nf</u> -κB y TNF-alfa	GSH (↑)				
9	Detención del ciclo celular	Punto de control quinasa I				
10	Prooxidante/proapoptótico "redlining"	Azufre de azufre (↑) ROS (↑)				

	Efecto	Mediador(es)	Etapa(s) afectada(s)*			
			1	2	3	4
5	11	Antiangiogénesis (en "altos niveles" de H <sub>2</sub> S)	?			
	12	Efecto antimetastático	E-Cadherin (↑)			
	13	Efecto antiosteolítico	Nf-kB (↓)			
10	* 1 = Iniciación, 2 = Promoción, 3 = Progresión, 4 = Metástasis					

### Composiciones ricas en azufre

15 *Preparaciones de composiciones ricas en azufre altamente biodisponibles y altamente biodisponibles*

[0057] En una realización, las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles se obtienen por el procedimiento I se describe a continuación para preparar un lote 2,7 kg de una composición que comprende azufre de cerovalencia altamente biodisponible. Los materiales de partida se enumeran en la Tabla 4 y los equipos adecuados se enumeran en la Tabla 5.

**Tabla 4**

Material	% de pureza (p/p)	Peso (kg)	Volumen (L)
Metabisulfito de sodio anhidro (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	99,4	4,890	
Sulfuro de hidrógeno de sodio, HIDRATADO* (Sulfhidrato de sodio, HIDRATADO)	70	7,090	
Ácido sulfúrico concentrado	98	6,408	3,483
Agua destilada	100	67,25	67,25
Hielo de alta pureza	100	30,0	
Alcohol etílico anhidro (LIBRE DE ADITIVOS DENATURALIZADOS)	≥99,5	5,68	7,2
*contiene aproximadamente 30% de agua y 70% de NaHS			

**Tabla 5**

Equipo	Especificaciones preferidas
Recipiente de reacción principal 200L	plástico o revestido de vidrio
Recipiente de reacción auxiliar 80L	plástico o revestido de vidrio
Recipiente de 40 l	plástico o acero inoxidable
Recipiente de 19 l	plástico o acero inoxidable
Recipiente de 10 l	plástico o acero inoxidable
Bandejas grandes	Acero inoxidable o vidrio
Conjunto de motor-agitador de alto par (220v, 3HP) con control de velocidad y convertidor de frecuencia (ABB, modelo ACS 150)	Debe ser capaz de variar continuamente la velocidad entre 0 y 1725 rpm. La escala de velocidad que se muestra en la pantalla debe ir de 0 a 50. Las dimensiones del eje del agitador tipo hélice de acero inoxidable 304 deben ser de 80 cm de largo y 1 pulgada de diámetro.
Agitador de baja torsión	-
Medidor de pH o varillas de medición de pH	-
Termómetro (-5-110°C)	-
Cilindros de medición	-
Básculas	-
Matraz de 4L-Kitasato	-
Embudo Buchner	185 mm diámetro interno
Dos embudos adicionales	Graduado
Al menos 2 máscaras de seguridad integrales equipadas con cartuchos diseñados para absorber los vapores ácidos.	-

*Procedimiento I*

**[0058]** Añadir en porciones y bajo agitación enérgica, 4,890 kg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  a 20 litros de agua destilada contenida en el recipiente de reacción principal 200L- equipado con el agitador de alto par (7-8 se muestra en la pantalla). La adición se realiza de manera deseable durante 3-5 minutos y se debe hacer un esfuerzo para evitar que el polvo forme grumos. Disuelva 7,090 kg de  $\text{NaHS} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  en 15 litros de agua destilada contenida en el recipiente de reacción auxiliar de 80 litros equipado con un agitador de bajo par. Filtre la solución de  $\text{NaHS}$  a través de 3 piezas de papel de filtro Whatman N° 1 a presión reducida utilizando un ensamblaje Kitasato-Buchner. Recoger los filtrados en un recipiente de 19 l. Se debe tener en cuenta que generalmente solo se retiene una cantidad muy pequeña de impurezas en los papeles de filtro.

**[0059]** A continuación, enjuagar el recipiente de reacción auxiliar 80L y la transferencia de la solución de  $\text{NaHS}$  filtrada desde el recipiente de 19L al recipiente de reacción auxiliar 80L. Agregue 30 litros de agua destilada al recipiente de reacción auxiliar de 80 litros que contiene la solución de  $\text{NaHS}$  filtrada. Vierta 1,458 kg de ácido sulfúrico concentrado (98%) en una mezcla agitada de 2,25 kg de hielo y 2,25 kg de agua destilada contenida en un recipiente de 10 l. Los siguientes dos pasos deben realizarse simultáneamente y deben durar 40 minutos. Verter, a la vez, 600 ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Solución en el recipiente de reacción auxiliar, que contiene la solución de  $\text{NaHS}$  agitada, y comience a agregar (de un embudo de adición) la solución de ácido sulfúrico diluido (5,958 kg) en el mismo recipiente con buena agitación. La agitación debe crear un vórtice que vaya hasta la hélice. Usando una máscara facial completa (equipada con un cartucho que absorbe ácido), agregue 2,5 kg de hielo al recipiente de reacción principal que contiene la solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Comience a verter ácido sulfúrico concentrado (4,95 kg) en pequeñas porciones y bajo agitación enérgica. Alterne las adiciones de ácido con las adiciones de hielo para evitar que la solución se caliente. Medir la temperatura de las soluciones en ambos recipientes de reacción. La temperatura de la solución en el recipiente de reacción principal de 200 L ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  más  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) debe ser de aproximadamente 0°C y la solución en el recipiente de reacción auxiliar de 80 L ( $\text{NaHS}$  más un poco de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  más  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) debe estar entre 30 y 35°C. Cargue 5 kg de hielo en el recipiente de reacción de 200L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  más  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y luego aplique la solución contenida en el recipiente de reacción auxiliar de 80L ( $\text{NaHS}$  más un poco de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  más  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) bajo agitación rápida (24.5-25 en la escala de velocidad mostrada en la pantalla). Esta operación debe tomar unos 10 minutos y la agitación debe crear un vórtice que se extienda hasta el hélice. Al mezclar las 2 soluciones, la mezcla de reacción debe pasar de incolora a amarilla canaria, la fluidez aumenta, hay algo de espuma y se separa un precipitado amarillento. Mida la temperatura final de la mezcla de reacción, así como su pH. La temperatura debe estar entre 25-30°C y el pH debe estar cerca de 3. Continúe agitando vigorosamente durante 90 minutos. La agitación debe crear un vórtice que vaya hasta la hélice.

**[0060]** Se deja reposar la mezcla de reacción durante 24 horas a temperatura ambiente. Al final de esta etapa, el precipitado amarillento debe quedar en el fondo del recipiente en forma de una masa relativamente compacta. Sin perturbar el precipitado, transfiera la mayor cantidad posible de la fase líquida a un recipiente diferente mediante decantación o sifón. Transfiera el material restante en el recipiente de reacción (aproximadamente 20 l) a un recipiente de plástico o vidrio de 40 l y agite durante 1 hora para obtener una suspensión homogénea. Filtre la suspensión a través de un papel de filtro Whatman N°1 utilizando un ensamblaje Buchner-Kitasato. Lave la torta del filtro con 1 l de agua destilada o hasta que el filtrado no muestre acidez. El lavado debe hacerse antes de que la torta del filtro desarrolle grietas para evitar la canalización. Inmediatamente después del lavado seguir aplicando vacío durante 10 minutos más. El secado excesivo conducirá a una torta de filtro altamente compacta y traerá grandes dificultades en los pasos posteriores. Se recomienda el uso de un filtro de goma o plástico (o dispositivo similar). Transfiera la torta de filtro relativamente seca a un recipiente de plástico de 10 l y agregue 7 l de etanol anhidro puro. Revuelva hasta que todo el sólido se suspenda y siga revolviendo durante 1 hora. Si la suspensión es demasiado gruesa, agregue más etanol anhidro. Filtre la suspensión a través de un papel de filtro Whatman N°1, lave la torta del filtro con 200 ml de etanol anhidro, coloque el dique de goma en la parte superior y siga aplicando vacío durante no más de 10 minutos. El secado excesivo conducirá a una torta de filtro altamente compacta y traerá grandes dificultades en los pasos posteriores. Transfiera la torta del filtro a bandejas grandes de vidrio o de acero inoxidable para el secado a temperatura ambiente. Deje secar durante unos 4 días o hasta que el peso constante y la ausencia de olor a etanol. El producto seco es un material que consiste en grumos fácilmente friables y un polvo impalpable. Desglosar los grumos y tamizar para asegurarse de que el material pase a través de un tamiz estándar 325.

**[0061]** El procedimiento I produce un producto (SG-1002) que contiene aproximadamente un 99% de azufre de valor cero y aproximadamente un 1% de componentes altamente polares (por ejemplo, sulfato de sodio y trazas de poliatos de sodio y tiosulfato de sodio).

**[0062]** En algunas realizaciones, las variaciones de Procedimiento I pueden usarse para obtener materiales similares. Tales procedimientos incluyen pero no se limitan a lo siguiente:

*Procedimiento II*

**[0063]** Usar sulfuro de sodio en lugar de sulfuro de hidrógeno de sodio y ajustar las cantidades de reactivos de acuerdo con reglas bien conocidas por los expertos en la técnica, tales como el aumento de la cantidad de ácido, siguiendo el proceso detallado en el Procedimiento I.



*Procedimiento III*

**[0064]** Usar sulfito de sodio en lugar de metabisulfito de sodio y ajustar la cantidad de reactivos de acuerdo con reglas bien conocidas por los expertos en la técnica, siguiendo el proceso detallado en el Procedimiento I.

*Procedimiento IV*

**[0065]** Usar sulfuro de sodio en lugar de sulfuro de hidrógeno de sodio y sulfito de sodio en lugar de metabisulfito de sodio y ajustar la cantidad de reactivos de acuerdo con reglas bien conocidas por los expertos en la técnica, siguiendo el proceso detallado en el Procedimiento I.

*Procedimiento V*

**[0066]** Usar ácido hidroclórico concentrado en lugar de ácido sulfúrico concentrado con reemplazo mol-per-mole y siguiendo el procedimiento detallado en el Procedimiento I.

*Procedimiento VI*

**[0067]** Usar ácido hidroclórico concentrado en lugar de ácido sulfúrico concentrado con reemplazo mol-per-mol y siguiendo el procedimiento detallado en el Procedimiento II.

*Procedimiento VII*

**[0068]** Usar ácido hidroclórico concentrado en lugar de ácido sulfúrico concentrado con reemplazo mol-per-mol y siguiendo el procedimiento detallado en el Procedimiento III.

*Procedimiento VIII*

**[0069]** Usar ácido hidroclórico concentrado en lugar de ácido sulfúrico concentrado con reemplazo mol-per-mol y siguiendo el procedimiento detallado en el Procedimiento IV.

*Procedimiento IX*

**[0070]** Usar sales de potasio en lugar de sales de sodio y ajustar la cantidad de reactivos de acuerdo con reglas bien conocidas por los expertos en la técnica, y siguiendo el procedimiento detallado en el Procedimiento I.

**[0071]** En algunas realizaciones, los reactivos utilizados en el procedimiento pueden incluir cualquier compuesto que comprenda azufre en el estado de oxidación menos dos y otro compuesto que comprende azufre en el estado de oxidación más cuatro, y opcionalmente un ácido y/o catalizador(es).

**[0072]** En otras realizaciones, la filtración asistida por vacío puede ser reemplazada por filtración y/o centrifugación asistida por presión. En otras realizaciones, se pueden usar reactores cerrados, un sistema de enfriamiento por intercambio de calor puede ser sustituido por la adición de hielo, el secado por pulverización puede sustituir el secado al aire, y se pueden omitir una o más etapas (por ejemplo, lavado con alcohol). Debe entenderse que las realizaciones que implican una escala de operación mayor o menor también están dentro del alcance de la presente invención.

*Caracterización de composiciones altamente biodisponibles ricas en azufre cerovalente*

**[0073]** El rendimiento estándar de producto seco tamizado es de 2,7 kg de un polvo impalpable, inodoro, mullido, amarillo claro, polvo microcristalino con las siguientes propiedades:

- Rango de fusión: la temperatura media de fusión está entre 117°C y aproximadamente 121°C  $\pm$  2-3°C (por ejemplo, la fusión se produce entre 118-120°C, 116-119°C, o entre 119-120°C).
- Contenido de azufre cerovalente (p/p): 90-99,9% (por ejemplo, 91%, 92%, 93,5%, 94%, 96%, 96,5%, 97,1%, 97,5%, 98%, 98,6%, 98,9%, o 99,5%)
- Contenido de azufre alfa elemental (p/p): 90-99,9% (p. ej., 91%, 92%, 93,5%, 94%, 96%, 97,1%, 97,5%, 98%, 98,6%, 98,9% o 99,5%)
- Componentes altamente polares (p/p): 0,01-10% (p. ej., 0,02%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,8%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 5,5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 9,5% o 9,9%)
- Solubilidad en agua a 25°C: 0%,
- Solubilidad en disulfuro de carbono: 87-97%,
- Densidad aparente (roscada):  $\sim$  0,6 g/ml
- Distribución de tamaño de partícula mediana: entre aproximadamente 26 y aproximadamente 33 micrómetros (por ejemplo, 26,5, 27, 27,3, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31,3, 32, 32,5 o 32,9)
- Contenido de sodio:  $\sim$  0,0 al 3%

- Contenido de oxígeno (por diferencia): ~ 0,12%

**[0074]** La composición obtenida mediante la adhesión con el Procedimiento I consta de microcristales ricos en azufre de cerovalencia; Su solubilidad en disulfuro de carbono es más baja que el alfa-azufre (azufre rómbico) y contiene cantidades medibles de sodio y oxígeno. Los patrones de difracción de rayos X de la composición son consistentes con los del alfa azufre.

**[0075]** Los métodos utilizados para obtener los datos descritos aquí incluyen lo siguiente. La solubilidad de la composición en disulfuro de carbono se obtuvo mediante la adición de 6 ml de disulfuro de carbono a 0,500 g del producto final y determinando el peso del residuo. El contenido de azufre cerovalente se midió mediante sulfitolisis, no corrigiendo el hecho de que la sulfitolisis convierte todos los átomos de azufre en  $S_8$  en tiosulfato, pero solo (n-1) átomos de azufre en  $Na^+O_3S-S_n-SO_3^-Na^+$ . El contenido de sodio se determinó por los Galbraith Laboratories, EE. UU. (Procedimiento GLI ME-70). La distribución del tamaño de la partícula se basa en el uso de un analizador de partículas de difracción láser Partica LA-950 de Horiba Instruments.

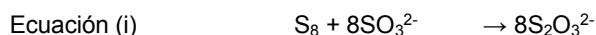
**[0076]** Sin limitarse a ninguna hipótesis, es probable que la alta biodisponibilidad del material anterior se asocia con la naturaleza hidrófila de las superficies de cristal, que a su vez pueden estar relacionadas con la presencia de grupos muy polares como  $^-SO_3Na$  y/o  $=SO_3Na_2$ . Estos grupos pueden ser los presentes en las moléculas de polivionato ( $Na^+O_3S-S_n-SO_3^-Na^+$ , por ejemplo, donde n = 1, 2 o 3), tiosulfatos o sulfatos. Grupos altamente polares como  $^-SO_3Na$  puede estar asociado con las fuentes de agua de hidratación y puede, en algunas circunstancias, someterse a un intercambio catiónico, produciendo, por ejemplo, grupos  $^-SO_3H$ . Además, la hidrofiliidad de la superficie de este material microcristalino único está marcado en contraste con la naturaleza hidrofóbica de la superficie de los cristales de azufre puro elemental o alfa o beta. El azufre elemental o alfa puro en contraste, es completamente soluble en disulfuro de carbono. Además, sin embargo, no es posible que la baja biodisponibilidad del azufre alfa ordinario esté directamente relacionada con la naturaleza hidrofoba de su superficie.

**[0077]** En algunas realizaciones, la composición puede ser de tamaño micro o nano, que comprende partículas ricas en alfa azufre pero siempre modificada para poseer superficies hidrófilas. Composiciones similares también dentro del alcance de la presente invención pueden obtenerse mediante cualquier proceso químico, electroquímico, mecanoquímico, sonoquímico, fotoquímico, asistido por microondas, bioquímico y/o biotecnológico conocido en la técnica. Las composiciones que comprenden azufre beta elemental y grupos polares modificadores de la superficie constituyen además realizaciones de la presente invención. Como se estableció, el alfa azufre elemental se convierte en azufre beta cuando se calienta y viceversa.

*Determinación del contenido de azufre cerovalente en las composiciones ricas en azufre cerovalente altamente biodisponibles*

**[0078]** En un aspecto, el contenido de azufre de cerovalencia de la composición de la invención se puede determinar utilizando el método descrito en el presente documento para medir el porcentaje (p/p) de azufre de cerovalencia en alfa azufre, tiosulfato de sodio, y politionatos de sodio. El método de sulfitolisis para determinar el contenido de azufre cerovalente descrito aquí no corrige el hecho de que la sulfitolisis de las moléculas de poltionato se detiene en el tritionato como se muestra en la ecuación (ii), por lo tanto, uno de los átomos de azufre valentes presentes en cada molécula de poltionato escapa la sulfitolisis y no se convierte en tiosulfato (ecuación (ii)). Sin embargo, dado que el contenido de sodio de la composición descrita en el presente documento es pequeño, el error introducido en el cálculo del % de azufre valiente es, en consecuencia, pequeño. Un análisis detallado de la sulfitolisis se describe en Koh et al., Anal. Sci. 6: 3-14, 1990.

**[0079]** La ecuación (i) y (ii) de reacciones de sulfitolisis proceden como en el método volumétrico para la determinación cuantitativa de azufre elemental en hidrocarburos aromáticos reportados por Morris et al., Anal. Chem. 20: 1037-1039, 1948. El método de sulfitolisis descrito en el presente documento se mejora en comparación con el método de Morris et al. de varias maneras, incluido el uso de cloruro de n-hexadecil piridinio como catalizador de sulfitolisis.



**[0080]** Las soluciones y métodos de preparación de las soluciones de reactivo se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Solución reactiva	Preparación de la solución
Solución acuosa de sulfito de sodio (15% p/p)	Pesar 150 gramos de sulfito de sodio químicamente puro anhidro y disolver en 850 ml de agua destilada.
Solución acuosa de formaldehído (37%).	-
6N HCl	Mida 250 ml de ácido clorhídrico concentrado (aproximadamente 12 N) y diluya a 500 ml con agua destilada.
KI (10% p/p en agua)	Pese 50 gramos de KI químicamente puro y disuélvalo en 450 ml de agua destilada.
0,200N KIO <sub>3</sub>	Pesar 7,134 gramos de KIO <sub>3</sub> anhidro de alta pureza se disuelven en 100 ml de agua destilada y se diluyen a 1 l con agua destilada.
Solución de monohidrato de cloruro de hexadecilpiridinio (1% p/p) en agua	Pese 1 gramo de monohidrato sólido y disuélvalo en 99 ml de agua destilada.
Almidón soluble (5g/L, solución acuosa)	Pesar 1 gramo de almidón soluble, agregar 10 mg de yoduro de mercurio rojo, agregar agua fría para formar una pasta, luego agregar 200 ml de agua hirviendo y hervir durante 1 o 2 minutos mientras se agita. Deje que la solución se enfríe a temperatura ambiente.

**[0081]** Para determinar el contenido de azufre de cerovalencia, pesan 0,160 g  $\pm$  10 mg de la composición en un matraz de 250 ml de Erlenmeyer. Añadir al matraz 100 ml de solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 15%. Coloque el matraz en un baño de agua y aplique calor hasta que hierva el agua. Luego, agregue 0,5 ml de solución de monohidrato de cloruro de hexadecilpiridinio al 1% y continúe calentando hasta que el sólido desaparezca por completo. Permita que el contenido del matraz se enfríe a temperatura ambiente y coloque una barra de agitación magnética en su interior. Durante la agitación, agregue 15 ml de solución de formaldehído, 25 ml de solución 6N, 10 ml de solución de KI al 10% y 1 ml de solución indicadora de almidón soluble al 0,5%. La solución resultante debe ser incolora. Titule el contenido en el matraz con una solución de 0,2N KIO<sub>3</sub> usando una bureta de 25 ml. Cuando comienza la titulación, el contenido del matraz se vuelve de color ámbar, pero el color desaparece rápidamente. A medida que se acerca el punto de equivalencia, tenga mucho cuidado de no sobrepasarse. El punto final es alcanzado cuando una gota de solución de titulación no produce cambio de color.

Ecuación (iii): Reacción de titulación  $\text{IO}_3^- + 5\text{I}^- + 6\text{H}^+ + 6\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 6\text{I}^- + 3\text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 3\text{H}_2\text{O}$

Fórmula (iv):

% azufre cerovalente\* =  $(V_{\text{KIO}_3} \text{ (mL)} \times N_{\text{KIO}_3} \times 32,07 \times 100) / (1000 \times \text{peso de muestra (g)})$

\* susceptible de someterse a sulfitolisis

### Condiciones y trastornos

**[0082]** Las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles descritas en este documento pueden usarse para tratar una enfermedad cardiovascular, enfermedades hiperproliferativas (por ejemplo, cáncer), una enfermedad inflamatoria, diabetes, dislipidemia, enfermedad neurodegenerativa, SIDA, y otras afecciones patológicas asociadas con el estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox y/o disfunción inmune.

**[0083]** En un aspecto, las composiciones de la invención se administran a un sujeto que ya sufre de una enfermedad cardiovascular, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neurodegenerativa, el SIDA, y una condición patológica asociada con el estrés oxidativo y/o un desequilibrio en la homeostasis redox, o cáncer. En otro aspecto, las composiciones de la invención también pueden administrarse a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular, enfermedades hiperproliferativas (por ejemplo, cáncer), una enfermedad inflamatoria, diabetes, dislipidemia, una enfermedad neurodegenerativa, SIDA y otras afecciones patológicas asociadas con estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox y/o disfunción inmune.

### Enfermedades cardiovasculares

**[0084]** Las composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Como se usa aquí, las enfermedades cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a, arteriosclerosis, enfermedad coronaria, isquemia, disfunción del endotelio, en particular aquellas disfunciones que afectan la elasticidad de los vasos sanguíneos, reestenosis, trombosis, angina, hipertensión arterial, cardiomiopatía, hipertensión, enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca, cor pulmonale, arritmias cardíacas, endocarditis, cardiomegalia inflamatoria, miocarditis, infarto de miocardio, enfermedad cardíaca valvular, accidente cerebrovascular y enfermedad cerebrovascular, estenosis de la válvula aórtica, insuficiencia cardíaca congestiva y enfermedad arterial periférica. En un aspecto, la invención incluye métodos para administrar las composiciones ricas en azufre cerovalentes altamente

biodisponibles para el tratamiento crónico. En otro aspecto, la invención también incluye métodos para administrar las composiciones ricas en azufre cerivalentes altamente biodisponibles para el tratamiento agudo.

**[0085]** En realizaciones preferidas, las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles de la invención se restauran y/o mejoran los parámetros cardiovasculares a intervalos normales en un sujeto diagnosticado con o en riesgo de una enfermedad cardiovascular. Los rangos normales de parámetros cardiovasculares incluyen, entre otros, un volumen diastólico final (EDV) de aproximadamente 65-240 ml, un volumen sistólico final (ESV) de aproximadamente 16-143 ml, un volumen sistólico de aproximadamente 55-100 ml, una fracción de eyección de alrededor de 55-70%, una frecuencia cardíaca de aproximadamente 60-100 bpm, y/o el rendimiento cardíaco de aproximadamente 4,0 - 8,0 L/min.

#### *Enfermedades inflamatorias*

**[0086]** Las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles de la invención también pueden usarse para tratar enfermedades inflamatorias. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen, entre otros, acné vulgar, asma, enfermedades autoinmunes (p. ej., encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome antisintetómico), alergia atópica, dermatitis atópica, anemia aplásica autoinmune, cardiomiopatía autoinmune, enteropatía autoinmune, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno, síndrome linfoproliferante autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, neuropatía periférica autoinmunitaria, síndrome de autoinmunidad, linfoma, oclusión de la arteria central, oclusión de la arteria vertebral, púrpura trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmune, uveítis autoinmune, esclerosis concéntrica de Baló, enfermedad de Behçet, enfermedad de Berger, encefalitis de Bickerstaff, síndrome de Blau, penfigoide bulloso, linfoma críptico, osteomielitis multifocal crónica recurrente, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, enfermedad de aglutinina fría, deficiencia del componente 2 del complemento, dermatitis de contacto, arteritis craneal, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, síndrome de Cushing, vasculitis leucocitocítica cutánea, enfermedad de Dego, enfermedad de Dercum, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis sistémica cutánea difusa, síndrome de Dressler, lupus inducido por fármacos, lupus eritematoso discoide, eczema, endometriosis, artritis relacionada con entesitis, fascitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, epidermolisis bullosa adquirida, eritema nudoso, eritroblastosis fetal, crioglobulinemia mezclada esencial, síndrome de Evan, fibrodisplasia, ossificans progresivo, alveolitis fibrosa, gastritis, penfigoide gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barré, encefalopatía de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, púrpura de Schönlein-Henoch, herpes gestacional, hidradenitis supurativa, síndrome de Hughes-Stovin, hipogammaglobulinemia, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía de IgA, miositis corporal de inclusión, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, cistitis intersticial, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad de IgA lineal, lupus eritematoso, síndrome de Ajeed, enfermedad de Meniere, poliangitis microscópica, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, morfea, enfermedad de Mucha-Habermann, miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica, neuromiotonía, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de mioclonos de opsoclonia, tiroiditis de Ord, reumatismo palindrómico, PANDAS, degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria nocturna paroxismal, síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, pars planitis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, encefalomiелitis perivenosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, neuropatía inflamatoria progresiva, artritis psoriásica, pioderma gangrenoso, aplasia pura de glóbulos rojos, encefalitis de Rasmussen, fenómeno de Raynaud, policondritis recurrente, síndrome de Reiter, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, síndrome de Schnitzler, escleritis, escleroderma, enfermedad de suero, síndrome de Sjögren, espondiloartropatía, síndrome de la persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda, síndrome de Susac, síndrome de Sweet, oftalmía simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, trombocitopenia, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerativa, enfermedad de tejido conectivo no diferenciada, espondiloartropatía no diferenciada, vitiligo y granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, prostatitis crónica, glomerulonefritis, hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, artritis reumatoide, sarcoidosis, rechazo de trasplantes, vasculitis, cistitis intersticial y artrosis.

#### *Enfermedades neurodegenerativas*

**[0087]** Las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles de la invención también pueden usarse para tratar enfermedades neurodegenerativas. Las enfermedades neurodegenerativas son cualquier enfermedad que se caracteriza por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluida la muerte de las neuronas. Las enfermedades neurodegenerativas pueden ser causadas por mutaciones genéticas (p. ej., mutación triplete nucleótido CAG), plegamiento incorrecto de proteínas (p. ej., agregación de alfa-sinucleína, proteína tau hiperfosforilada y agregación de beta amiloide), regulación errónea en vías de degradación de proteínas (p. ej., vía de ubiquitina-proteasoma y vías de autofagolisosomas), daño a la membrana, disfunción mitocondrial, defectos en el transporte axonal y regulación errónea de las vías programadas de muerte celular (p. ej., apoptosis, autofagia y citoplásmica). Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, entre otros, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de

Creutzfeldt-Jakob, la afasia progresiva primaria, la parálisis supra-nuclear progresiva, la ataxia espinocerebelosa tipo 3, la demencia de ataxia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, degeneración corticobasal, trastornos priónicos, atrofia sistémica múltiple, paraparesia espástica hereditaria, ataxia de Friedreich y amiloidosis.

5 *Otras afecciones patológicas asociadas con el estrés oxidativo y/o un desequilibrio en la homeostasis redox*

10 **[0088]** Las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de otras condiciones asociadas con el estrés oxidativo, incluyendo pero no limitado a autismo, esquizofrenia, trastorno bipolar, síndrome de X frágil, enfermedad de células falciformes, síndrome de fatiga crónica, la osteoartritis cataratas, degeneración macular, hepatitis tóxica, hepatitis viral, cirrosis, hepatitis crónica, estrés oxidativo por diálisis, toxicidad renal, insuficiencia renal, colitis ulcerosa, infección bacteriana, infecciones virales, como VIH y SIDA, herpes, infección del oído, tracto respiratorio superior enfermedades, hipertensión, calvicie y pérdida de cabello, síndrome de sobre-entrenamiento relacionado con el rendimiento deportivo, eczema, esclerodermia, dermatitis atópica, polimiositis y dermatitis herpetiforme.

15 **[0089]** En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención pueden formularse para la administración tópica y/o administración enteral para el tratamiento de condiciones tales como la psoriasis, pie de atleta, y/o la rosácea. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención altamente biodisponibles y ricas en azufre cerovalente pueden ser útiles para curar heridas al influir en las etapas de la cicatrización, incluidas, entre otras, hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. En otra realización, las composiciones de la invención altamente biodisponibles y ricas en azufre cerovalente también mejoran el rendimiento atlético al aumentar uno o más de los factores de: resistencia, energía, fuerza, agudeza visual y/o coordinación.

20 **[0090]** En otra realización preferida, las composiciones de la invención pueden formularse para la administración enteral para el tratamiento de la infertilidad masculina. El estrés oxidativo juega un papel importante en la etiología de la disfunción del esperma a través de la inducción del daño peroxidativo a la membrana plasmática. Además, el estrés oxidativo afecta la integridad de los espermatozoides genéticos y genomas mitocondriales, lo que lleva a roturas de la cadena de ADN, recombinación aberrante y/o empaquetamiento defectuoso, así como a la reticulación de cromatina. La observación de correlaciones entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por suspensiones de esperma humana lavadas y su capacidad de fertilización son consistentes con la importancia clínica del daño oxidativo en los espermatozoides humanos; este significado se ve reforzado por la demostración de pérdida de la competencia funcional y altas tasas de daño en el ADN de los espermatozoides humanos directa o indirectamente expuestos al peróxido de hidrógeno. Cuando la fuente de ROS es intracelular, muchos de los antioxidantes clásicos que son efectivos contra el estrés oxidativo extracelular (p. ej., NAC y hipsaurina) resultan inútiles.

30 **[0091]** La alta susceptibilidad hacia daño oxidativo irreversible de las células de esperma de mamífero puede atribuirse a: (i) el contenido particularmente alto de ácidos grasos poliinsaturados, plasmalógenos, y esfingomielinas de sus membranas, (ii) la falta de mecanismos de reparación adecuadas para oxidativo daño, derivado de la escasez de enzimas antioxidantes citosólicas asociadas con la pérdida de la mayor parte de su citoplasma tras la espermiación, (iii) el hecho de que las células espermáticas post-epidídimas maduras poseen cromatina nuclear altamente condensada (debido a la sustitución de las histonas por protamina, con aumento de la formación de enlaces disulfuro); esta compacidad contribuye a silenciar los cromosomas paternos, que no pueden participar en la activación transcripcional por ROS, (iv) el hecho de que las células de esperma son particularmente ricas en mitocondrias altamente activas, porque necesitan un suministro constante de energía para apoyar su motilidad. Los espermatozoides fueron las primeras células que generaron niveles significativos de ROS y estas características aumentan la probabilidad de daño de la membrana mitocondrial por ROS filtrados, (v) el hecho de que las proteínas nativas ricas en cisteína (CRISP) contienen un número inusualmente alto de residuos de cisteína tiólicos (no oxidados), que los hacen especialmente sensibles a la inactivación por oxidantes.

40 **[0092]** H<sub>2</sub>S pueden ser utilizados por las células para sintetizar L-cisteína, que puede entonces servir como un bloque de construcción en la síntesis de proteínas, como se describe en Predmore et al., Antioxid Redox Signal. 17: 119-140, 2012. Sin embargo, las dietas deficientes en azufre son comunes y pueden conducir a una deficiencia de cisteína, especialmente en los hombres y, en consecuencia, a deficiencias en la biosíntesis de importantes proteínas ricas en cisteína, como los CRISP. Los CRISP se encuentran solo en vertebrados, dentro del tracto reproductivo masculino. Los CRISP se han implicado en muchos aspectos de la espermatogénesis, así como en el proceso real de fertilización como se informó en Koppers et al., Asian J. Androl. 13: 111-117, 2011, y la regulación a la baja del ARNm de CRISP-2 por un factor de 4,3 en pacientes astenospérmicos se informó recientemente en Jing et al., Natl. J. Androl. 17: 203-207, 2011.

50 **[0093]** Srilatha y otros, J. Sex. Med., 4: 1304-1311, 2007, han descrito algunos estudios pioneros que proporcionan evidencia de la formación endógena de sulfuro de hidrógeno y su efecto relajante proeréctil sobre el cuerpo cavernoso de los mamíferos, así como sobre los efectos del sulfuro de hidrógeno en función sexual femenina. El primer conjunto de resultados fue corroborado por un equipo internacional que incluyó a Louis J. Ignarro, quien ganó el Premio Nobel en 1998 por su trabajo en demostrar las propiedades de señalización del óxido nítrico. También hay evidencia de que el estrés oxidativo está implicado en la disfunción eréctil en roedores diabéticos como se describe en Bivalacqua et al., J. Sex. Medicine. 2:187-197, 2005 e intervenciones basadas en la administración de tetrahidrobiopterina y la

regulación positiva de enzimas antioxidantes pueden ser útiles como se describe en Deng et al., *Methods Mol Biol.* 610: 213-227, 2010 y Minhas et al., *Expert Opin Pharmacother.* 3: 889-897, 2002. Además, un trabajo reciente analiza los efectos del H<sub>2</sub>S endógeno y exógeno en el control fisiológico del tono del pene y la posibilidad de desarrollar nuevas terapias para la disfunción eréctil (DE) que tengan como objetivo esta vía.

**[0094]** Sparatore et al., *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 4: 109-121, 2011 desarrolló un derivado donante de H<sub>2</sub>S de sildenafil (ACS6) con posibles indicaciones clínicas en DE, la hipertrofia prostática benigna y síntomas del tracto urinario bajo. El H<sub>2</sub>S liberado por ACS6 inhibe tanto la fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) como la actividad de expresión de la NADPH oxidasa (NOX), por lo tanto, este mecanismo puede constituir la base de un enfoque nuevo y eficaz para el tratamiento de pacientes que sufren de DE, hipertrofia prostática benigna y síntomas del tracto urinario inferior. De hecho, los estudios realizados por Shukla et al., *BJU Int.* 103: 1522-1529, 2009 mostraron que el ACS6 y el citrato de sildenafil relajaron el músculo liso cavernoso de forma equipotente y el ACS6 inhibió la formación de superóxido y la expresión de p47<sup>phox</sup> (una subunidad de NOX) más que citrato de sildenafil. Se concluyó que el ACS6 no solo promueve la erección, sino que también brinda una protección eficaz contra el estrés oxidativo a través de la regulación de la síntesis de glutatión (GSH).

**[0095]** Además, en una investigación del efecto de NaHS en la contractilidad uterina rata preñada in vitro, Sidhu et al., *Pharmacol Toxicol.* 88: 198-203, 2001 encontraron que este "donante de hidrógeno" producía disminuciones significativas dependientes de la dosis en la contractilidad espontánea uterina.

**[0096]** Showell et al., *Cochrane Database Syst Rev.* 1: CD007411, 2011 evaluaron los efectos de los antioxidantes orales en hombres con daños documentados en el ADN del esperma y/o con parámetros de semen alterados en base a ensayos clínicos en los que los participantes fueron asignados aleatoriamente a antioxidante versus placebo, un antioxidante alternativo, o ningún tratamiento. Los resultados considerados fueron: 1) tasa de natalidad por pareja al azar, 2) tasa de preñez por pareja, 3) tasa de aborto espontáneo por pareja o aborto espontáneo, 4) tasa de muerte fetal por pareja, 5) nivel de daño en el ADN del esperma después del tratamiento, 6) concentración de esperma, 7) motilidad de esperma, y 7) efectos adversos. Los 44 ensayos analizados en esta revisión incluyeron a 2876 parejas, realizados durante un tiempo promedio de tratamiento de 4,1 meses, e incluyeron los siguientes antioxidantes: vitamina B, vitamina C, vitamina E, selenio, magnesio, zinc, zinc más vitamina E, zinc más vitamina E más vitamina C, antioxidantes combinados más minerales (por ejemplo, vitamina C, vitamina E, zinc, selenio, ácido fólico, licopeno y aceite de ajo), L-acetilcarnitina, L-carnitina, L-acetil carnitina más L-carnitina, pentoxifilina, etilcisteína, N-acetilcisteína y ácido docosahexenoico. El estudio concluyó que la suplementación con antioxidantes en hombres subfértiles puede mejorar los resultados de nacimientos vivos y la tasa de embarazo para parejas subfértiles sometidas a tratamiento (ciclos ART). Es necesario realizar comparaciones adicionales entre sí para identificar la superioridad de un antioxidante sobre otro. Estos resultados indican que en la actualidad sólo hay estudios científicamente aceptables limitados que han concluido que la suplementación con antioxidantes en hombres subfértiles puede mejorar los resultados de nacimientos vivos y la tasa de embarazo para parejas subfértiles o las formas disponibles de tratamiento han producido respuestas solo marginalmente satisfactorias, aún en el mejor de los ensayos y que muchos fármacos se están utilizando sin fundamento. Según Cavallini et al, *Asian J. Androl.* 8:143-157, 2006, ningún fármaco puede calificarse de indiscutiblemente efectivo para el tratamiento de oligoastenoteratozoospermia idiopática masculina.

**[0097]** La composición rica en azufre de cerovalencia altamente biodisponible de la invención se utilizó en un ensayo clínico llevado a cabo por investigadores de México (véase el Ejemplo 8) y los resultados fueron muy alentadores por varias razones, incluyendo: una duración de tratamiento de sólo 2,5 meses frente a una promedio de 4,1 meses para todos los ensayos descritos en Showell et al., *Cochrane Database Syst Rev.* 1: CD007411, 2011, y una formulación de un solo componente en lugar de una mezcla miscelánea no optimizada de 7-10 o más ingredientes presuntamente activos.

**[0098]** El estrés oxidativo está asociado con un aumento en la producción de especies oxidantes (por ejemplo, superóxido, peróxidos, radicales libres) y/o una disminución significativa en la eficacia y/o los niveles de las defensas antioxidantes, tales como glutatión. Las composiciones de la invención altamente biodisponibles y ricas en azufre de la invención, cuando se administran, actuarán de manera deseable para restaurar los niveles de cisteína y glutatión, restaurando así la homeostasis redox en el cuerpo.

#### *Diabetes*

**[0099]** Las composiciones de la invención también pueden ser útiles para tratar la diabetes y sus complicaciones. La diabetes puede ser cualquier enfermedad metabólica en la que una persona tenga un alto nivel de azúcar en la sangre, ya sea porque el cuerpo no produce suficiente insulina o porque las células no responden a la insulina que se produce. Los ejemplos no limitativos de diabetes incluyen diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, diabetes gestacional, diabetes congénita, diabetes relacionada con la fibrosis quística, diabetes esteroide, diabetes autoinmune latente de adultos y diabetes monogénica. Las complicaciones asociadas con la diabetes incluyen, entre otras, hipoglucemia, cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar no cetósica, enfermedad cardiovascular, insuficiencia renal crónica, nefropatía diabética, neuropatía diabética, problemas de los pies relacionados con la diabetes (p. ej., úlceras del pie diabético) y retinopatía diabética.

*Cánceres*

**[0100]** Otras condiciones que pueden ser tratadas utilizando las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles de la invención incluyen cánceres. Los cánceres generalmente se caracterizan por el crecimiento celular no regulado, la formación de tumores malignos y la invasión a partes cercanas del cuerpo. Los cánceres también pueden diseminarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. Los cánceres pueden ser el resultado de daño genético debido al uso del tabaco, ciertas infecciones, radiación, falta de actividad física, obesidad y/o contaminantes ambientales. Los cánceres también pueden ser el resultado de fallas genéticas existentes dentro de las células para causar enfermedades debido a la herencia genética. Las pruebas de detección se pueden usar para detectar cánceres antes de que aparezcan síntomas notorios y se puede administrar tratamiento a las personas que corren mayor riesgo de desarrollar cánceres (por ejemplo, personas con antecedentes familiares de cáncer). Los ejemplos de técnicas de detección del cáncer incluyen, entre otros, exámenes físicos, análisis de sangre u orina, imágenes médicas y/o pruebas genéticas. Ejemplos no limitativos de cánceres incluyen: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon y recto, cáncer de endometrio, cáncer de células renales o renales, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de ovario, estómago cáncer, enfermedad del desgaste y cáncer de tiroides.

*Trasplantes*

**[0101]** Se espera que la composición rica en azufre cerovalente de la invención sea eficaz en el tratamiento de lesión por isquemia-reperusión de procedimientos de reconstrucción y el trasplante. Las dispersiones acuosas de partículas finas de la composición rica en azufre cerovalente pueden usarse para tratar colgajos de tejido de cirugía plástica o reconstructiva y órganos sólidos de trasplantes para prevenir/minimizar el daño por isquemia-reperusión y para proteger las mitocondrias durante los procedimientos operativos. Los tejidos y órganos ejemplares a tratar usando la composición de la invención tienen un metabolismo activo y una función mitocondrial incrementada y son susceptibles a lesiones por reperusión después de breves períodos de isquemia e incluyen, entre otros, a; músculo esquelético, el corazón, el hígado, el intestino grueso, el intestino delgado, el cerebro, la piel, las extremidades (por ejemplo, brazos, piernas, pies, manos).

**Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento.**

**[0102]** La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles o una combinación de una de las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles descritas en este documento y un segundo agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco antiplaquetario, un bloqueador  $\beta$ , un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o bloqueador del receptor de la angiotensina (BRA), una estatina, fibratos, biguanidas, agentes reductores de la presión arterial, citocinas, agentes reductores del colesterol, medicamentos para la disfunción eréctil, medicamentos antiinflamatorios, medicamentos contra la trombosis, medicamentos contra el cáncer, medicamentos contra la diabetes y/o suplementos dietéticos).

**[0103]** Una composición de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración parenteral, intranasal, tópica, oral o local, tal como por un medio transdérmico, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea), o por ingestión oral, o por aplicación tópica o inyección intraarticular en áreas afectadas por la afección vascular o del cáncer. Las vías de administración adicionales incluyen la administración por inhalación intravascular, intraarterial, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural, así como nasal, oftálmica, intraescleral, intraorbital, rectal, tópica o en aerosol. La administración de liberación sostenida también se incluye específicamente en la invención, por medios tales como inyecciones de depósito o implantes o componentes erosionables. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden los agentes antes mencionados disueltos, dispersados colooidalmente o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tampones, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

**[0104]** La composición terapéutica puede estar en la forma de una solución, dispersión colooidal, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión, o un dispositivo de suministro para la implantación o se pueden presentar como un polvo seco para ser utilizado como tal o para ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. La composición puede estar en forma de comprimido, cápsula (p. ej., cápsula de gelatina dura y cápsula de gelatina blanda), líquido o tableta de liberación sostenida para administración oral; o un líquido para administración intravenosa, intratecal, subcutánea o parenteral; o una crema o ungüento para administración tópica, o un polímero u otro vehículo de liberación sostenida para administración local.

**[0105]** Los métodos bien conocidos en la técnica para hacer formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. AR Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. El polímero de lactida biocompatible, biodegradable, el copolímero de lactida/glicolida, o los copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno se pueden usar para controlar la liberación de las sustancias. Las formulaciones de nanopartículas (p. ej., nanopartículas biodegradables, nanopartículas de lípidos sólidos, liposomas) pueden usarse para controlar la biodistribución de las sustancias. Otros sistemas de administración potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, bombas intratecales, sistemas de infusión implantables y liposomas. La concentración de la sustancia en la formulación varía dependiendo de una serie de factores, incluida la dosis del fármaco a administrar y la vía de administración.

**[0106]** Para administrar una composición de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir la composición con, o co-administrar la composición con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, la composición puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7: 27-41, 1984). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones coloidales inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica y se incluye en la invención, excepto cuando cualquier medio o agente convencional no es compatible con la sustancia activa. También se pueden incorporar sustancias activas suplementarias en las composiciones.

**[0107]** Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una suspensión, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, vaselina (por ejemplo, Vaseline®), poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, formulado a diferentes porcentajes (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50% en peso en un medio de dispersión descrito aquí). La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Las dispersiones coloidales pueden estabilizarse mediante la adición de agentes bien conocidos en la técnica.

**[0108]** Las composiciones de la invención pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse de forma estéril. Las dispersiones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tal, o liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones típicamente estará entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y lo más preferiblemente entre 7 y 8, tal como 7 a 7,5. Las composiciones resultantes en forma sólida o semisólida pueden envasarse en múltiples unidades de dosis única, cada una de las cuales contiene una cantidad fija de la composición, tal como en un paquete sellado de comprimidos o cápsulas. La composición en forma sólida también se puede empaquetar en un contenedor para una cantidad flexible, como en un tubo comprimible diseñado para una crema o pomada de aplicación tópica.

**[0109]** Las formulaciones preferidas de la invención incluyen pero no se limitan a: preparación de cápsulas de gelatina duras que contienen 100-400 mg de una composición rica en azufre de cerovalencia altamente biodisponible de la invención, la preparación de una suspensión de aproximadamente 5-20% (5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 8%, 10%, 15%, 17% o 19%) de una composición de la invención altamente biodisponible y rica en azufre y con contenido de azufre (por ejemplo, Vaseline®) o polietilenglicol, o una dispersión coloidal de aproximadamente 5-20% (5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 8%, 10%, 15%, 17% o 19%) de composición rica en azufre cerovalente altamente biodisponible de la invención en agua o aceite.

**[0110]** Suspensiones coloidales inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido opcionalmente por microfiltración de esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden administrarse una o dos veces a la semana mediante inyección subcutánea o una o dos veces al mes mediante inyección subcutánea.



**[0111]** Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico o profiláctico deseado, opcionalmente en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y (a) las características únicas de la sustancia activa y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se debe lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la composición de dicha sustancia activa para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

**[0112]** Cuando las sustancias de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 1 a 100% (más preferiblemente, 10 a 100%, como 90 a 100%) de ingrediente activo, opcionalmente en combinación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

**[0113]** Las composiciones que contienen una cantidad eficaz se pueden administrar para tratamientos profilácticos o terapéuticos. En aplicaciones profilácticas, las composiciones se pueden administrar a un paciente con una predisposición determinada clínicamente o una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades hiperproliferativas (p. ej., cáncer), enfermedades inflamatorias, diabetes, dislipidemia, enfermedades neurodegenerativas, SIDA y otras enfermedades patológicas. afecciones asociadas con el estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox y/o disfunción inmune. Las composiciones de la invención se pueden administrar al paciente (por ejemplo, un ser humano) en una cantidad suficiente para retrasar, reducir o, preferiblemente, prevenir la aparición de la enfermedad clínica. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente (por ejemplo, un ser humano) que ya padece una enfermedad cardiovascular, enfermedades hiperproliferativas (por ejemplo, cáncer), una enfermedad inflamatoria, diabetes, dislipidemia, una enfermedad neurodegenerativa, SIDA y otras afecciones patológicas asociadas. con estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox y/o disfunción inmune, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr este propósito se define como una "dosis terapéuticamente eficaz", una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente algún síntoma asociado con una enfermedad o una afección médica. Por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, enfermedades hiperproliferativas (por ejemplo, cáncer), una enfermedad inflamatoria, diabetes, dislipidemia, una enfermedad neurodegenerativa, SIDA y otras afecciones patológicas asociadas con el estrés oxidativo, un desequilibrio en la homeostasis redox, y/o disfunción inmune, un agente o sustancia que disminuye, previene, retrasa, suprime o detiene cualquier síntoma de la enfermedad o afección sería terapéuticamente eficaz. No se requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o sustancia para curar una enfermedad o afección, pero proporcionará un tratamiento para una enfermedad o afección tal que el inicio de la enfermedad o afección se demore, se dificulte o prevenga, o mejoran los síntomas de la enfermedad o afección, o se modifica el término de la enfermedad o afección o, por ejemplo, es menos grave o la recuperación se acelera en un individuo.

**[0114]** Las composiciones y formulaciones de la presente invención se pueden usar en combinación con cualquiera de los métodos convencionales de tratamiento o terapia o pueden ser utilizados por separado de los métodos convencionales de tratamiento o terapia. Cuando las sustancias y formulaciones de esta invención se administran en terapias de combinación con otros agentes, pueden administrarse de forma secuencial o concurrente a un individuo. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención incluyen una combinación de una sustancia o formulación de la presente invención opcionalmente en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describe en este documento, y otro agente terapéutico o profiláctico conocido en la técnica.

**[0115]** Los agentes formulados pueden ser empaquetados juntos como un kit. Los ejemplos no limitativos incluyen kits que contienen, por ejemplo, dos píldoras, una píldora y un polvo, un supositorio y un líquido en un vial, dos cremas tópicas, etc. El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a los pacientes, como los viales para reconstituir las formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV personalizados, inhaladores, etc. Además, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. El kit puede fabricarse como una dosis unitaria de uso único para un paciente, usos múltiples para un paciente particular (a una dosis constante o en la que los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que avanza la terapia); o el kit puede contener dosis múltiples adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("empaquete a granel"). Los componentes del kit se pueden ensamblar en cajas de cartón, envases tipo blister, botellas, tubos y similares.

## Dosificación

**[0116]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las

composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de absorción del agente particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, sustancias y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Un médico o veterinario que tenga experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar las dosis de las sustancias de la invención empleadas en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será la cantidad de la sustancia que sea la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Preferiblemente, la dosis diaria efectiva de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria.

**[0117]** Los niveles de dosificación terapéuticos preferidos son de entre aproximadamente 800 mg a aproximadamente 1600 mg (por ejemplo, 800, 850, 900, 1000, 1050, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1550, y 1600 mg) de composición rica en azufre cerivalente activa por día administrada por vía oral a adultos de peso promedio afectado con la mayoría de los síntomas, síndromes y condiciones patológicas descritas en el presente documento, los niveles de dosificación profilácticos preferidos están entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 1200 mg (por ejemplo, 110, 140, 200, 250, 300, 350, 400, 460, 700, 750, 800, 900, 1000, 1100 y 1150 mg). En el cáncer, el SIDA y algunas patologías crónicas o refractarias, los niveles de dosis orales preferidos son 2400 mg por día o más (por ejemplo, 2450, 2500, 3000, 3500, 4000, 8000 mg, 1 g) para un adulto de peso promedio. Para los niños con cáncer, la dosis puede ajustarse (por ejemplo, la dosis puede incrementarse gradualmente hasta que aparezcan signos de toxicidad gastrointestinal, como diarrea o náuseas). En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención altamente biodisponibles y ricas en azufre cerivalentes son extremadamente seguras para la administración oral y la mayoría de los pacientes pueden tolerar dosis más altas a medida que avanza el tratamiento.

**[0118]** En otras realizaciones, las composiciones de la invención altamente biodisponibles y ricas en azufre cerivalentes son seguras para la administración tópica. Las formas de dosificación aceptables para administración tópica pueden formularse como cremas, lociones, pastas, geles y/o ungüentos que contienen las composiciones altamente biodisponibles y ricas en azufre cerivalentes.

**[0119]** Las formas de dosificación final adecuadas para la administración a sujetos humanos pueden comprender una de las composiciones ricas en azufre-cero altamente biodisponibles como agente farmacológicamente activo o comprender además otros agentes activos tales como ácido alfa-lipoico, carnitina, tartrato de carnitina, fumarato de carnitina, coenzima Q10, selenio, ácido alfa-cetoglutarico, alfa-cetoglutarato de potasio, alfa-cetoglutarato de alfa-dietilo, ácido oxaloacético, oxaloacetato de sodio, oxaloacetato de dietilo, 2-oxo-3-(etoxicarbonil)ácido pentanodiolo éster dietílico, L-cistina, paracetamol, un fármaco sulfa, un AINE, un corticosteroide, taurina, una vitamina, un prebiótico, otro fármaco anticanceroso, que incluye pero no se limita a otro mitocan (p. ej., un fármaco dirigido a la cadena de transporte de electrones mitocondriales), agentes alquilantes (p. ej., procarbazona, dacarbazina, alretamina, cisplatino), metotrexato, antagonistas de purina (por ejemplo, mercaptopurina, tioguanina, cladribina, pentostatina), antagonistas de pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo, citarabina, azacitidina), alcaloides vegetales (p. ej., vinblastina, etoposido, topotecán), agentes hormonales (p. ej., tamoxifeno, flutamida), antibióticos (p. ej., doxorubicina, daunorubicina, mitomicina, bleomicina) y mitocanos (p. ej., dicloroacetato de sodio y ácido 3-bromopirúvico).

### Comida médica

**[0120]** La presente invención también se refiere a composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles como alimento médico para la ingesta diaria y para mantener y promover la salud general. La evidencia indica que la ingesta diaria por parte de un adulto de un peso promedio de aproximadamente 800 mg de la composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible descrita en este documento durante períodos prolongados es segura y beneficiosa para la salud porque produce una reducción marcada en la frecuencia y severidad de la digestión e infecciones respiratorias (p. ej., de origen viral y bacteriano) y episodios alérgicos. Ingesta diaria de la composición de la invención también se asocia con una probabilidad muy reducida de padecer cáncer, SIDA, una condición neurodegenerativa, accidente cerebrovascular, diabetes y sus complicaciones, enfermedad cardiovascular y confiere protección contra daños cardiovasculares, cerebrovasculares, gástricos y hepáticos causados por xenobióticos, incluidos medicamentos como paracetamol, corticosteroides, AINE y antirretrovirales, toxinas y venenos (p. ej., cianuro, talio, metanol). La ingesta diaria de la composición de la invención también puede resultar en un crecimiento más rápido del cabello y las uñas, una piel más firme, un efecto prebiótico y una sensación de bienestar general.

**[0121]** En un aspecto, las composiciones de la invención altamente biodisponibles y ricas en azufre cerivalentes se usan como una paravitamina para proporcionar una fuente suplementaria de cisteína y sus derivados. La cisteína y sus derivados (p. ej., glutación, taurina, conjugados de taurina con ácidos biliares, sulfuro de hidrógeno e iones de sulfato) desempeñan un papel similar al de las vitaminas. Al igual que las vitaminas antioxidantes, la cisteína y sus derivados desempeñan un papel en el equilibrio oxidante/antioxidante e indirectamente en la regulación de los

procesos metabólicos. La suplementación con cisteína encima de la dieta normal puede tener varios efectos beneficiosos, por ejemplo, la suplementación con cisteína puede llevar a un aumento en la función muscular, función inmune, concentración de albúmina en plasma y una disminución en la concentración de TNF- $\alpha$ . La suplementación también puede restaurar los depósitos corporales de cisteína y niveles de glutación, que son fuerzas impulsoras detrás de múltiples procesos relacionados con el envejecimiento.

[0122] En otro aspecto, las paravitaminas son alimentos médicos que proporcionan una cantidad mínima de calorías y la cantidad máxima de una forma biodisponible de azufre destinadas a los seres humanos que no reciben suficiente de azufre en sus dietas. Los estudios de un ensayo clínico preliminar mostraron que en 120 hombres y mujeres participantes que recibieron una composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente como una paravitamina, la mayoría de los participantes notaron un crecimiento más rápido del cabello y las uñas. Además, la evidencia obtenida de experimentos in vivo mostró que en los mamíferos, el sulfuro de hidrógeno, el sulfuro de sulfano y los niveles de glutación aumentan en la sangre y en los tejidos tras la administración de composiciones ricas en azufre altamente biodisponibles como paravitaminas.

[0123] En realizaciones preferidas, la composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible se convierte rápida y eficientemente en sulfuro de hidrógeno en el cuerpo, que a su vez se transforma en gran parte en L-cisteína. La L-cisteína se puede usar como un bloque de construcción en la síntesis de péptidos, enzimas y otras proteínas y pequeñas biomoléculas que contienen azufre (por ejemplo, queratina que constituye el 14% del cabello y las uñas, por ejemplo, glutatión, un tripéptido necesario para regular y potenciar) La función inmune y para la protección celular contra oxidantes, electrófilos, por ejemplo, taurina, que es esencial para la función cardiovascular, el desarrollo y la función del músculo esquelético, la retina, el sistema nervioso central, es un componente importante de la bilis, tiene muchos elementos biológicos fundamentales. Funciones como la conjugación de ácidos biliares, antioxidantes, osmorregulación, estabilización de la membrana y modulación de la señalización del calcio, por ejemplo, sulfato, que es necesario para la síntesis de cartílago y para la desintoxicación de muchos fármacos, incluidos, entre otros, corticosteroides y acetaminofeno).

[0124] En otra realización, la composición rica en azufre cerivalente se transforma y almacena como sulfuro de azufre. El sulfuro de azufre es usado convenientemente por el cuerpo como un precursor altamente versátil del sulfuro de hidrógeno que libera fácilmente sulfuro de hidrógeno en cualquier momento y lugar donde esta especie sea necesaria para activar genes protectores, bloquear la inflamación y proteger las células del daño de los radicales libres.

[0125] En otra realización más preferida, la duración máxima de la vida humana se puede aumentar más allá del límite anterior proporcionando composiciones de la invención como paravitaminas, los niveles de glutación serán restaurados a un nivel normal en las células del sistema inmune normalizando de este modo la función del sistema inmunológico y la restauración de la salud y el bienestar.

#### Antídotos

[0126] La presente invención también se refiere a composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles como antídotos para diferentes venenos y sobredosis de drogas. La composición de la invención se puede usar como un antídoto para el envenenamiento por cianuro. La intoxicación por cianuro puede ocurrir por inhalación y/o ingestión de compuestos de cianuro venenosos (p. ej., gas cianuro de hidrógeno, cianuro de potasio y cianuro de sodio), exposición constante a pesticidas e insecticidas que contienen compuestos de cianuro venenosos, humo de tabaco, inhalación de humo de incendios de edificios y alimentos que incluyen almendras, semillas de albaricoque, tapioca, yuca, mandioca, y semillas de manzana. Los signos de envenenamiento por cianuro pueden incluir, entre otros, parálisis permanente, lesiones nerviosas, hipotiroidismo, abortos espontáneos, debilidad, daño hepático leve y daño renal leve.

[0127] La composición de la invención puede ser utilizada como un antídoto para sobredosis de drogas incluyendo pero no limitado a la sobredosis de acetaminofeno y sobredosis de drogas sulfa (por ejemplo, sulfametoxazol, fulfisolmidina, diclorofenamida, acetazolamida, bumetanida, clortalidona, clopamida, furosemida, hidroclorotiazida, mefrusida, metolazona, xipamida, acetazolamida, etoxzolamida, sultiame, zonisamida, mafenida, sumatriptán, fulasalazina, tipranavir y probenecid).

#### Terapias combinadas

[0128] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes (por ejemplo, un fármaco antiplaquetario, un bloqueador  $\beta$ , un inhibidor de ACE o ARB, una estatina, fibratos, biguanidas, agentes que disminuyen la presión arterial, citoquinas, agentes reductores del colesterol, medicamentos para la disfunción eréctil, medicamentos antiinflamatorios, medicamentos contra la trombosis, medicamentos contra el cáncer, medicamentos contra la diabetes y/o suplementos dietéticos) dependiendo de la condición a tratar.

*Medicamentos de prevención para enfermedades cardiovasculares.*

**[0129]** Las composiciones de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más fármacos que se usan como fármacos de prevención secundaria para enfermedades cardiovasculares. Ejemplos de fármacos preventivos incluyen, pero no se limitan a, los bloqueadores beta (por ejemplo, agentes no selectivos, por ejemplo, alprenolol, carteolol, oxprenolol, sotalol, timolol, por ejemplo, agentes selectivos  $\beta_1$ , por ejemplo, acebutolol, betaxolol, celiprolol, metoprolol, por ejemplo, los agentes selectivos  $\beta_2$ , por ejemplo, butaxamina, por ejemplo, los agentes selectivos  $\beta_3$  por ejemplo, SR 59230A), las estatinas (por ejemplo, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pravastatina, simvastatina y rosuvastatina), fibratos por ejemplo, bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, gemfibrozilo y fenofibrato), biguanidas (por ejemplo, metformina, fenformina, buformina y proguanil) e/o inhibidores de la ECA (por ejemplo, agentes que contienen sulfhidrilo, por ejemplo, captopril, zofenopril, por ejemplo), agentes que contienen dicarboxilato, por ejemplo, enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, imidapril, por ejemplo, agentes que contienen fosfato, por ejemplo, fosinopril).

#### *Medicamentos para el tratamiento de la disfunción eréctil.*

**[0130]** La composición rica en azufre de cerovalencia altamente biodisponible de la invención se puede administrar en combinación con uno o más fármacos para el tratamiento de la disfunción eréctil. Los ejemplos de medicamentos para el tratamiento de la disfunción eréctil incluyen, entre otros, sildenafil, tadalafil, vardenafil, alprostadil, avanafil y yohimbina.

#### *Fármacos antineurodegenerativos.*

**[0131]** La composición rica en azufre de cerovalencia altamente biodisponible de la invención se puede administrar en combinación con uno o más fármacos anti-neurodegenerativos. Los ejemplos de fármacos antineurodegenerativos incluyen, entre otros, inhibidores de la acetilcolinesterasa (p. ej., donepezilo, galantamina y rivastigmina), agente antiglutamato (p. ej., amantadina, GABA-érgico, ácido valproico), reserpina, tetrabenazina, neurolépticos típicos/atípicos, antidepresivos tricíclicos, ISRS, carbamazepina, baclofeno, tizanidina y lamotrigina.

#### *Medicamentos antiinflamatorios*

**[0132]** La composición rica en azufre de cerovalencia altamente biodisponible de la invención se puede administrar en combinación con uno o más fármacos anti-inflamatorios. Los ejemplos de medicamentos antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, esteroides (por ejemplo, glucocorticoides, por ejemplo, corticosteroides), medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINE) (por ejemplo, aspirina, diflunisal, salsalato, ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, sulindac, etodolaco, ketorolaco, nabumetona, piroxicam, meloxicam, tenoxicam, ácido mefenámico, ácido flufenámico, ácido tofenámico, adenfacto, etc. Derivados anti-inflamatorios inmunoselectivos (ImSAID) (por ejemplo, fenilalanina-glutamina-glicina (FEG) y su forma D-isómera (FEG)), y/o hierbas (por ejemplo, Harpagophytum, hisopo, jengibre, cúrcuma, árnica montana y corteza de sauce)

#### *Suplementos dietéticos*

**[0133]** La composición de la invención puede administrarse en combinación con uno o más suplementos dietéticos para promover y/o mantener la salud general. Los ejemplos de suplementos dietéticos incluyen, entre otros, una vitamina (p. ej., Vitamina A, Vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, Vitamina C, Vitamina D, Vitamina E y Vitamina K), un mineral (por ejemplo, potasio, cloro, sodio, calcio, magnesio, fósforo, zinc, hierro, manganeso, cobre, yodo, selenio y molibdeno), una hierba o botánica (por ejemplo, hierba de San Juan, kava, Shilajit y hierbas medicinales chinas), un aminoácido (p. ej., glicina, serina, metionina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, triptófano y fenilalanina) y un concentrado, constituyente, extracto, y/o una combinación de cualquiera de los anteriores.

#### *Medicamentos anticancerígenos/antiproliferativos.*

**[0134]** La composición rica en azufre de cerovalencia altamente biodisponible puede formularse o administrarse en combinación con uno o más fármacos anticancerígenos. Los ejemplos de agentes anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a: agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, trióxido de arsénico, cisplatino, carboplatino, clorambucil, melfalán, nedaplatino, oxaliplatino, tetranitrato de triplatino, satraplatino, imatinib, nilotinib, dasatinib, y radicicol) por ejemplo, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, tacrolimus), metilprednisolona, corticosteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina, mizoribina, deoxispergualin, brequinar, moduladores de receptores de células T, y citoquinas moduladoras del receptor), agentes antiangiogénicos (p. ej., bevacizumab, suramin, y los síntomas de las partes), inhibidores de la mitosis (p. ej., paclitaxel, vinorelbina, docetaxel, abazitaxel, ixabepilona, larotaxel, ortataxel, tesetaxel, vinblastina, vincristina, vinflunina, y vindesina), análogos nucleósidos (ej., gemcitabina, azacitidina, capecitabina, carmofur, cladribina, clofarabina, citarabina, decitabina, floxuridina, fludarabina, fluorouracil, mercaptopurina, pentostatin, tegafur, y tioguanina), agentes de intercalado de ADN (p. ej., doxorubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, y plicamicina), inhibidores de topoisomerasa (irinotecan, aclarubicina, amrubicina, belotecan, camptotecina, daunorubicina, epirubicina, etopósido, idarubicina, mitoxantrona, pirarubicina, pixantrona, rubitecan, tenipósido, topotecan, valrubicina, y zorubicina), antimetabolitos de folato (p. ej., pemetrexado, aminopterina, metotrexato, pralatrexato, y raltitrexado), mitocanos (por ejemplo, dicloroacetato de sodio y ácido 3-bromopirúvico) y otros agentes de direccionamiento (por ejemplo, agentes

que atacan enzimas o proteínas particulares involucradas en el cáncer o agentes que atacan órganos o tipos de cáncer en particular), y combinaciones de los mismos.

## EJEMPLOS

**[0135]** Las composiciones ricas en azufre de cerovalencia altamente biodisponibles de la invención y sus usos se ilustrarán ahora por medio de los siguientes ejemplos no limitativos. Estos ejemplos se exponen simplemente con fines ilustrativos y se pueden usar muchas otras variaciones.

### Metodos experimentales

#### *Muestras de sangre humana de pacientes con insuficiencia cardíaca*

**[0136]** Las muestras de suero se obtuvieron de un tejido cardíaco y un biorepositorio de sangre en la Universidad de Louisville. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Louisville. Las muestras obtenidas después del consentimiento informado de pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada que se sometieron a la colocación del dispositivo de asistencia de VI. Se obtuvieron muestras de suero adicionales de pacientes de control de un proveedor comercial (Innovative Research).

#### *Animales experimentales*

**[0137]** Se desarrollaron ratones deficientes en CSE (KO) (fondo C57/Sv129) y ratones Tg de CSE restringido cardíaco (MHC restringido) (fondo C57BL/6J) como se describe en Levy et al., The New England Journal of Medicine. 322: 1561-1566, 1990; Heineke et al., Nature reviews. Molecular Cell Biology. 7: 589-600, 2006. Se compraron ratones C57BL/6J macho de 8-10 semanas de edad de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Instituto para el Comité de Uso y Cuidado de Animales en la Escuela de Medicina de la Universidad de Emory y se ajustaron a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por los Institutos Nacionales de la Salud (Publicación NIH N° 86-23, revisada en 1996), y con regulaciones federales y estatales.

#### *Protocolo de constricción aórtica transversal (CAT)*

**[0138]** Para crear la sobrecarga de presión, el procedimiento de CAT se realizó en ratones de 10-14 semanas de edad. Los ratones se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg) y la temperatura corporal central se mantuvo en el rango normal (36-37°C). Los ratones se intubaron luego por vía oral y se colocaron en un ventilador de roedores para mantener la respiración durante el procedimiento quirúrgico. Se incidió el segundo músculo intercostal para visualizar el arco aórtico. Tras la identificación y disección del arco aórtico, se colocó una sutura de seda 7-0 alrededor del arco aórtico entre el tronco braquiocefálico y la arteria carótida izquierda y se ligó alrededor de una aguja roma de 27G. La aguja se retiró inmediatamente después de la ligadura. El tórax se cerró quirúrgicamente y los ratones se colocaron en una cámara de recuperación con 100% de oxígeno junto con una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal central dentro de los límites normales. Al final del protocolo experimental (es decir, 6 o 12 semanas después de la cirugía CAT), los ratones se sometieron a eutanasia y se recogieron muestras de corazón, pulmón y sangre.

#### *Donante de sulfuro de hidrógeno*

**[0139]** Se administró en la dieta a ratones una composición rica en azufre cerovalente (SG-1002, que contenía aproximadamente el 99% de azufre cerovalente, que se funde entre 119 y 120°C) en ratones para lograr dosis de 20 mg/kg/día en ratones C57BL/6J o 40 mg/kg/día en ratones KO CSE una semana antes del procedimiento CAT y se continuó hasta 12 semanas después de CAT. Además, algunos ratones C57BL/6J que recibieron la dieta SG-1002 se colocaron en la dieta de control a la semana o 3 semanas después de la CAT.

#### *Ecocardiografía*

**[0140]** A los 2 días anteriores al procedimiento CAT, ecocardiograma transtorácico en línea de base se realizó usando la sonda de 30 MHz en un Vevo 2100 (VisualSonics) bajo anestesia con isoflurano (0,25 a 0,50%) suplementado con 100% de O<sub>2</sub>. Tras el procedimiento de TAC, también se realizó una ecocardiografía de la misma manera durante hasta 12 semanas. Para determinar la estructura y función cardíaca, dimensión diastólica del extremo septal intraventricular (IVSd), dimensión diastólica del extremo VI (LVEDD), dimensión sistólica final VI (LVESD) y la fracción de eyección VI (LVEF) se analizaron a partir de imágenes en modo M.

#### *Medición de sulfuro de hidrógeno y azufre de sulfano*

**[0141]** Los niveles de sulfuro de hidrógeno y sulfuro de sulfano se midieron en el corazón y la sangre de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Para el tejido del corazón, la cantidad de H<sub>2</sub>S se informa como peso húmedo nmol/mg. Para la sangre, la cantidad de H<sub>2</sub>S se informa como µm.

*Análisis de transferencia Western*

**[0142]** Se realizó un análisis de transferencia Western como se describe en Li et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51: 169-187, 2011. Se cargaron cantidades iguales de proteína en los carriles de geles de poliacrilamida-SDS. Los geles se sometieron a electroforesis, seguido de la transferencia de la proteína a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó y se sondó con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. A continuación se procesaron las inmunotransferencias con anticuerpos secundarios (anti-conejo, anti-pollo o anti-ratón, señalización celular) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se sondearon las inmunotransferencias con un kit de reactivos de quimioluminiscencia ECL+Plus (GE Healthcare) para visualizar la señal, seguido de la exposición a una película de rayos X (Denville Scientific). La película fue escaneada para hacer una copia digital y se realizó un análisis densitométrico para calcular la intensidad relativa con el software ImageJ de los Institutos Nacionales de la Salud (versión 1,40g) usando la función Rodbard. Las membranas se incubaron con el anticuerpo fosfo-específico primero. Las membranas se separaron y se incubaron con el anticuerpo total específico. Los resultados se presentan como la proporción de la expresión de proteína fosforilada a proteína total. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Para cada membrana, la intensidad relativa de cada banda se normalizó al valor de la banda más débil (la intensidad más pequeña). Los valores para cada muestra individual se promediaron para obtener un valor para cada muestra. Los valores para cada grupo se promediaron y luego se normalizaron a la media del grupo de control (Simulacro)

*Medición miocárdica de metabolitos NO*

**[0143]** El análisis de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) del tejido cardíaco se determinó mediante cromatografía iónica (Analizador ENO20, Eicom) como se describe previamente en Li et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51:169-187, 2011.

*Mediciones séricas de VEGF y BNP*

**[0144]** Los niveles séricos de VEGF (kit VEGF ELISA, R&D Systems) y péptido natriurético cerebral (BNP) (kit BNP EIA, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) se determinaron mediante ELISA en las 6 y/o 12 semanas CAT siguientes.

*Ensayo de respiración cardíaca mitocondrial*

**[0145]** Las mitocondrias del miocardio fueron aisladas y la capacidad respiratoria mitocondrial se evaluó usando métodos conocidos en la técnica. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, y los corazones fueron rápidamente extirpados y colocados en un tampón de aislamiento enfriado en hielo (sacarosa 300 mM, Tris 20 mM, EGTA 2 mM, ATP 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, y 1% de BSA libre de grasa). Los corazones se cortaron finalmente y se homogeneizaron con un rasgado de tejido (Biospec Products, Bartlesville, OK) a una velocidad baja a media durante ~10 s. Los homogeneizados se centrifugaron durante 3 minutos a 2.500 rpm. El supernatante se recogió y se centrifugó durante 5 minutos a 9.000 rpm. El texto se descartó, y el sedimento se resuspendió en un tampón de aislamiento y se centró durante 5 minutos a 10.000 rpm y se repitió dos veces más. El sedimento final se suspendió en 100 ml de tampón de aislamiento. La concentración de proteína se determinó mediante un kit de ensayo de proteína Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El consumo de  $\text{O}_2$  de mitocondrias aisladas (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se controló usando un electrodo de tipo Clark oxígeno (Hansatech Instruments, Amesbury, MA). Las mitocondrias se incubaron en tampón de respiración (KC1 100 mM, sacarosa 25 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM, glutamato 10 mM y malato 2,5 mM, y se evaluó la capacidad respiratoria midiendo la respiración del estado 3 (es decir, dependiente de ADP) y del estado 4 (es decir, independiente de ADP). La relación de control respiratorio (RCR) se calcula como la relación de las tasas de respuesta de los estados 3 y 4.

*Ensayo de 8-isoprostano*

**[0146]** Las indicaciones de 8-isoprostano en el plasma y el corazón se determinaron mediante el kit EIA de 8-isoprostano de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cayman Chemicals, Michigan).

*Histología*

**[0147]** Para el análisis histológico, se recogieron los corazones en los tiempos indicados, se fijaron en formalina al 10% tamponada, y se embebieron en parafina. Las secciones seriales de 5  $\mu\text{m}$  del corazón de cada grupo se tiñeron con el tricómico de Masson y Picrosirius Red (para detectar fibrosis). Las imágenes digitales de las diapositivas se capturaron y analizaron utilizando ImageJ. Para cada corazón, analizamos varias secciones del ventrículo medio y luego se promediaron estos números para obtener un solo porcentaje de fibrosis/VI para cada animal.

*Análisis estadístico*

**[0148]** Se realizó un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego, evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Monterrey, México) con número de registro BR09-001. El estudio incluyó pacientes que asistieron a la Clínica de Biología Reproductiva del Hospital Universitario desde julio de 2009 hasta

septiembre de 2010 que deseaban estar embarazadas y cumplían con los criterios de inclusión. Se incluyeron pacientes de entre 20 y 45 años con diagnóstico de oligoastenozoospermia idiopática que deseen participar en el estudio después de la firma del consentimiento informado. El diagnóstico de oligoastenozoospermia se realiza mediante la realización de un análisis de semen en fechas diferentes con un intervalo de tres semanas entre ellas. Para hacer el diagnóstico, los resultados del análisis del semen tenían que referirse a menos del 25% de motilidad espermática tipo A o menos del 50% de motilidad espermática tipo A + B como se detalla en el Manual de Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud para el examen de semen humano y la interacción del Moco Cervical, 4ª ed. Nueva York: Cambridge University Press, 1999. La motilidad tipo A comprendía una progresión rápida; la motilidad tipo B comprendía avances medios; la motilidad tipo C comprendía una progresión lenta o torpe; y la motilidad tipo D comprendía inmóvil. La oligozoospermia se define como una concentración de menos de 20 millones de espermatozoides por mililitro, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud. La oligoastenozoospermia se define como la presencia de oligozoospermia y astenozoospermia en el mismo paciente. En cada análisis de semen, la morfología se evalúa manualmente utilizando los criterios estrictos de Kruger.

**[0149]** Se excluyeron los pacientes infértiles con hallazgos normales en el análisis del semen, los pacientes que eran fumadores crónicos o los que habían estado tomando antioxidantes en los últimos 6 meses antes del ingreso al estudio. También se excluyó a los pacientes con enfermedades crónicas degenerativas, como diabetes o presión arterial alta o con anomalías hormonales. Se eliminaron todos los sujetos del estudio que no cumplieron con los medicamentos administrados según lo prescrito, que suspendieron el medicamento o que eran hipersensibles.

**[0150]** Una historia médica completa y un examen físico se obtuvo en todos los pacientes. Todos los participantes del estudio se sometieron a un segundo análisis de semen para confirmar el diagnóstico después de una abstinencia sexual de 3 a 5 días. Este análisis de semen se consideró línea de base (muestra 1). En una segunda visita, se revisó este nuevo análisis de semen para confirmar la oligoastenozoospermia y una de las 3 sustancias que se tomaron se prescribió al azar durante 75 días. Las sustancias administradas fueron 1,5 g de profármaco de sulfuro de hidrógeno como antioxidante, 50 mg de resveratrol como antioxidante y 1,5 g de celulosa microcristalina como placebo.

**[0151]** La asignación al azar de la sustancia administrada a cada paciente se realizó colocando en un cajón al azar todos los recipientes que tienen exactamente el mismo color, tamaño y forma con las tres sustancias separadas (profármaco de sulfuro de hidrógeno, resveratrol y placebo) sin ningún tipo de referencia en cuanto al contenido. Cada contenedor tenía una etiqueta con un número de serie. El médico tratante y el paciente desconocían el contenido del recipiente. Un tercer investigador tenía un registro y una base de datos para cada etiqueta y el contenido del contenedor. A cada paciente se le pidió que tomara un contenedor al azar y el número del mismo se registró en el registro médico del paciente. Al final del estudio, antes del análisis estadístico, obtuvimos la relación entre los números en las etiquetas y los contenidos, agrupando a los pacientes según la sustancia. Cada paciente recibió un formulario de cumplimiento del tratamiento (un registro del paciente) para contar los días de medicación y registrar los eventos adversos, si ocurrieron, incluido el tipo y la frecuencia.

**[0152]** Los pacientes se programaron un mes después de iniciar el tratamiento (tercera visita) con el fin de documentar los efectos adversos y el cumplimiento del tratamiento. Si el paciente no asistió, los datos del evento se recogieron por teléfono.

**[0153]** En la siguiente consulta programada (cuarta visita), realizada 75 días después de comenzar el tratamiento; Se verificó la adherencia y se informaron efectos adversos. Para esta visita, los pacientes presentaron 3 a 5 días de abstinencia sexual para el análisis del semen posterior al tratamiento (muestra 2). La concentración de espermatozoides y la motilidad se evaluaron, y se llevaron a cabo en su totalidad con un dispositivo automatizado IVOS (Sistema Visual Óptico Integrado) y se confirmaron manualmente por técnicos de laboratorio, quienes estaban cegados al grupo de tratamiento en el que estaba cada paciente. La morfología de cada análisis de semen se evaluó manualmente, según los criterios de Kruger.

**[0154]** Se estudiaron los datos descriptivos tradicionales, como las medidas de tendencia central (medias, mediana y moda) y, en el caso de las variables cuantitativas, las medidas de dispersión (varianza, desviación estándar y coeficiente de variación) se estudiaron para cada variable, junto con frecuencias observadas en variables cualitativas.

**[0155]** Los sujetos de estudio se dividieron de acuerdo con el grupo asignado y las variables estadísticas mencionadas fueron analizados. Los resultados de cada variable por grupo utilizando pruebas de hipótesis para medias ( $x^2$ ) y proporciones, de acuerdo con cada tipo de variable (cuantitativa y cualitativa, respectivamente) con un intervalo de confianza del 95%, con una  $p < 0,05$  estadísticamente significativa.

#### **Ejemplo 1: Niveles de sulfuro disminuyen después de la insuficiencia cardíaca en pacientes y ratones**

**[0156]** Los estudios anteriores sugieren que  $H_2S$  derivadas tanto exógena como endógenamente exhiben potentes efectos citoprotectores en modelos de I/R de miocardio aguda y la insuficiencia cardíaca inducida por isquemia. Sin embargo, el papel de  $H_2S$  endógena en la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión no ha sido totalmente dilucidado. En el estudio actual, un número de nuevos hallazgos con respecto al papel de  $H_2S$  derivado de CSE de la gravedad de la insuficiencia cardíaca después de la CAT han sido identificados y se han proporcionado

importantes conocimientos sobre el mecanismo por el cual la terapia de H<sub>2</sub>S oral atenúa la insuficiencia cardíaca CAT inducida.

**[0157]** Los niveles de sulfuro que circulan (H<sub>2</sub>S libre y azufre sulfano) en 20 pacientes con insuficiencia cardíaca y 24 controles emparejados por edad eran examinados. La descripción detallada de estos pacientes se encuentra en la Tabla 7. Como lo muestran los picos representativos del cromatógrafo de gases y los datos resumidos en las Figuras 1a y 1C, los niveles de H<sub>2</sub>S libre fueron significativamente más bajos en los pacientes con insuficiencia cardíaca en comparación con los controles ( $p = 0,049$ ), mientras que los niveles de sulfuro de sulfano tendieron a ser más bajos en los pacientes con insuficiencia cardíaca, Figuras 1B y D;  $p = 0,054$ ). A continuación, se examinaron los efectos de la insuficiencia cardíaca CAT inducida en la expresión miocárdica de las tres enzimas conocidas productoras de H<sub>2</sub>S, así como los niveles de sulfuro tanto circulante como miocárdico a las 6 semanas de CAT. El análisis reveló que la expresión de CBS estaba inalterada (Figuras 8A y 8B). Sin embargo, la expresión de CSE se reguló al alza en los ratones del vehículo en comparación con el Simulacro (Figuras 8A y 8C;  $p < 0,001$ ), mientras que la expresión de 3-MST se reguló significativamente a la baja en comparación con los niveles de Simulacro (Figuras 8A y 8D;  $p < 0,01$ ). Curiosamente, los niveles de H<sub>2</sub>S libre y de azufre sulfano fueron significativamente más bajos en la sangre ( $p < 0,01$ ) y el corazón ( $p < 0,001$ ) de ratones CAT + vehículo en comparación con ratones operados por Simulacro (Figuras 1E-1H).

**Tabla 7**

	Control	Insuficiencia cardíaca
<b>Número</b>	24	20
<b>Edad (promedio de años)</b>	51 ± 10	53 ± 13
<b>Género</b>		
<b>Hombres (%)</b>	16 (67%)	18 (90%)
<b>Mujeres (%)</b>	8 (33%)	2 (10%)
<b>Clasificación de la NYHA</b>		
<b>III (%)</b>	-	5 (25%)
<b>IIIb (%)</b>	-	2 (10%)
<b>IV (%)</b>	-	13 (65%)

#### **Ejemplo 2: La deficiencia de CSE exacerba la disfunción cardíaca después de CAT**

**[0158]** Para investigar el papel de H<sub>2</sub>S endógena en la sobrecarga de presión, se realizó la cirugía de CAT en ratones KO CSE y se evaluó la estructura y se realizó la función cardíaca mediante ecocardiografía. Inicialmente, se confirmó que los ratones KO CSE exhibieron H<sub>2</sub>S libre menor y los niveles de sulfano de azufre en la sangre y el corazón en comparación con los ratones WT (figuras 9A-9D;  $p < 0,05$ ). Los ratones KO CSE mostraron un aumento cardíaco y edema pulmonar significativamente mayores a las 12 semanas después de la CAT en comparación con los ratones WT (Figuras 2A-2B). Ambos grupos mostraron grados similares de aumento del grosor de IVSd de 1 semana a 12 semanas después de la CAT (Figura 2C). Sin embargo, los ratones KO CSE mostraron una dilatación significativa de la cavidad VI, como se observó por los aumentos tanto en LVEDD como en LVESD, y mostraron una disfunción cardíaca exacerbada de 3 semanas a 12 semanas después de CAT en comparación con los ratones WT (Figuras 2D-2F). A pesar del aumento de la estructura cardíaca y los cambios funcionales en los ratones KO CSE, no se observó ninguna diferencia en la mortalidad después de la CAT en comparación con los ratones WT (Figura 10A).

#### **Ejemplo 3: La sobreexpresión miocárdica de CSE atenúa la disfunción cardíaca sin prevenir la hipertrofia cardíaca después de una TAC**

**[0159]** Se ha demostrado que la sobreexpresión de CSE aumenta la producción de H<sub>2</sub>S en el corazón sin alteración en la expresión de CBS. En los estudios actuales, no se observó ninguna alteración en las expresiones de CBS cardíacas en ratones CS-CSE Tg, pero los ratones CS-CSE Tg mostraron una menor expresión de 3-MST en comparación con los ratones WT (Figura 11). Se examinó si la sobreexpresión de CSE específicamente dentro del miocito cardíaco atenuaría la hipertrofia cardíaca y/o la disfunción después de la CAT mediante ratones CS-CSE Tg. Los ratones CS-CSE Tg mostraron significativamente menos agrandamiento cardíaco y edema pulmonar, según se evaluó por la relación entre el peso del corazón y los pulmones y la longitud de la tibia (mg/cm) en comparación con los controles WT (Figuras 3A-3B). Además, el análisis ecocardiográfico reveló que, si bien los ratones CS-CSE Tg no mostraron diferencias en el grosor de la IVSd en comparación con los ratones WT, mostraron menos dilatación cardíaca y disfunción de 6 semanas a 12 semanas después de la CAT (Figuras 3C-3F). Nuevamente, no se observó diferencia en la mortalidad entre los dos grupos (Figura 10B).



[0160] En conjunto, estos datos indican que H<sub>2</sub>S endógena generada enzimáticamente por CSE juega un papel importante en el mantenimiento de la función cardíaca tras la presión hipertrofia inducida por sobrecarga de forma independiente de la regulación de la hipertrofia de miocitos cardíacos.

#### **Ejemplo 4: Administración de H<sub>2</sub>S exógena impide agrandamiento cardíaco, preserva la función VI, y reduce la fibrosis después de CAT**

[0161] A continuación, se examinaron los efectos de la administración de terapia H<sub>2</sub>S por vía oral sobre la hipertrofia cardíaca inducida por sobrecarga de presión y la disfunción (Figuras 4A-4H) en ratones de tipo salvaje C57BL/6J. Para estos experimentos, administramos SG-1002 (20 mg/kg/día) en el alimento. Los estudios iniciales encontraron que el tratamiento de SG-1002 restauró parcialmente niveles de H<sub>2</sub>S libre y de sulfano de azufre significativamente restaurados en la sangre (Figuras 1E-1F;  $p < 0,05$  vs. CAT + vehículo) y el corazón (Figuras 1G-1H;  $p < 0,05$  vs. CAT + Vehículo). El análisis morfológico general a las 12 semanas después de la CAT, reveló que los corazones de los ratones del vehículo se agrandaron en mayor medida en comparación con los ratones tratados con SG-1002 (Figura 4A). Esto se confirmó mediante las relaciones de peso cardíaco/longitud de tibia, que encontraron que los corazones de ambos ratones tratados con vehículo y SG-1002 aumentaron significativamente en comparación con los ratones de simulacro a las 6 y 12 semanas después de la CAT (Figura 4B;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, los ratones tratados con SG-1002 mostraron un aumento significativamente menor en comparación con los ratones vehículo (Figura 4B;  $p < 0,001$ ). Además, los ratones tratados con SG-1002 mostraron un edema pulmonar significativamente menor en comparación con los ratones vehículo en ambos puntos de tiempo (Figura 4C). Además, se evaluaron los niveles de BNP en circulación como una indicación de la gravedad de la insuficiencia cardíaca después de una CAT. Los niveles de BNP aumentaron significativamente ( $p < 0,01$ ) en ratones con vehículo a las 6 y 12 semanas en comparación con los ratones simulados, pero el tratamiento con SG-1002 inhibió significativamente los niveles de BNP ( $p < 0,01$  frente a CAT + Vehículo) después de CAT (Figura 4D). El análisis ecocardiográfico (Figura 4F) reveló que el tratamiento con SG-1002 no alteró el aumento del grosor de la IVSd después de la CAT (Figura 4E), pero previno la dilatación cardíaca (Figuras 4F-4G;  $p < 0,01$  frente al vehículo CAT+) y disfunción cardíaca contráctil (Figura 4H;  $p < 0,001$  vs. CAT+ Vehículo) de 6 semanas a 12 semanas después de la CAT. El análisis histológico de las secciones teñidas con Tricromo y Picrosirius Red de Masson a las 12 semanas posteriores a la CAT reveló áreas extensas de fibrosis intermuscular y perivascular en corazones de ratones con vehículo CAT+ (Figuras 5A-5C;  $p < 0,01$  frente a simulacro). Aunque la fibrosis fue evidente en las secciones tomadas del corazón CAT+ SG-1002, fue significativamente menor en comparación con los corazones del Vehículo CAT+ ( $p < 0,001$  para el Tricromo de Masson y  $p < 0,01$  para Picrosirius Red). Finalmente, los ratones tratados con SG-1002 mostraron una mejor tasa de supervivencia mejorada, pero no estadísticamente significativa, en comparación con los ratones vehículo (80% frente a 61%,  $p = 0,23$ ) (Figura 10C).

[0162] Un análisis adicional reveló que la administración de SG-1002 a ratones KO CSE ligeramente, pero no significativamente, aumentó niveles de H<sub>2</sub>S libre en la sangre y el corazón, mientras que la administración de SG-1002 aumentó significativamente los niveles de azufre sulfano tanto en la sangre ( $p < 0,001$ ) como en el corazón ( $p < 0,05$ ) en comparación con los ratones KO CSE alimentados con una dieta de control (Figuras 9A-9D). La administración de SG-1002 también disminuyó completamente la dilatación de la cavidad VI en ratones KO CSE en comparación con los ratones KO CSE alimentados con una dieta de control (Figuras 2D-2E;  $p < 0,05$ ). Curiosamente, los ratones KO CSE tratados con SG-1002 mantuvieron la fracción de eyección cardíaca después de la CAT en comparación no solo con los ratones KO CSE alimentados con dieta, sino también los ratones WT a las 12 semanas posteriores a la CAT (Figura 2F;  $p < 0,001$  vs. KO CSE + CAT y  $p < 0,05$  contra WT + CAT). Sin embargo, no se observaron diferencias en la mortalidad entre los grupos KO CSE (Figura 10A).

[0163] En conjunto, los resultados hasta este punto indican que la biodisponibilidad de H<sub>2</sub>S endógena se atenúa notablemente en insuficiencia cardíaca después de la sobrecarga de presión a pesar de que los niveles de CSE y expresión CBS se mantienen o se regulan al alza. Además, el aumento de los niveles de H<sub>2</sub>S mediante enfoques genéticos o farmacológicos evita la transición de la hipertrofia cardíaca compensada a la descompensada.

#### **Ejemplo 5: La retirada de SG-1002 conduce al desarrollo de la dilatación cardíaca y la disfunción**

[0164] Los experimentos se llevaron a cabo para determinar cómo la retirada de SG-1002 de la comida afectaría el desarrollo de dilatación cardíaca y disfunción posterior a CAT. Para estos experimentos, se administró SG-1002 en el chow durante 1 semana y luego se sometió diferentes grupos de ratones a 6 semanas de CAT: (1) Los ratones recibieron SG-1002 en el chow durante 6 semanas después de CAT, (2) Los ratones recibieron SG-1002 en el chow durante 1 semana después de CAT y luego recibió chow normal durante 5 semanas; (3) Los ratones recibieron SG-1002 en el chow durante 3 semanas después de la CAT y luego recibieron el chow normal durante 3 semanas. El análisis ecocardiográfico reveló que los tres grupos de ratones mostraron grados similares de aumento del grosor de la IVSd, así como diámetros de LVEDD similares de 1 semana a 6 semanas después de la CAT (Figuras 12A-12B). La retirada de SG-1002 después de 1 semana de CAT dio como resultado un mayor aumento en L VESD y una mayor disminución en la fracción de eyección a las 6 semanas de CAT en comparación con el grupo sin retirada (Figuras 12C-12D;  $p < 0,01$  vs. SG-1002). La retirada de SG-1002 a las 3 semanas de CAT dio lugar a un aumento no significativo en ambos parámetros a las 6 semanas de CAT en comparación con el grupo sin retirada. Estos datos indican que la retirada temprana de SG-1002 después del inicio de la sobrecarga de presión no impide el desarrollo

de dilatación y disfunción cardíaca, lo que sugiere que los beneficios de SG-1002 se logran cuando la dieta se mantiene durante todo el período de seguimiento.

#### **Ejemplo 6: La terapia con H<sub>2</sub>S aumenta la señalización de VEGF-Akt-eNOS-Óxido nítrico después de CAT**

[0165] La serina/treonina quinasa Akt regula el crecimiento cardíaco, la angiogénesis miocárdica, y la supervivencia en los miocitos cardíacos. Se examinó el tratamiento con SG-1002 para ver si se activó la fosforilación de Akt en el corazón después de la CAT. En la Figura 6A se muestra la transferencia Western representativa para el estado de fosforilación de Akt en el corazón a las 6 semanas posteriores a la CAT. El tratamiento con SG-1002 no alteró la expresión de Akt total en el corazón (Figura 6B), pero sí aumentó significativamente la expresión de Akt fosforilada en el residuo de treonina 308 (Akt-P<sup>Thr308</sup>) ( $p < 0,001$ ) y el residuo de serina 473 (Akt-P<sup>Ser473</sup>) en comparación con los ratones del vehículo (Figura 6e;  $p < 0,001$ ). A continuación, se examinó el tratamiento con SG-1002 para determinar si VEGF, una potente citoquina angiogénica y citoprotectora en el miocardio estaba regulada al alza. A las 6 semanas después de la CAT, los ratones tratados con SG-1002 mostraron niveles de expresión de la proteína VEGF significativamente mayores en el corazón (Figura 6D;  $p < 0,01$  frente al simulacro y  $p < 0,05$  frente a Vehículo CAT+), pero no en la circulación sistémica (Figura 13A).

[0166] El óxido nítrico (NO) generado a partir de sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) es conocido por promover citoprotección de células vasculares y del miocardio durante las condiciones isquémicas. Para investigar la posible implicación de eNOS en la cardioprotección inducida por SG-1002 después de CAT, se evaluó la expresión y el estado de fosforilación de eNOS en el residuo de serina 1177 (eNOS-P<sup>Ser1177</sup>) mediante un análisis de transferencia Western en los corazones de simulacro, vehículo, y ratones tratados con SG-1002.

[0167] No hubo diferencias en la expresión total de eNOS en el corazón entre todos los grupos (Figuras 6E-6F). Sin embargo, el sitio de activación de la eNOS (eNOS-P<sup>Ser1177</sup>) mostró una fosforilación significativamente mayor después de SG-1002 en comparación con los ratones Simulacro y CAT+Vehículo (Figuras 6E-6F;  $p < 0,01$ ). Además, el tratamiento con SG-1002 aumentó los niveles cardíacos de NOx (nitrito y nitrato), después de CAT en comparación con los ratones Simulacro (Figura 6 GH;  $p < 0,05$ ), lo que es indicativo de una mayor biodisponibilidad de NO después de la terapia con H<sub>2</sub>S. También se investigó la expresión miocárdica tanto de nNOS como de iNOS en ratones sometidos a CAT que recibieron vehículo o SG-1002 (Figuras 13B-13D). La expresión de nNOS tanto en el vehículo como en los ratones tratados con SG-1002 tendió a ser más alta que la simulación, pero no alcanzó significación estadística. Interesantemente, la expresión de iNOS en el grupo de Vehículo CAT+ fue regulada al alza en comparación con el grupo de Simulación ( $p < 0,01$ ), pero los ratones SG-1002 disminuyeron esta regulación al alza ( $p < 0,01$  frente al Vehículo CAT+).

#### **Ejemplo 7: Terapia H<sub>2</sub>S atenúa la disfunción respiratoria mitocondrial y el estrés oxidativo después de la CAT**

[0168] El fallo energético mitocondrial es considerado uno de los mecanismos patológicos centrales en la insuficiencia cardíaca resultante de la hipertrofia cardíaca. Por lo tanto, se investigó la función respiratoria de las mitocondrias aisladas obtenidas de corazones de ratones a las 6 semanas posteriores a la CAT. Se observó una disminución significativa en las tasas de respiración del Estado 3 (Figura 7A;  $p < 0,01$ ) y RCR (Figura 7B;  $p < 0,001$ ) en los ratones con vehículo CAT+ en comparación con los ratones Simulacro. Sin embargo, el tratamiento con SG-1002 conservó la función respiratoria mitocondrial en comparación con los ratones con vehículo CAT+ ( $p < 0,05$  para el estado 3 y  $p < 0,01$  para RCR). No se observó diferencia en la respiración del Estado 4 entre ninguno de los grupos de estudio (Figura 7A).

[0169] La disfunción mitocondrial conduce a la producción alterada de ATP y la generación de un aumento de especies de oxígeno reactivas (ROS) que puede resultar en aumento de la apoptosis. Por lo tanto, los niveles de 8-isoprostano se examinaron como un marcador de deficiencia de antioxidantes y estrés oxidativo tanto en el plasma como en el corazón a las 6 semanas después de la CAT. Los ratones tratados con CAT+Vehículo y CAT+SG-1002 exhibieron niveles plasmáticos más altos de 8-isoprostano en comparación con los ratones simulados (Figura 7C;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, los ratones con vehículo CAT+ mostraron niveles significativamente más altos de 8-isoprostano en el corazón en comparación con los ratones simulados ( $p < 0,001$ ), mientras que la administración de SG-1002 atenuó el aumento inducido por CAT en los niveles de 8-isoprostano (Figura 7D;  $p < 0,05$  vs. CAT+ Vehículo). A continuación, se evaluó la expresión de Nox4 cardíaco como otro marcador de estrés oxidativo. A las 6 semanas después de la CAT, la expresión de la NADPH oxidasa 4 (Nox4) miocárdica se reguló significativamente al alza en los ratones Vehículo CAT+ en comparación con los ratones Simulacro (Figura 7E;  $p < 0,01$ ). Sin embargo, el tratamiento con SG-1002 inhibió significativamente la regulación positiva de Nox4 ( $p < 0,01$  en comparación con el vehículo CAT+). Un análisis adicional reveló que el tratamiento con SG-1002 dio lugar a una regulación al alza en la expresión de la hemo oxigenasa 1 antioxidante (HO1) en el corazón después de CAT (Figura 7F;  $p < 0,01$  frente a Simulacro y CAT+Vehículo).

[0170] Los ejemplos descritos en los ejemplos 1-7 proporcionan varias líneas de evidencia para apoyar la idea de que los niveles de sulfuro pueden ser un predictor importante de la severidad de la insuficiencia cardíaca. Primero, de acuerdo con estudios clínicos previos, se proporciona evidencia adicional que muestra que los niveles circulantes de sulfuro son más bajos en pacientes con insuficiencia cardíaca. En segundo lugar, se proporcionan datos mostrando que se refleja en un modelo experimental de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión, como se

evidencia por el hallazgo de que tanto miocárdica y los niveles circulantes de H<sub>2</sub>S libre y azufre sulfano se reducen significativamente después de CAT. En tercer lugar, se demuestra que una deficiencia en el H<sub>2</sub>S producido de manera endógena da como resultado una exacerbación de la disfunción cardíaca después de una CAT, mientras que la sobreexpresión genética de la CSE preservó significativamente la función del ventrículo izquierdo. Finalmente, la administración crónica de un donante de nH<sub>2</sub>S proporciona protección contra la remodelación adversa asociada con CAT al aumentar los niveles de sulfuro cardíaco y circulante. Si bien no se conocen, los mecanismos de la disminución de la frecuencia de la salud cardíaca y los niveles de azufre, este hallazgo sugiere fuertemente que una deficiencia de H<sub>2</sub>S puede contribuir a la patofisiología y la progresión de la insuficiencia cardíaca. Estos resultados también sugieren que el aumento de la biodisponibilidad de H<sub>2</sub>S con terapia donante de H<sub>2</sub>S oral conserva significativamente la función cardíaca en el contexto de la insuficiencia cardíaca.

**[0171]** Uno de los principales resultados del estudio actual es que la administración de SG-1002 conserva significativamente la función cardíaca después de CAT. Dado que H<sub>2</sub>S es un gas fisiológico que se difunde libremente en múltiples compartimentos intracelulares de receptores específicos, se puede postular que H<sub>2</sub>S se dirige a múltiples cascadas patológicas simultáneamente. Un objetivo potencial es VEGF, que se encuentra entre las citoquinas angiogénicas y citoprotectoras más potentes. Givvimani y otros, J. Appl. Fisiol. 110: 1093-1100, 2011 informó previamente que el sulfuro de hidrógeno de sodio (NaHS) en el agua de bebida aumentaba la angiogénesis mediante el aumento de la expresión de VEGF y la inhibición de factores antiangiogénicos (angiostatina y dostatina). La activación de un corto plazo en los ratones transgénicos inducibles inducen hipertrofia fisiológica con una densidad vascular mantenida, mientras que la deficiencia de Akt produce una disfunción cardíaca exacerbada debido a la falta de hipertrofia cardíaca inducida por el ejercicio. En este estudio, se demostró que el tratamiento con SG-1002 activa una vía de señalización VEGF-Akt-eNOS-NO a las 6 semanas después de la inducción de CAT (un momento en el que son importantes la hipertrofia cardíaca y la disfunción del ventrículo izquierdo).

**[0172]** Un aumento en el estrés oxidativo y/o una deficiencia en la reserva antioxidante endógena también puede causar disfunción contráctil. Los efectos cardioprotectores de H<sub>2</sub>S contra I/R miocárdica están mediados por la señalización antioxidante. Además, el H<sub>2</sub>S elimina directamente las especies reactivas de oxígeno (ROS) in vitro. Por lo tanto, H<sub>2</sub>S endógena puede directamente y/o indirectamente contribuir a la modulación del estrés oxidativo en el ajuste de la presión de la hipertrofia inducida por sobrecarga. Aquí, se demostró que el H<sub>2</sub>S atenúa el aumento inducido por CAT en el estrés oxidativo, como lo demuestra el hallazgo de que SG-1002 disminuye los niveles cardíacos de 8-isoprostano. En términos de mecanismo, se determinó que el SG-1002 atenúa la regulación positiva inducida por CAT de Nox4, un miembro de la familia NADPH oxidasa que es una fuente importante de disfunción cardíaca relacionada con ROS en el ajuste de la sobrecarga de presión. También se determinó que SG-1002 regulaba al alza la expresión de HO-1 y la función respiratoria mitocondrial conservada. Ya que la disfunción respiratoria mitocondrial en el corazón conduce a una remodelación metabólica, un déficit de energía cardíaca y un aumento del estrés oxidativo, la función respiratoria mitocondrial conservada observada en el estudio actual podría ser un mecanismo adicional para explicar la inhibición del estrés oxidativo por H<sub>2</sub>S después de la CAT.

**[0173]** Generalmente se ha pensado que H<sub>2</sub>S y NO ejercen sus efectos biológicos a través de vías de señalización independientes. La evidencia experimental reciente sugiere que existe una interferencia entre las vías de señalización H<sub>2</sub>S y NO, lo que podría proporcionar efectos sinérgicos y reguladores adicionales. Por ejemplo, H<sub>2</sub>S regula al alza la producción de NO en las células endoteliales a través de la activación de eNOS de una manera dependiente de Akt. Del mismo modo, NO se ha demostrado para mejorar la producción de H<sub>2</sub>S a partir de tejido vascular y, más recientemente, Coletta et al., Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 109: 9161-9166, 2012, demostró que el NO y H<sub>2</sub>S son mutuamente necesarios para el control de la función vascular. Por lo tanto, otro hallazgo importante del estudio actual es la evidencia de que la terapia con H<sub>2</sub>S exógena activa muy poderosamente la eNOS y aumenta la biodisponibilidad de NO en el miocardio. Esto es importante por dos razones: (1) corrobora aún más la evidencia de que existe una interferencia entre los sistemas H<sub>2</sub>S y NO y (2) proporciona evidencia por primera vez que H<sub>2</sub>S aumenta la biodisponibilidad de NO en un modelo de enfermedad in vivo. En consecuencia, la activación de eNOS por SG-1002 puede servir como un mecanismo importante para los efectos de protección observados contra CAT. En cuanto a sus efectos sobre la hipertrofia, el NO producido a partir de eNOS ha demostrado tener efectos antihipertroóficos en el corazón, como lo demuestran los hallazgos de que los ratones eNOS KO tienen hipertensión e hipertrofia cardíaca y muestran una disfunción cardíaca exacerbada debido a la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión en comparación con ratones WT. Además, la sobreexpresión cardíaca específica de eNOS previene la hipertrofia cardíaca inducida por isoproterenol. Sin embargo, en marcado contraste, Takimoto et al., J. Clin. Invest. 115: 1221-1231, 2011 sugirieron que la sobrecarga de presión produce un desacoplamiento de la eNOS que resulta en un aumento de la producción de oxidante miocárdico y una función cardíaca exacerbada. A pesar de esto, los médicos han estado utilizando con éxito medicamentos que pueden activar la eNOS, (es decir, los bloqueadores de ECA-1, ARB y  $\beta$ ) en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, aún existe controversia con respecto a la utilidad y efectividad de las terapias basadas en el NO en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, lo que justifica una investigación adicional para resolver estos problemas. Además, tanto NO como H<sub>2</sub>S son conocidos por aumentar los niveles de HO-1, una enzima que produce monóxido de carbono (CO). Esto sugiere que la activación de uno de los gases producidos de manera endógena puede llevar a la activación de los otros dos. En estas condiciones, los tres gases tienen la capacidad de crear sinergias para producir efectos antiapoptóticos, antioxidantes, antiinflamatorios y antihipertroóficos, que en última instancia pueden conducir a la cardioprotección.

**[0174]** Los hallazgos del presente estudio indican que la preservación de los niveles de sulfuro durante el desarrollo de la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión preserva la función cardíaca y evita la transición de la hipertrofia cardíaca compensada a descompensada. Además, el estudio actual indica que la administración de un donante H<sub>2</sub>S novelo oral facilita estos efectos protectores mediante la activación de una vía de señalización VEGF-Akt-eNOS-NO aumentando significativamente la biodisponibilidad de NO (Figura 14). Esta cascada de señalización cardioprotectora resulta en la inhibición del estrés oxidativo, la fibrosis cardíaca atenuada, la preservación de la respiración mitocondrial y la función ventricular izquierda preservada. El estudio sugiere que H<sub>2</sub>S producida endógenamente desempeña un papel importante en la preservación de la función cardíaca en la insuficiencia cardíaca y que terapia H<sub>2</sub>S oral puede ser una opción terapéutica para el tratamiento de la disfunción VI en el ajuste de la hipertrofia inducida por sobrecarga de presión.

**Ejemplo 8: El tratamiento con una composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible (SG-1002, que contiene aproximadamente un 99% de azufre cerivalente) aumenta la concentración de esperma y la motilidad del esperma en hombres infértiles**

**[0175]** Entre julio de 2009 y septiembre de 2010, se evaluaron un total de 435 hombres, de los cuales 125 (28,73%) tenían oligoastenozoospermia en el Centro Universitario de Medicina Reproductiva. Se reclutaron setenta y dos pacientes que aceptaron ingresar al estudio; de estos, 18 fueron eliminados por varias razones (cinco no presentaron una combinación de oligozoospermia y astenozoospermia en el segundo análisis de semen antes del tratamiento, ocho tenían una enfermedad degenerativa crónica, tres eran fumadores crónicos y dos habían tomado antioxidantes dos meses antes del estudio). Cincuenta y cuatro pacientes fueron incluidos en el estudio que iniciaron el tratamiento. Tres abandonaron (uno mencionó el sudor con olor "extraño", uno refirió náuseas y flatulencia durante los primeros tres días de ingestión de las cápsulas de gelatina dura, cada una con 400 mg de SG-1002 (5 cápsulas por día) y uno argumentó que había demasiadas capsulas para tomar por día). Cuando los pacientes fueron atendidos al final de los 75 días de tratamiento, cuatro no asistieron a pesar de insistir por teléfono.

**[0176]** Se analizó la información de 47 pacientes que cumplieron con el protocolo. La edad media de los pacientes fue de 34,23 años, siendo 32 años los más frecuentes. Los pacientes se dividieron en tres grupos (profármaco de sulfuro de hidrógeno, resveratrol y placebo), manteniendo una relación similar entre los grupos. Dieciséis pacientes fueron incluidos en el grupo de resveratrol, 16 en el grupo de profármaco de sulfuro de hidrógeno y 15 en el grupo de placebo. Se realizaron dos evaluaciones, una muestra de referencia y después del tratamiento. En cada una de las dos evaluaciones, se analizaron variables como la concentración, la motilidad y la morfología en el semen fresco y la postcapacitación. Las características basales de los tres grupos fueron similares. La edad promedio de los pacientes en cada grupo fue de 34,6 años para el grupo de profármaco de sulfuro de hidrógeno, 35 años para el grupo de resveratrol y 33,07 años para el grupo de placebo.

**[0177]** La concentración media de línea de base de esperma fue 10,84 millones por mililitro, siendo la concentración más baja 0,5 millones por mililitro y la concentración más alta 19,9 millones por mililitro. La concentración media en la primera muestra fue de 11,02, 10,9 y 10,64 millones por mililitro para los grupos de profármaco de sulfuro de hidrógeno, resveratrol y placebo, respectivamente. En cuanto a la motilidad del esperma registrado al inicio del estudio, motilidad de tipo A + B tenía una media de 13,43%, 14,04% y 8,33% para los grupos de profármacos sulfuro de hidrógeno, el resveratrol y placebo, respectivamente. La morfología registrada en la muestra 1 también fue similar en los tres grupos: 31,6% para el grupo de profármaco de sulfuro de hidrógeno, 32,06% para el grupo de resveratrol y 30,06% para el grupo de placebo sin diferencias estadísticamente significativas. Las formas móviles recuperadas (MFR) obtenidas después de la capacitación espermática fueron de 0,579, 0,40 y 0,371 millones para el grupo de profármaco de sulfuro de hidrógeno, resveratrol y placebo, respectivamente (Tabla 8).

**Tabla 8**  
*Características de la primera muestra en los tres grupos.*

Característica	Profármaco de sulfuro de hidrógeno	Resveratrol	Placebo
Concentración espermática	11,02 x 10 <sup>6</sup>	10,9 x 10 <sup>6</sup>	10,64 x 10 <sup>6a,b</sup>
Motilidad A + B (%)	13,43	14,43	8,33 <sup>a,b</sup>
Morfología normal (%)	31,6	32,06	30,06 <sup>a,b</sup>
MFR	0,579 x 10 <sup>6</sup>	0,40 x 10 <sup>6</sup>	0,371 x 10 <sup>6a,b</sup>

Nota: Se realizó un análisis estadístico mediante  $\chi^2$

MFR: Formas móviles de recuperación, capacitación post espermática

<sup>a</sup>no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el profármaco de placebo y sulfuro de hidrógeno

<sup>b</sup>no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el placebo y el resveratrol

**[0178]** Los datos obtenidos de las primeras muestras del grupo de placebo se compararon con los datos obtenidos a partir del profármaco sulfuro de hidrógeno. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo y el grupo profármaco de sulfuro de hidrógeno. Las muestras que se recogieron después del tratamiento mostraron datos diferentes entre los grupos. La concentración de espermatozoides para el grupo de profármaco de

sulfuro de hidrógeno fue de 17,01 frente a 11,18 millones para el grupo de placebo ( $p = 0,038$ ). La motilidad A + B para el grupo profármaco de sulfuro de hidrógeno fue del 20,06% frente al 10,06% en el grupo placebo ( $p = 0,037$ ). La morfología obtenida fue de 36,3% para el grupo de profármaco de sulfuro de hidrógeno en comparación con el grupo de placebo con 30,4% ( $p = 0,088$ ). La poscapacitación MFR para el grupo de profármaco de sulfuro de hidrógeno fue de  $1,62 \times 10^6$  versus  $0,338 \times 10^6$  en el grupo de placebo ( $p = 0,035$ ) (Tabla 9).

Tabla 9

*Características de la 2ª muestra (postratamiento) entre el profármaco de sulfuro de hidrógeno y el grupo placebo*

Característica	Profármaco de sulfuro de hidrógeno	Placebo	<i>P</i>
Concentración espermática	$17,01 \times 10^6$	$11,18 \times 10^6$	0,038
Motilidad A + B (%)	20,06	10,06	0,037
Morfología normal (%)	36,3	30,4	0,088
MFR	$1,62 \times 10^6$	$0,338 \times 10^6$	0,035

Nota: Se realizó un análisis estadístico mediante  $\chi^2$   
MFR: Formas móviles de recuperación, capacitación post espermática

[0179] Los resultados de este estudio proporcionan soporte para el uso de la terapia con antioxidantes tales como SG1002 (es decir, agentes que actúan no sólo como eliminadores de especies de radicales libres/oxígeno reactivo pero también como antioxidantes indirectos que inducen genes para generar otros antioxidantes de molécula pequeña, enzimas antioxidantes y enzimas que regulan el metabolismo de los lípidos) como un método válido para mejorar la espermatogénesis en pacientes cuidadosamente seleccionados. Este es el primer ensayo clínico prospectivo, controlado, aleatorizado, doble ciego que muestra que la terapia con profármacos de sulfuro de hidrógeno mejora algunos parámetros seminales.

[0180] Se observó un aumento en la concentración de espermatozoides en el grupo de profármaco de sulfuro de hidrógeno, este fue el único grupo con un aumento estadísticamente significativo. Estos hallazgos demuestran y confirman los datos obtenidos en otros estudios donde la terapia antioxidante parece ser efectiva en el tratamiento de pacientes con oligoastenozoospermia.

[0181] En resumen, este estudio demuestra que los profármacos de sulfuro de hidrógeno, tales como SG1002 son bien tolerados por el cuerpo humano, sin desarrollar efectos adversos significativos en las dosis utilizadas y pueden aumentar la cantidad de espermatozoides, la motilidad, la morfología normal, y MFR post-capacitación.

#### **Ejemplo 9: Tratamiento con una composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible (SG-1002) en pacientes con osteosarcoma**

[0182] Se realizaron dos ensayos en pacientes diagnosticados con diferentes formas de osteosarcoma. En un estudio, el paciente tenía 11 años. La condición inicial se caracterizó como osteosarcoma osteoblástico del fémur distal izquierdo, que se presentó con una fractura patológica e hinchazón importante relacionada con el tumor y pérdida de la función de la articulación adyacente. El examen físico del paciente fue notable por la presencia de una masa de tejido blando y enrojecimiento en el sitio del tumor primario. No se registraron pruebas de metástasis pulmonares. El paciente recibió cuatro ciclos de quimioterapia con cisplatino, doxorubicina, ifosfamida y etopósido sin respuesta clínica aparente. La quimioterapia se detuvo antes del tratamiento con una composición rica en azufre cerivalente valiosa altamente biodisponible. El régimen de tratamiento consistió en la administración de nueve cápsulas de gelatina dura (cada una de las cuales contenía 400 mg de SG-1002) por día de la composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente durante 12 semanas. Al final de la segunda semana, el paciente comenzó a sentirse mejor, el dolor disminuyó y la inflamación también comenzó a disminuir. La radiografía mostró una reducción del tejido blando de la extremidad que rodea el tumor. Al final de la cuarta semana, la inflamación de la extremidad había caído dramáticamente hasta casi desaparecer. No hubo dolor y la radiografía de rayos X mostró signos de crecimiento del hueso cortical. Al final de la octava semana, la inflamación había desaparecido por completo. El estado de ánimo de la paciente era excelente. No hubo dolor y la radiografía de rayos X mostró mayor cohesión ósea. Al final de la duodécima semana, la radiografía de rayos X mostró claramente una mayor cohesión ósea. El hueso se consolidó con angulación, producto de la fractura patológica original.

[0183] En el segundo estudio, el paciente tenía 13 años. La condición de referencia se caracterizó como osteosarcoma de telangiectasia del húmero proximal izquierdo que se presentó con una fractura patológica e hinchazón importante relacionada con el tumor y pérdida de la función del hombro izquierdo. Su examen físico fue notable por la presencia de una masa de tejido blando y enrojecimiento en el sitio del tumor primario. En el momento del diagnóstico, había evidencia de metástasis pulmonares bilaterales. Las radiografías convencionales mostraron una lesión quística y lucente con una masa de tejido blando con reacción perióstica. El paciente recibió seis ciclos de quimioterapia con cisplatino, doxorubicina, metotrexato de dosis alta, ifosfamida y etopósido con respuesta clínica modesta. Al final del sexto ciclo se suspendió la quimioterapia. El régimen de tratamiento consistió en la administración de 9 cápsulas por

día de la composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible durante 12 semanas. Al final de la tercera semana, el paciente comenzó a sentirse mejor, el dolor disminuyó y la inflamación también comenzó a disminuir. Al final de la cuarta semana, la radiografía de rayos X mostró una reducción del tejido blando de la extremidad que rodea el tumor. La exploración por TAC no mostró mejoría de las metástasis pulmonares, aunque las metástasis ya no progresaron. Al final de la octava semana, la inflamación de la extremidad había disminuido, aunque aún se notaba. La paciente no tenía dolor y la radiografía mostró que el tumor no había progresado. Al final de la duodécima semana, persistió la inflamación del tejido blando. El estado de ánimo de la paciente era excelente. No hubo dolor y la radiografía de rayos X no mostró progresión del cáncer en el hueso. La CAT no mostró nuevas metástasis pulmonares.

#### **Ejemplo 10: Tratamiento con una composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible (SG-1002) en pacientes con afecciones asociadas con hidrocefalia**

**[0184]** Tres ensayos se realizaron en pacientes que muestran signos de hidrocephalus. En el primer ensayo, el paciente tenía 3 años. Su estado basal se caracterizó por signos no específicos de hidrocefalia. Una resonancia magnética mostró una masa en la fosa posterior. Se planificó la cirugía y se realizó una resección incompleta. Los resultados de la patología mostraron un tumor teratoide/rabdoide atípico infratentorial con diseminación leptomeníngea. Fue tratada en ese momento con varios ciclos de quimioterapia con una respuesta muy modesta. Se suspendió la quimioterapia y se colocó al paciente en cuidados paliativos. Se inició un régimen de tratamiento que consistía en la administración de 6 cápsulas de gelatina dura (cada una de las cuales contenía 400 mg de SG-1002) por día de la composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente durante un período de 12 semanas. El paciente comenzó a mostrar signos de mejoría al final de la segunda semana. La somnolencia mejoró y al final de la octava semana el paciente estaba completamente consciente y sin evidencia clínica de dolor de cabeza, vómitos o irritabilidad. El paciente tuvo una importante recuperación neurológica y al final de la duodécima semana, el paciente pudo pararse y caminar unos pocos pasos. La evidencia radiológica del tumor desapareció y el paciente podía caminar sin ayuda y comer normalmente en las próximas semanas.

**[0185]** En la segunda prueba, el paciente tenía 2 años. Se le presentaron signos insidiosos, no localizadores de aumento de la presión intracraneal con hidrocefalia. La IRM mostró una masa intraventricular en el ventrículo lateral. Se planificó la cirugía, se colocó una derivación del LCR y se realizó una resección incompleta. Los resultados de la patología mostraron un tumor anaplásico compatible con carcinoma del plexo coroideo. Fue tratada en ese momento con varios ciclos de quimioterapia, con una respuesta muy modesta. Los padres decidieron en ese momento no darle a su hijo un tratamiento adicional. Luego se inició un régimen de tratamiento que consistía en la administración de 3 cápsulas de gelatina dura (cada una con 400 mg de SG-1002) por día de la composición rica en azufre y que era altamente biodisponible durante un período de 12 semanas. El paciente comenzó a mostrar signos de mejoría al final de la segunda semana. La somnolencia mejoró y al final de la octava semana el paciente estaba completamente consciente y sin evidencia clínica de dolor de cabeza, vómitos o irritabilidad. El paciente tuvo una importante recuperación neurológica al final de la duodécima semana y el paciente pudo pararse y caminar unos pocos pasos. La evidencia radiológica del tumor residual disminuyó pero no desapareció.

**[0186]** El tercer ensayo se llevó a cabo en un paciente que tenía 5 años. Presentó signos no específicos de aumento de la presión intracraneal con hidrocefalia, vómitos, cefaleas, somnolencia y parálisis de la mirada hacia arriba. La IRM mostró una masa heterogénea pineal agrandada con calcificaciones. Se planificó la cirugía, se colocó una derivación del LCR y se realizó una resección incompleta. Los resultados de la patología fueron consistentes con pinealoblastoma. Fue tratada en ese momento con varios ciclos de quimioterapia tipo meduloblastoma con buena respuesta inicial, pero meses más tarde mostró evidencia de recaída. Los padres del paciente decidieron en ese momento no darle a su hijo un tratamiento adicional. Luego se inició un régimen de tratamiento que consistía en la administración de 6 cápsulas de gelatina dura (cada una con 400 mg de SG-1002) por día de la composición rica en azufre y que era altamente biodisponible durante un período de 12 semanas. El paciente comenzó a mostrar mejoría en la tercera semana. La somnolencia mejoró y, al final de la duodécima semana, el paciente estaba completamente consciente y sin evidencia clínica de dolor de cabeza, vómitos o irritabilidad. La evidencia radiológica del tumor residual disminuyó pero no desapareció.

#### **Ejemplo 11: Tratamiento de un paciente con ependimoma con la composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente (SG-1002)**

**[0187]** Se realizó un ensayo en un paciente de 6 años diagnosticado de ependimoma supratentorial. Se presentó en mal estado clínico con signos de aumento de la presión intracraneal con hidrocefalia, vómitos, cefaleas, somnolencia y papiledema. La IRM mostró un tumor localmente invasivo infiltrado adyacente al cerebro en la región talámica. Las muestras de revisión de patología fueron consistentes con un diagnóstico de ependimoma. Fue tratada en ese momento con cirugía incompleta y diferentes ciclos de quimioterapia. No se aceptó radioterapia y los padres decidieron no darles más tratamientos a sus hijos. Comenzó un régimen de tratamiento de administración de seis cápsulas de gelatina dura (cada una de las cuales contenía 400 mg de SG-1002) por día de la composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente durante 12 semanas. El paciente mostró mejoría a la tercera semana. La somnolencia mejoró gradualmente y al final de la duodécima semana, el paciente había mejorado considerablemente con una gran disminución del dolor de cabeza, vómitos e irritabilidad. La evidencia radiológica de tumor residual disminuyó y la condición clínica mejoró notablemente.

**Ejemplo 12: Tratamiento de un paciente con macrocefalia con la composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente (SG-1002)**

[0188] Un paciente de 18 meses de edad con evidencia de macrocefalia y letargo alternando con irritabilidad se trató con la composición rica en azufre altamente biodisponible. La IRM antes del tratamiento mostró hidrocefalia y una masa tumoral localizada en la fosa posterior. Se planificó la cirugía, se colocó una derivación del LCR y se realizó una resección parcial. Los resultados de la patología fueron consistentes con ependimoma. Sus signos de presión intracraneal mejoraron debido a la derivación y su hemiparesia estaba casi resuelta. Ningún otro tratamiento fue aceptado por los padres. Cuatro meses más tarde, una resonancia magnética mostró que el tamaño del tumor estaba aumentando y el paciente comenzó a quejarse nuevamente de dolores de cabeza, somnolencia y hemiparesia progresiva. El régimen de tratamiento consistió en la administración de seis cápsulas de gelatina dura (cada una de las cuales contenía 400 mg de SG-1002) por día de la composición altamente biodisponible rica en azufre cerivalente durante 12 semanas. El paciente mostró una leve mejoría a la tercera semana. El dolor de cabeza y la somnolencia mejoraron pero no desaparecieron. Al final de la duodécima semana, el paciente se sentía mejor, tenía cefalea ocasional, no vomitaba y la hemiparesia no progresaba. La evidencia radiológica de tumor residual después de 14 semanas mostraron que no hubo aumento en el tamaño en comparación con el último estudio.

**Ejemplo 13: Tratamiento de un paciente con hemiparesia con la composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente (SG-1002)**

[0189] Un paciente de 5 años que se presentó inicialmente con signos progresivos de hemiparesia a la edad de tres años se trató con la composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente de la invención durante 12 semanas con la administración de seis cápsulas de gelatina dura (cada una con 400 mg de SG-1002) por día. La condición de referencia del paciente consistió en signos no específicos de aumento de la presión intracraneal con vómitos por la mañana, dolores de cabeza y somnolencia. La IRM mostró una masa tumoral supratentorial con signos de hemorragia y calcificaciones. Se planificó la cirugía, se colocó una derivación del LCR y se realizó una resección parcial. Los resultados de la patología fueron consistentes con ependimoma anaplásico. Sus signos de presión intracraneal mejoraron debido a la derivación y su hemiparesia estaba casi resuelta. Comenzó la quimioterapia y recibió 12 ciclos con una resolución casi completa de sus signos y síntomas. La IRM mostró mejoría sin evidencia macroscópica de tumor. Cuatro meses después, una IRM mostró una invasión regional de tumores y el paciente comenzó a quejarse nuevamente de dolores de cabeza, somnolencia y hemiparesia progresiva. Ningún otro tratamiento fue aceptado por los padres. Tras la administración de la composición rica en azufre altamente biodisponible, el paciente mostró una leve mejoría en la tercera semana. Mejoraron el dolor de cabeza y somnolencia. Al final de la duodécima semana, el paciente se sentía mejor, no tenía vómitos y la hemiparesia no progresaba. La evidencia radiológica del tumor residual después de 14 semanas no mostró un aumento en el tamaño en comparación con el último estudio.

**Ejemplo 14: Tratamiento de un paciente con meduloblastoma con la composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible (SG-1002)**

[0190] Se realizó un ensayo en un paciente de 14 años de edad con meduloblastoma recurrente y diseminación pélvica de su tumor original a través de la derivación del LCR. Se presentó inicialmente con dolor abdominal, hinchazón de las extremidades y síntomas urinarios, así como dolores de cabeza, náuseas matutinas y ataxia. Comenzó la quimioterapia con resultados modestos. El tratamiento de la composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible se inició durante 12 semanas mediante la administración de nueve cápsulas de gelatina dura (cada una con 400 mg de SG-1002) por día. El paciente mostró mejoría a la tercera semana. La circunferencia de la cintura disminuyó y los síntomas urinarios desaparecieron. El dolor de cabeza y la ataxia mejoraron, pero no desaparecieron. Al final de la duodécima semana, el paciente se sentía mejor, el tumor abdominal/pélvico había disminuido significativamente. El dolor de cabeza y la ataxia mejoraron mucho. La evidencia radiológica del meduloblastoma recurrente en la fosa posterior no aumentó de tamaño en comparación con estudios anteriores.

**Ejemplo 15: Tratamiento de un paciente con carcinoma de células escamosas con una composición altamente biodisponible y rica en azufre cerivalente (SG-1002)**

[0191] Se realizó un ensayo en un paciente de 57 años con sangrado rectal y dolor debido a carcinoma de células escamosas recurrente del canal anal tratados con cirugía, quimioterapia y terapia de radiación. Su condición se repitió tres meses después de su último tratamiento de radiación y se negó a continuar el tratamiento. El paciente recibió un régimen de tratamiento de nueve cápsulas de gelatina dura (cada una con 400 mg de SG-1002) por día de la composición de la invención altamente biodisponible y rica en azufre. El paciente mostró una mejoría en el dolor en 4 o 5 días después del inicio del régimen de tratamiento. Para la tercera semana, el dolor había desaparecido y el sangrado rectal había disminuido. El paciente decidió reiniciar un programa de quimioterapia de rescate junto con el régimen de tratamiento de la composición rica en azufre altamente biodisponible.

**Ejemplo 16: Tratamiento de un paciente con leucemia con la composición rica en azufre cerivalente altamente biodisponible (SG-1002)**

[0192] Se realizó un ensayo en un paciente de 13 años diagnosticado de leucemia linfoblástica aguda pre-B-calla (+). Se encontraba en la primera remisión y estaba tomando medicamentos de acuerdo con el protocolo BFM 85. Después de 6 meses de tratamiento, comenzó a tomar cápsulas de precursor de sulfuro de hidrógeno y dijo que se sentía mucho mejor y que podía hacer ejercicio con mejor tolerancia. Ella corría, caminaba los fines de semana y asistía a la escuela regularmente. Su régimen de tratamiento consistió en la administración de seis cápsulas de gelatina dura (cada una con 400 mg de SG-1002) por día. La paciente pudo comparar cómo se sintió antes y después de la ingesta del precursor de sulfuro de hidrógeno. Su capacidad física e intelectual mejoró. Ahora puede tolerar los ejercicios extremos, como caminar en el campo y correr una maratón de 5 a 10 km. Su estado de ánimo también ha mejorado.

**Ejemplo 17: Tratamiento de un paciente diagnosticado con insuficiencia cardíaca con una composición altamente biodisponible y rica en azufre cerovelante (SG-1002)**

[0193] Se realizó un ensayo en un paciente de 47 años diagnosticado con insuficiencia cardíaca a la edad de 46 años después de haber aumentado la dificultad para respirar después de actividades moderadas o ejercicio y dolor en el pecho. Después de un par de meses de ignorar sus síntomas, tuvo un ataque al corazón. Ya tiene una angioplastia coronaria. El paciente no fumó, pero tiene antecedentes familiares de diabetes y niveles altos de colesterol. Su fracción de eyección fue inferior al 40%. Comenzó un régimen de tratamiento de seis cápsulas de gelatina dura (cada una de las cuales contenía 400 mg de SG-1002) por día de una composición altamente biodisponible y rica en azufre. El régimen de tratamiento duró cuatro meses. Al final de la segunda semana, el paciente comenzó a sentirse mejor, los niveles de azúcar en la sangre se regularizaron a pesar de que el paciente continuaba usando glibenclamida cada 12 horas. La falta de aire mejoró en la tercera semana. Para la octava semana, los niveles de azúcar estaban estables y el uso de glibenclamida se redujo a una tableta por día sin impacto. La falta de aliento con el ejercicio disminuyó al igual que el dolor en el pecho. Al final del cuarto mes, un estudio de fracción de eyección ventricular superó el 40% y el paciente se sintió mejor y tuvo mejor tolerancia al ejercicio.

**Ejemplo 18: Tratamiento de un paciente con diabetes tipo 2 con una composición altamente biodisponible y rica en azufre cerovelante (SG-1002)**

[0194] Se realizó un ensayo en un paciente masculino obeso de 44 años con diabetes tipo 2. Le diagnosticaron diabetes tipo 2 desde los 30 años. Desde entonces, ha estado tomando glibenclamida con control regular de azúcar. A la edad de 41 años comenzó a notar tos regular, dificultad para respirar y ortopnea. Tuvo un ataque cardíaco a la edad de 42 años y su fracción de eyección después de eso fue menos del 40%. Comenzó un régimen de tratamiento de seis cápsulas de gelatina dura (cada una de las cuales contenía 400 mg de SG-1002) por día de una composición altamente biodisponible y rica en azufre. El régimen de tratamiento duró tres meses. A la tercera semana, el paciente comenzó a sentirse mejor, los niveles de azúcar en la sangre se regularizaron a pesar de que el paciente continuaba usando glibenclamida. La falta de aire comenzó a mejorar a fines de la séptima semana. Al final del tercer mes, el paciente solo tomaba glibenclamida por las mañanas, pero su glucemia era prácticamente normal.

**Otras realizaciones**

[0195] Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que se refiere la invención y pueden aplicarse a las características esenciales aquí expuestas anteriormente.



# REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende 90-99,9% (p/p) de azufre alfa elemental y 0,01-10% (p/p) de componentes altamente polares, y que opcionalmente comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde dichos componentes altamente polares se seleccionan del grupo que consiste en politionato de sodio, politionato de potasio, politionato de amonio, politionato de calcio, ácidos politiónicos, tiosulfato de sodio, tiosulfato de potasio, tiosulfato de amonio, tiosulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de amonio, en donde la composición comprende al menos azufre cerivalente bioactivo al 96%. Se somete fácilmente a la bioconversión en sulfuro de hidrógeno.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos componentes altamente polares se seleccionan de sulfato de sodio, politionato de sodio y tiosulfato de sodio.

3. Una composición que comprende un azufre alfa elemental y uno o más componentes altamente polares en una proporción de 10 a 150 partes de azufre alfa elemental a 1 parte de componentes altamente polares (p/p) para administración enteral, tópica o parenteral, en donde dichos componentes polares se seleccionan del grupo que consiste en politionato de sodio, politionato de potasio, politionato de amonio, politionato de calcio, ácidos politiónicos, tiosulfato de sodio, tiosulfato de potasio, tiosulfato de amonio, tiosulfato de calcio, sulfato de sodio, sulfato de potasio y sulfato de amonio, en donde la composición comprende al menos un 96% de azufre cerivalente bioactivo que se somete fácilmente a la bioconversión en sulfuro de hidrógeno.

4. La composición de la reivindicación 3, en la que dicha composición se formula para administración enteral y dicho azufre alfa elemental y dichos componentes altamente polares están presentes juntos en una cantidad de 400 mg.

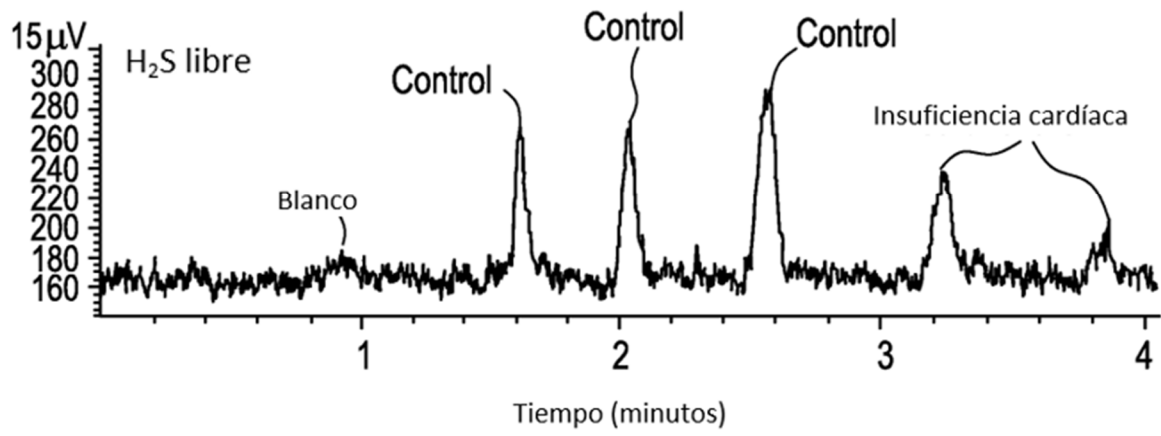
5. La composición de la reivindicación 4, en la que dicha composición es una cápsula.

6. La composición de la reivindicación 3, que comprende además un tercer agente.

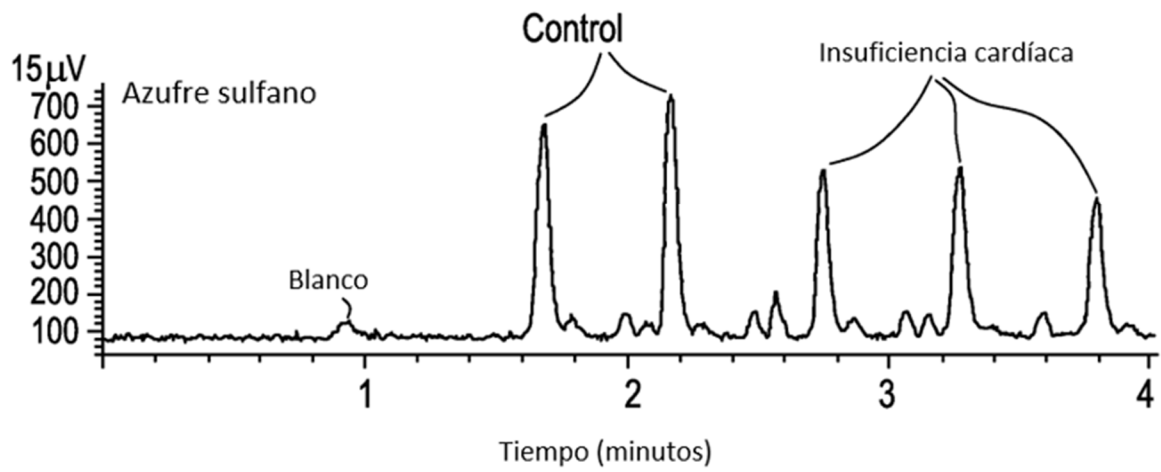
7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho tercer agente es un fármaco para enfermedades cardiovasculares, un fármaco antiinflamatorio, un fármaco antineurodegenerativo o un fármaco anticanceroso/antiproliferativo o en donde dicho azufre alfa elemental, dichos componentes altamente polares y dicho tercer agente están presentes en una cantidad efectiva para tratar una condición asociada con el estrés oxidativo.

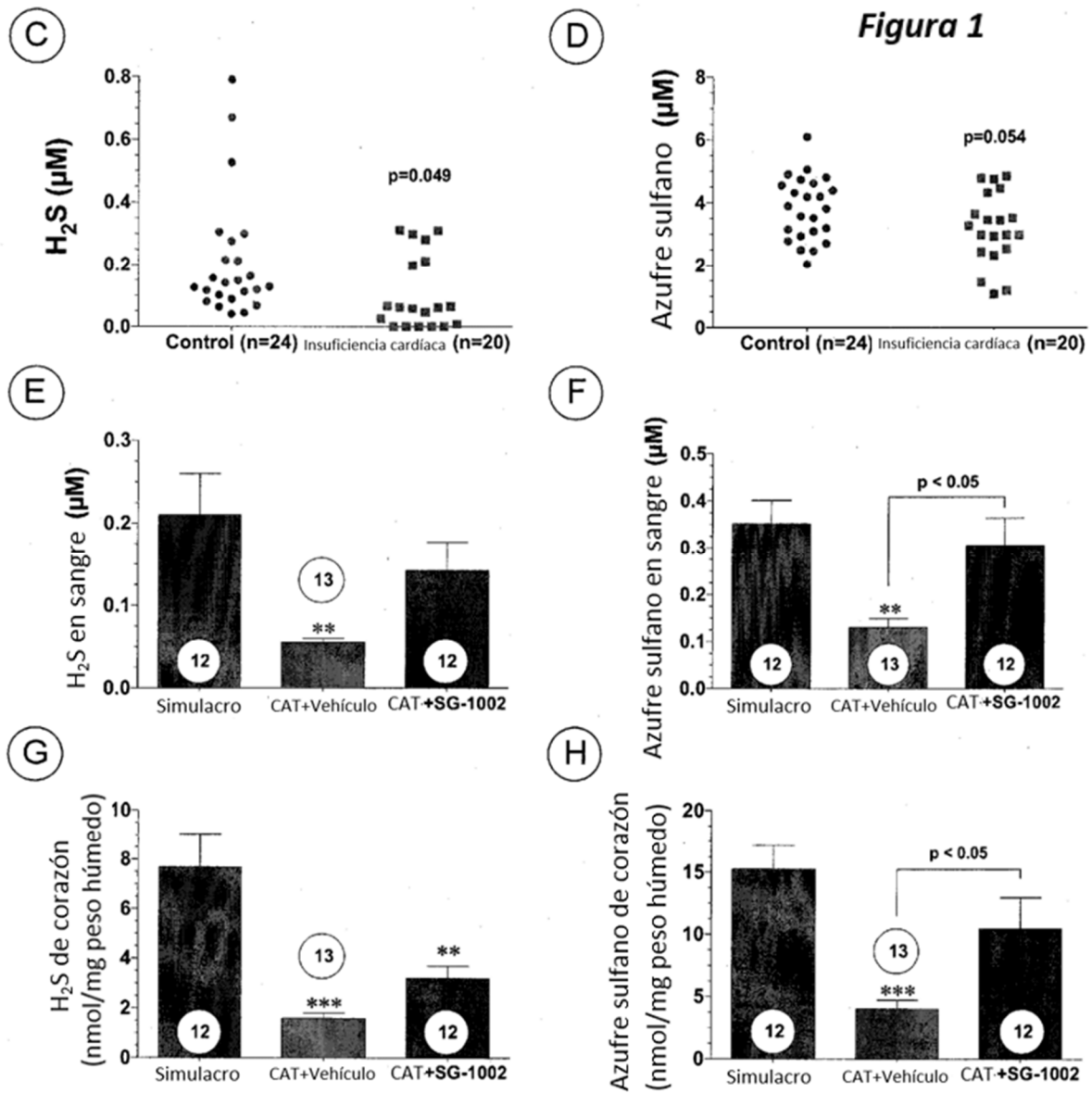
8. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho tercer agente es un suplemento dietético o en la que dicho azufre alfa elemental, dichos componentes altamente polares y dicho tercer agente están presentes en una cantidad eficaz para promover o mantener la salud general.

**FIG. 1A**

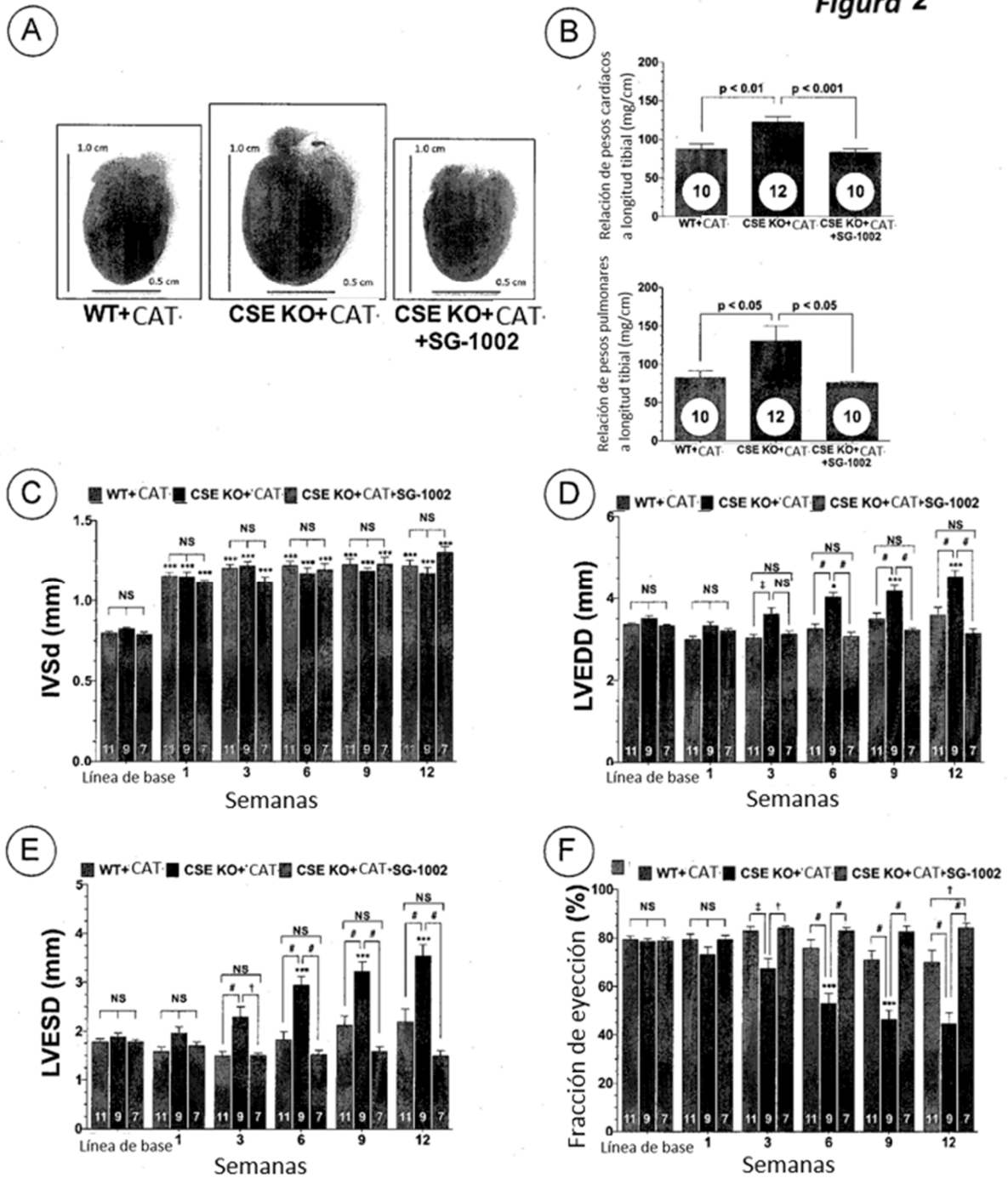


**FIG. 1B**

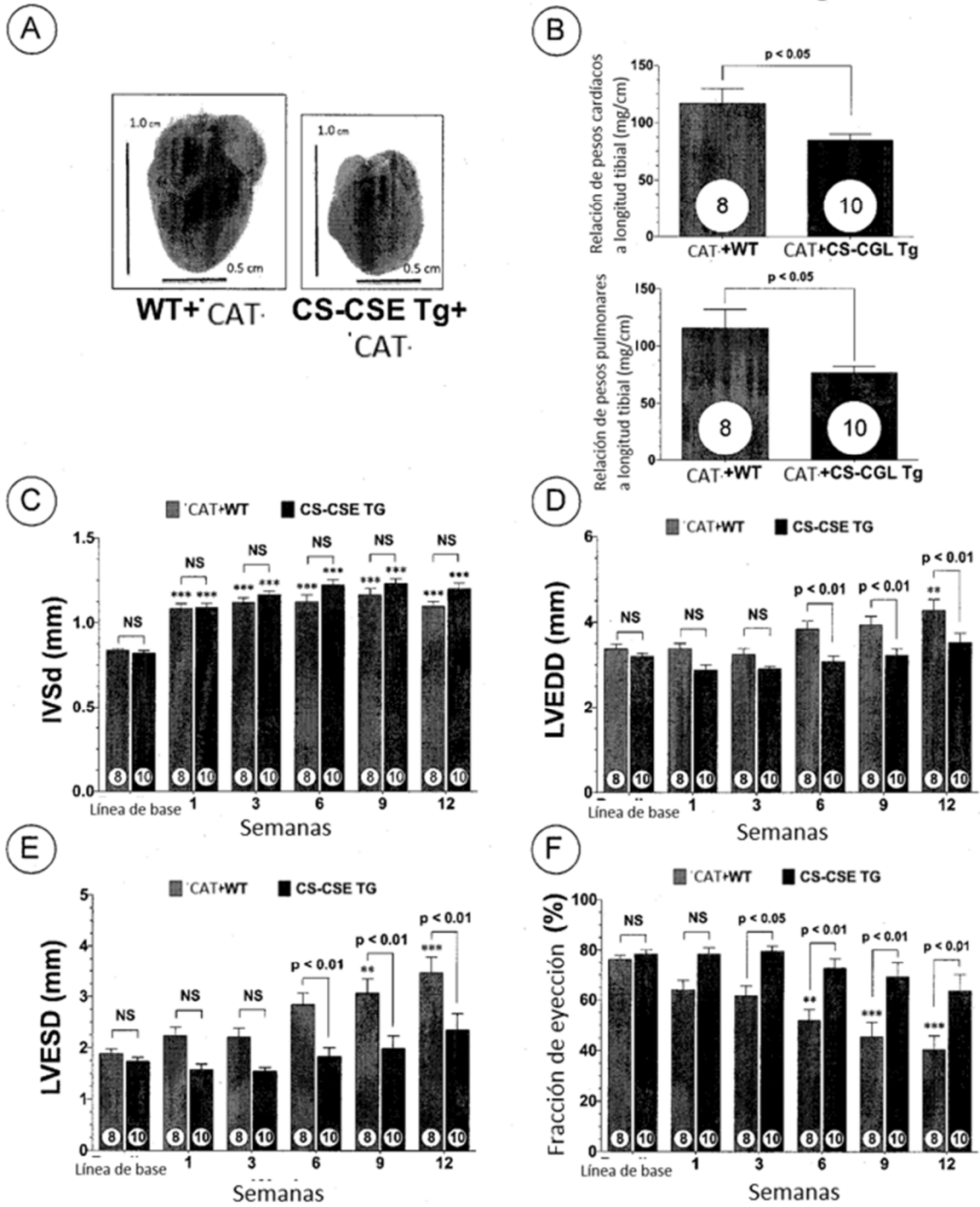




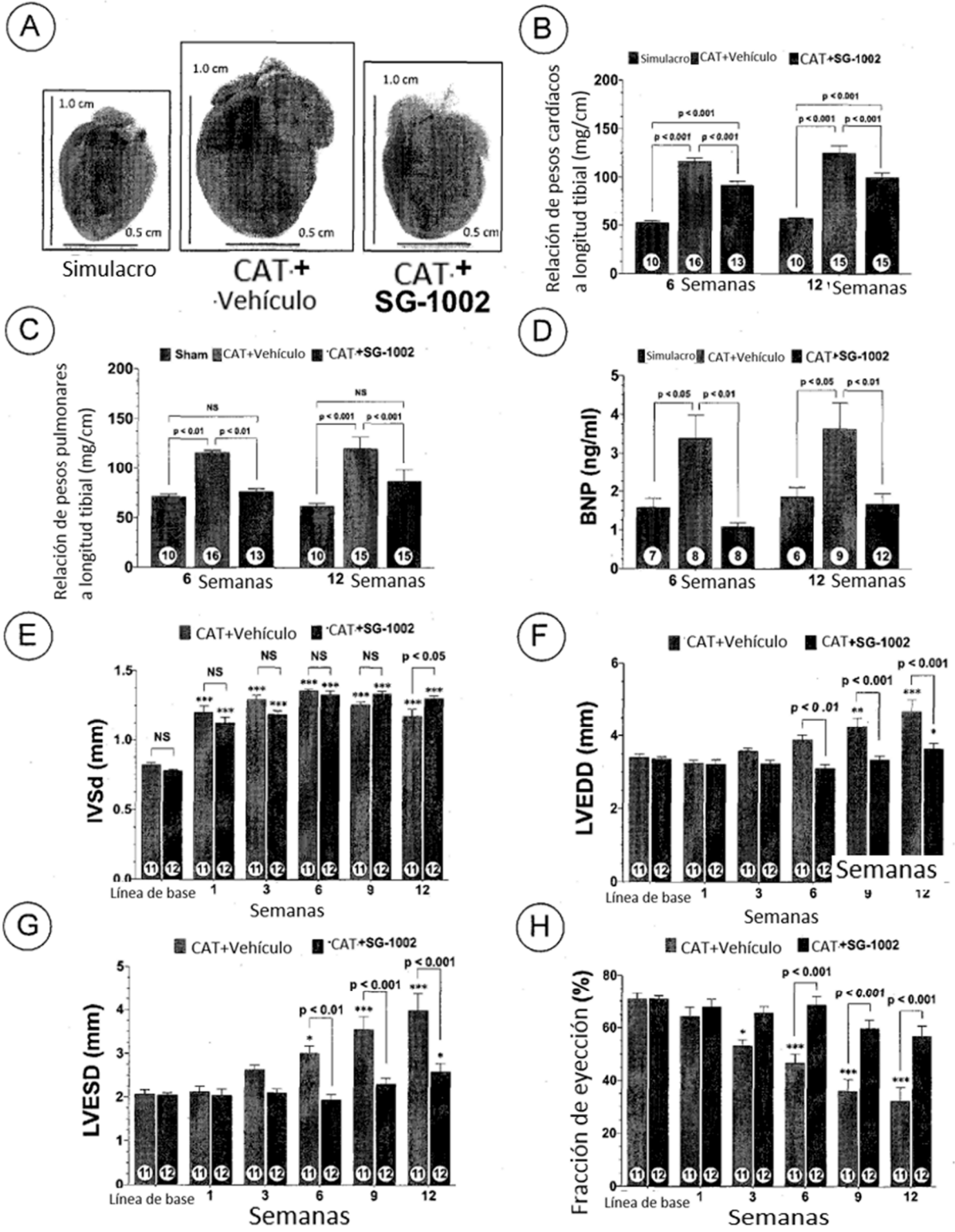
**Figura 2**



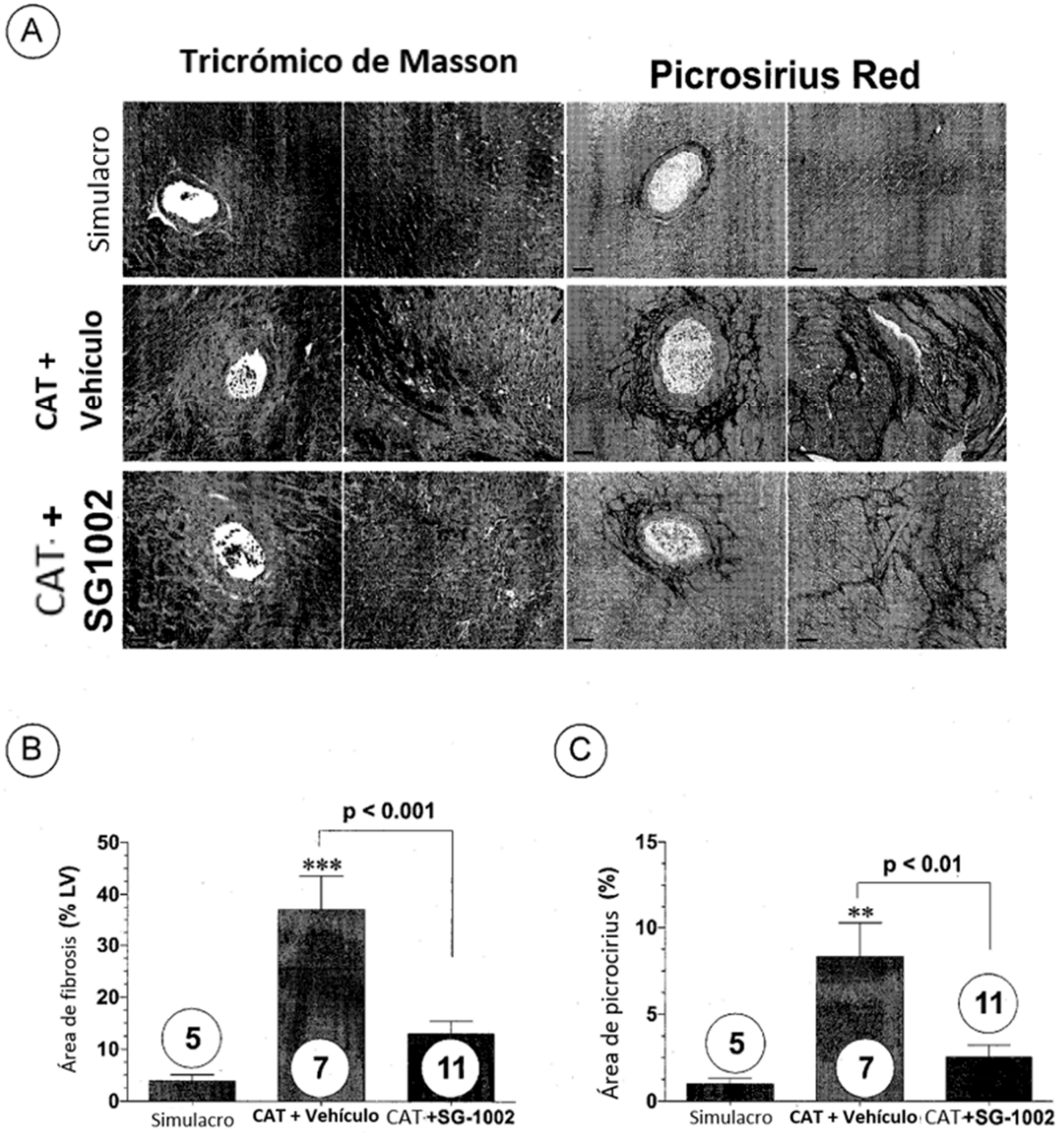
**Figura 3**

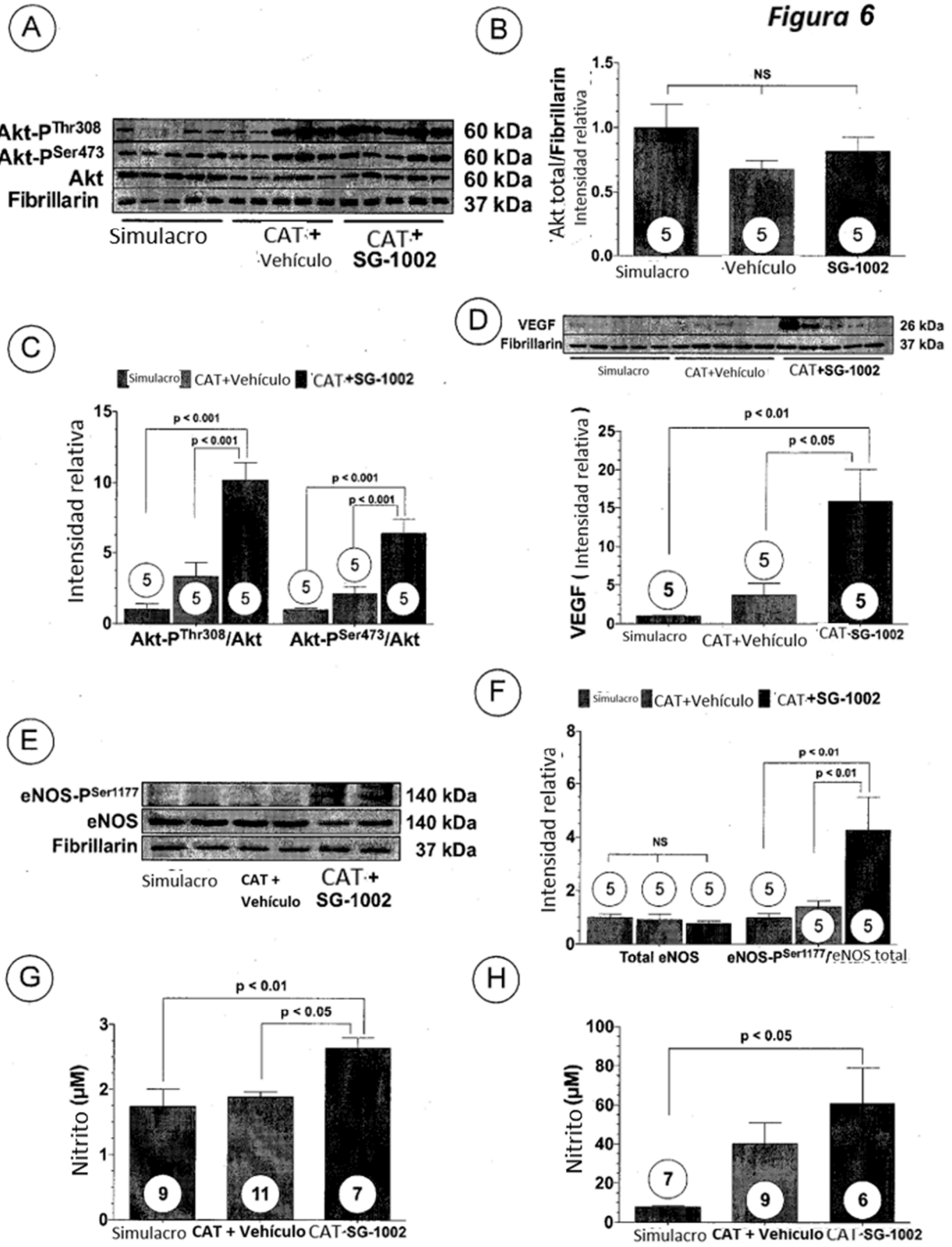


**Figura 4**



**Figura 5**







**Figura 7**

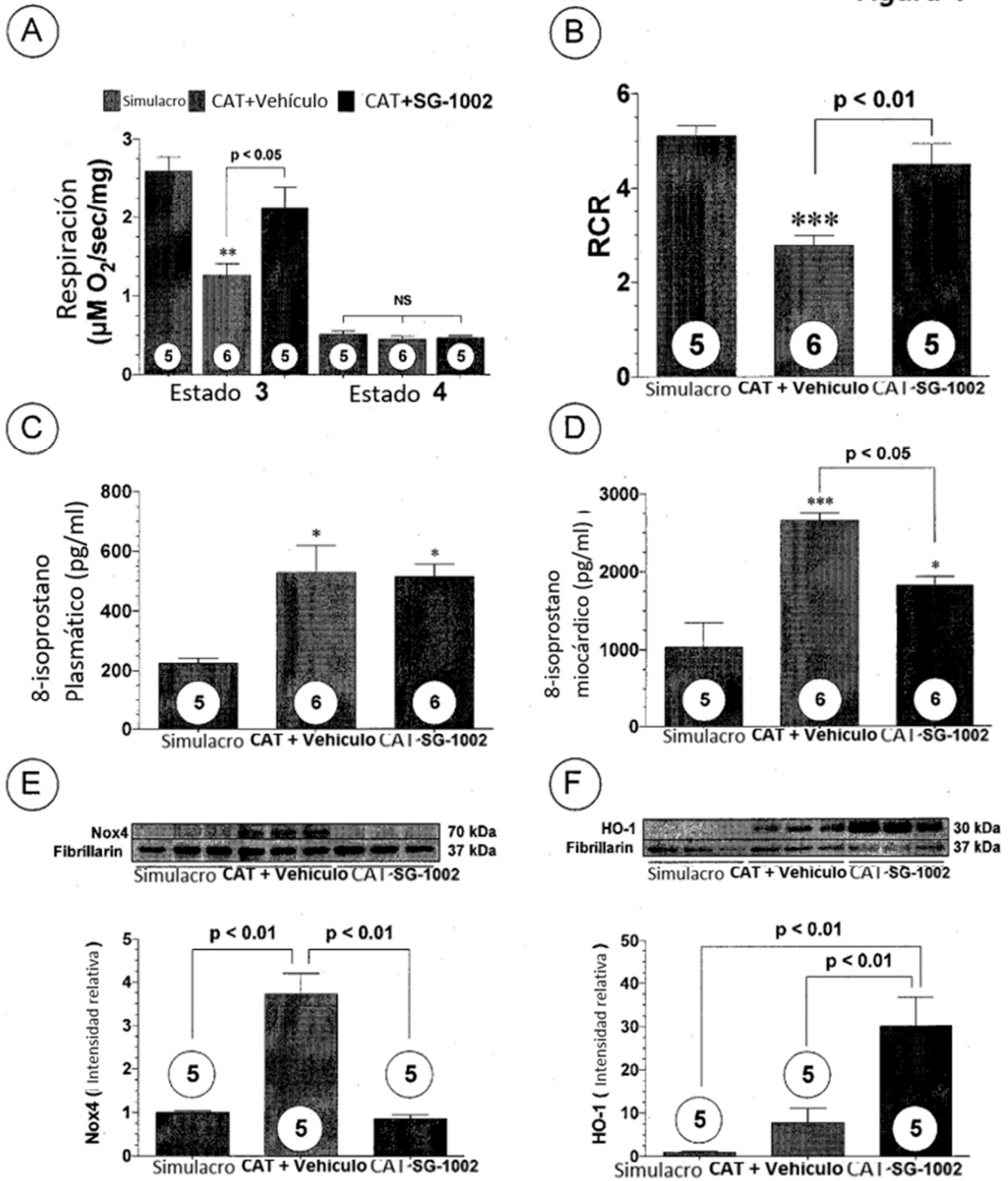
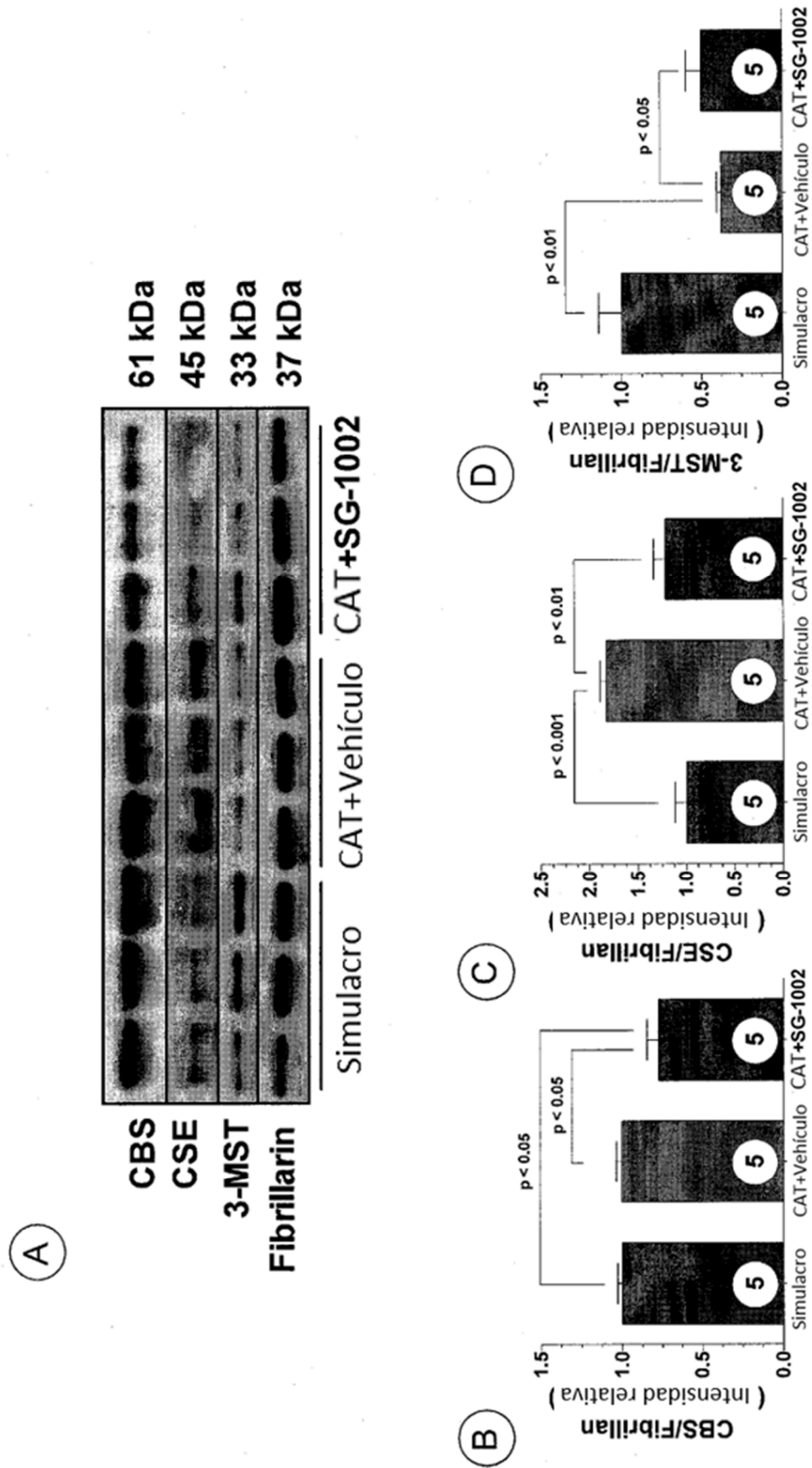


Figura 8



**Figura 9**

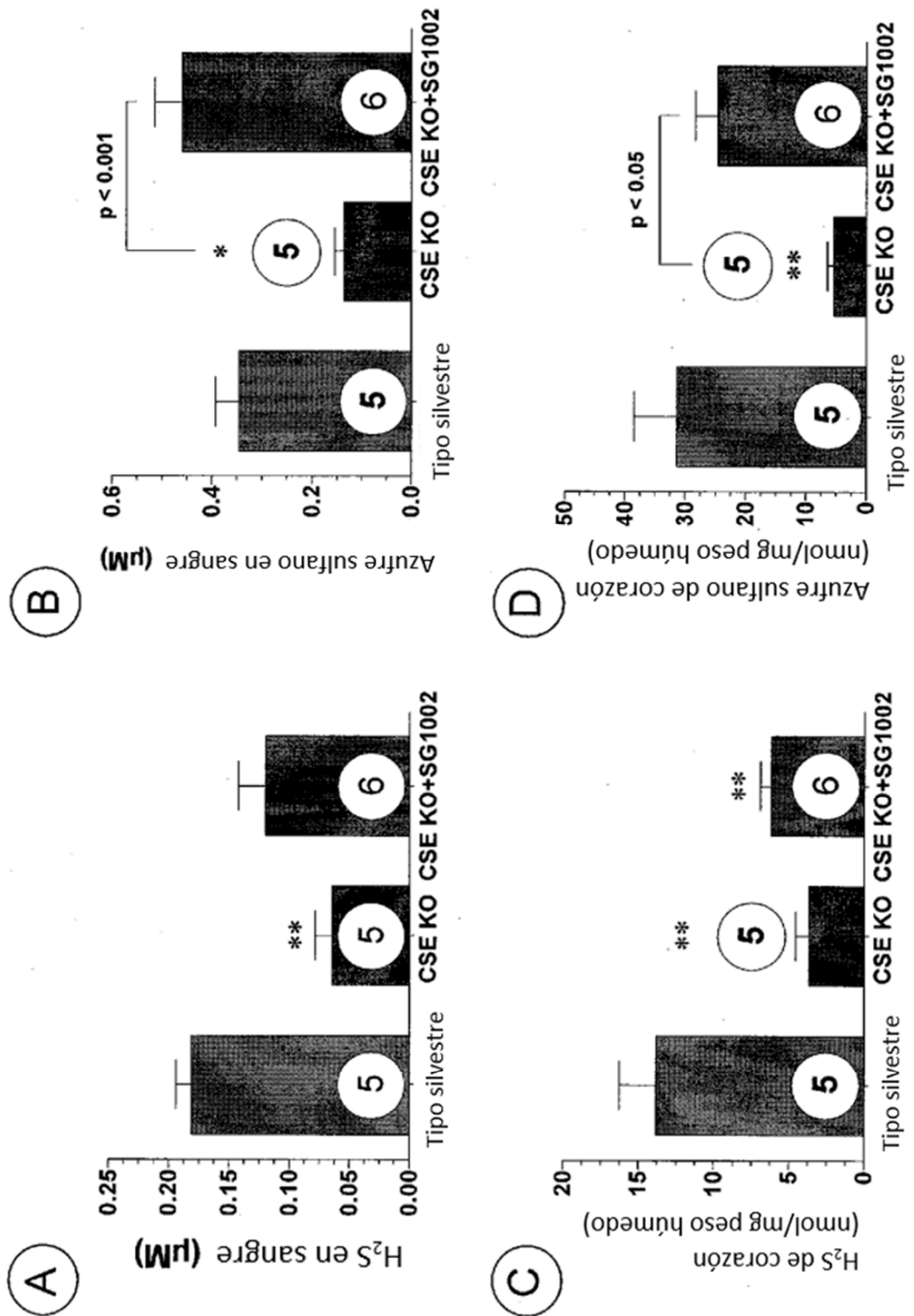
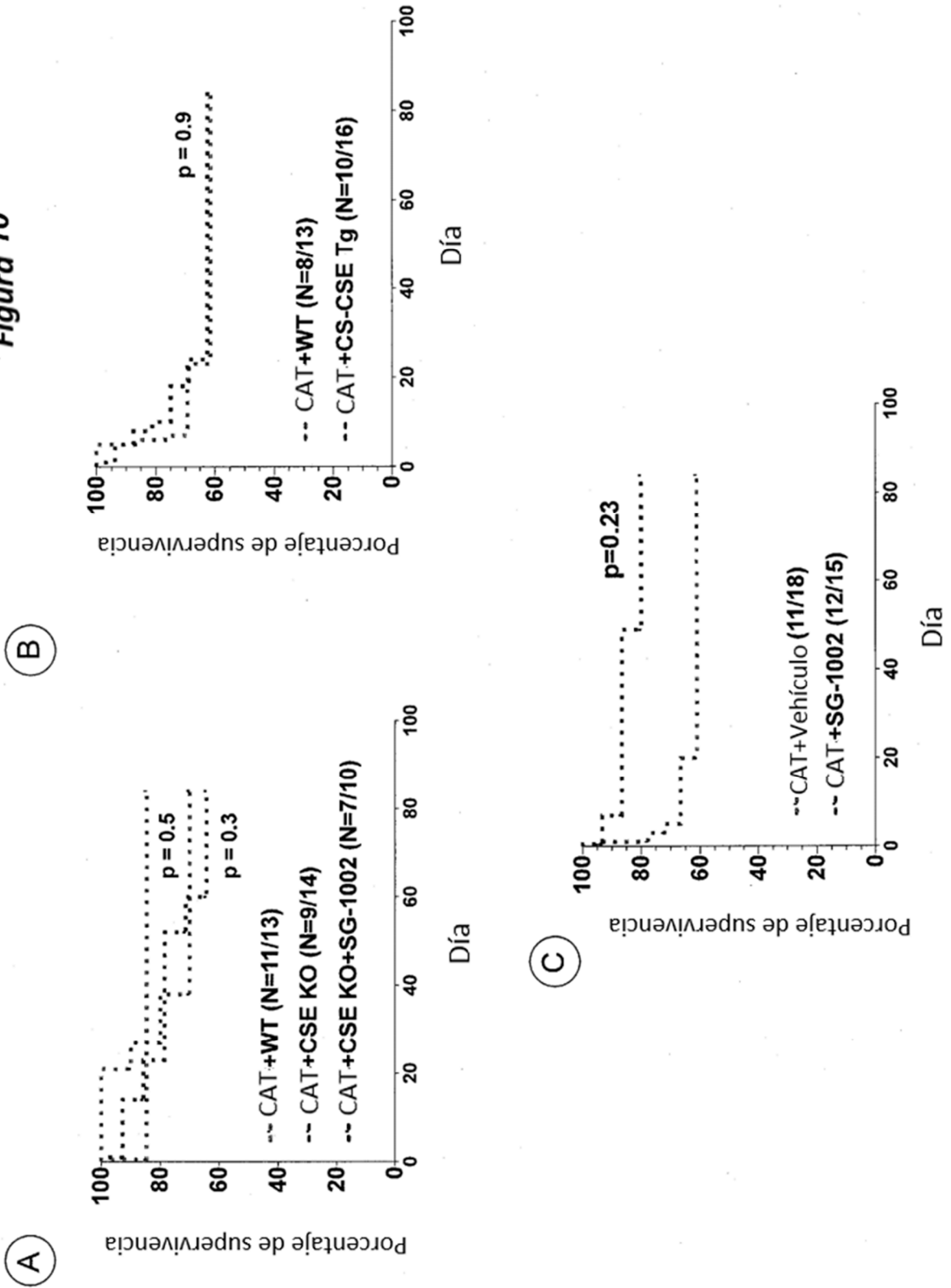
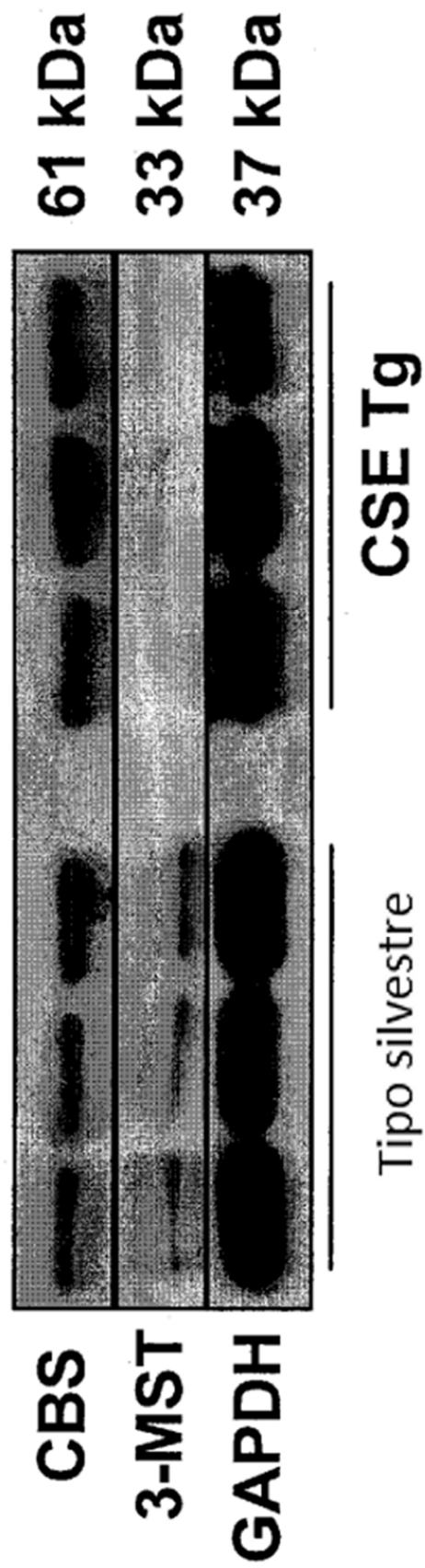


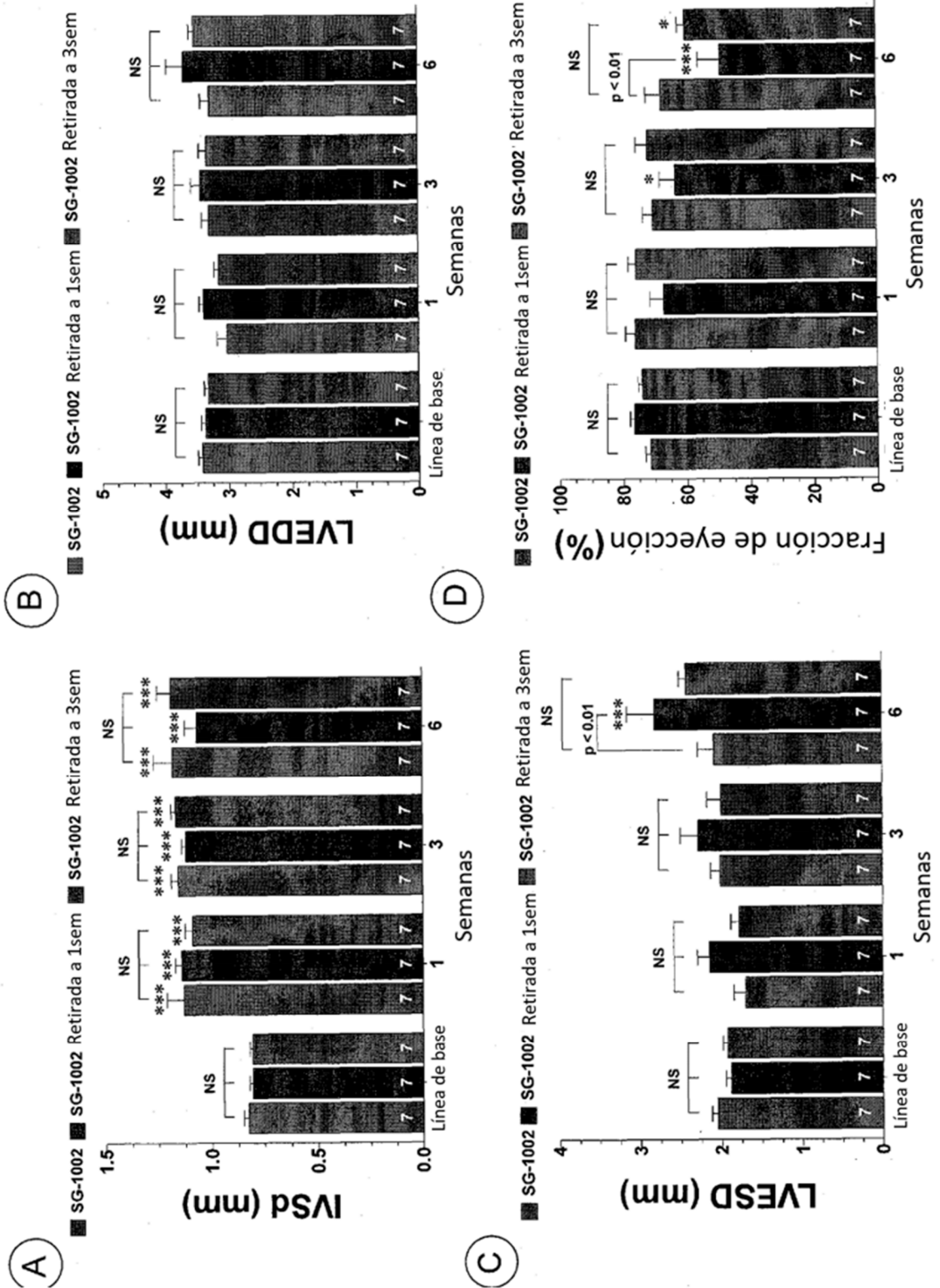
Figura 10



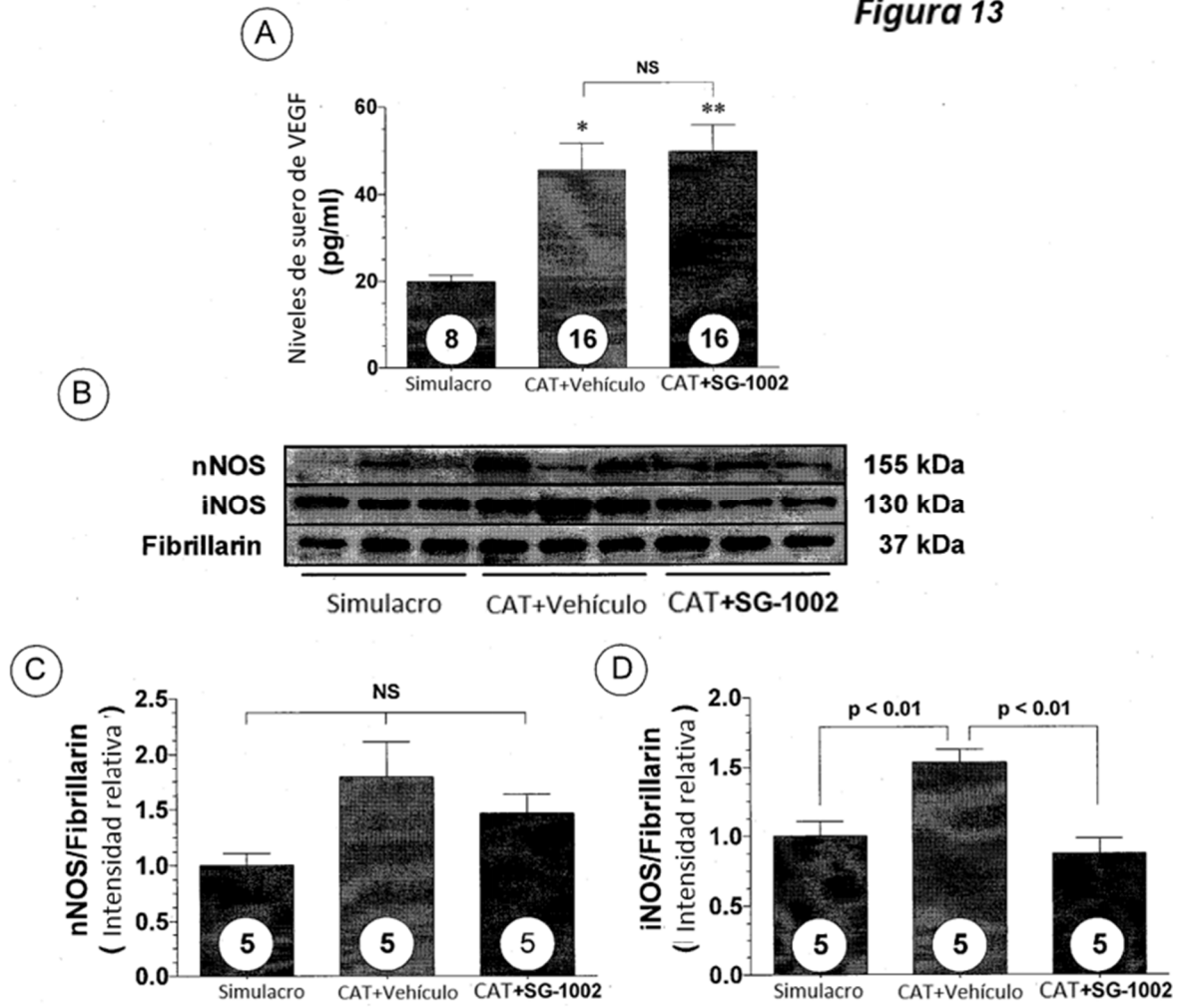
**Figura 11**



## Figura 12



**Figura 13**



# FIG. 14

## SULFURO DE HIDRÓGENO EN INSUFICIENCIA CARDÍACA

