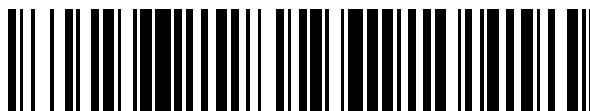


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 518**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/095 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2014** **PCT/GB2014/050608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014** **WO14132083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2014** **E 14709393 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 2961396**

54 Título: **Compuestos de sulfuro de hidrógeno para tratar preeclampsia o restricción del crecimiento fetal inducido por hipertensión**

30 Prioridad:

01.03.2013 GB 201303649

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2020

73 Titular/es:

ASTON UNIVERSITY (100.0%)
Aston Triangle Birmingham
West Midlands B4 7ET , GB

72 Inventor/es:

AHMED, ASIF y
WANG, KEQING

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 773 518 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

Compuestos de sulfuro de hidrógeno para tratar preeclampsia o restricción del crecimiento fetal inducido por hipertensión

La presente invención se refiere a procedimientos de tratamiento de preeclampsia o crecimiento fetal alterado inducido por hipertensión y a procedimientos de monitorización de dicho tratamiento, en los que se genera o se proporciona la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S).

El sulfuro de hidrógeno (H₂S), una molécula gaseosa de señalización, fomenta la vasodilatación¹ y estimula la angiogénesis en la vasculatura,² propiedades antiinflamatorias del H₂S³ y es también citoprotectora contra el daño celular inducido por hipoxia letal o lesión por reperusión.^{4, 5} La cistationina γ -liasa (CSE) es la enzima principal responsable de la producción endógena de H₂S.⁶ La administración prolongada del inhibidor de CSE DL-propargilglicina (PAG) conduce a tensión arterial elevada y remodelación vascular en la rata⁷ y tanto los niveles de CSE como de H₂S se reducen en ratas hipertensas pulmonarmente.⁸ Los ratones deficientes genéticamente en CSE desarrollan hipertensión dependiente de la edad, hiperhomocisteinemia grave y disfunción endotelial.⁹ De manera clara, el H₂S tiene múltiples papeles en la salud y la enfermedad,^{10, 11} sin embargo se desconoce su papel en la hipertensión inducida por la gestación.

La preeclampsia es un síndrome hipertensivo que afecta al 4-7 % de todas las gestaciones y es un factor contribuyente principal de la morbilidad y mortalidad materna y fetal en todo el mundo.¹² Se clasifica como preeclampsia proteinúrica y no proteinúrica.¹³ Mientras que las mujeres con preeclampsia proteinúrica presentan los síntomas clásicos, tales como hipertensión y proteinuria después de las 20 semanas de gestación, las mujeres con preeclampsia no proteinúrica son más propensas a padecer hipertensión y enfermedad hepática. En comparación con la hipertensión gestacional, este grupo de mujeres tiene más propensión a tener restricción del crecimiento intrauterino (IUGR).¹³ Se desconoce la causa exacta de la preeclampsia, pero existe una buena asociación con placentación anómala^{14, 15} y desequilibrio en factores angiogénicos.^{16, 17} De manera importante, los niveles circulantes de Flt-1 soluble (sFlt-1), el inhibidor endógeno del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PlGF) así como de endoglina soluble (sEng), el producto escindido del correceptor endoglina del factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), se elevan varias semanas antes de la aparición de las manifestaciones clínicas de la preeclampsia,^{18, 19} mientras que se reduce el PlGF en el primer trimestre de mujeres gestantes que desarrollaron posteriormente el síndrome.²⁰⁻²⁶ Junto con la disfunción endotelial, éstas se han convertido en el rasgo distintivo bioquímico de la preeclampsia grave. Pocos estudios han investigado las funciones de CSE/H₂S en la gestación. Recientemente, Patel *et al* demostraron que tanto la cistationina β -sintasa como la CSE están presentes en la placenta y tejidos intrauterinos humanos.^{27, 28} Dado que la placenta es un órgano muy vascular los inventores de la presente invención creen que la desregulación de la ruta de CSE/H₂S puede contribuir a anomalías placentarias y a una afección similar a la preeclampsia.

Yu *et al*, Placenta, 2012, 33(6), 487-494, describen el efecto de la S-alil-L-cisteína sobre los explantes placentarios *in vitro* en estrés oxidativo.

Cindrova-Davies *et al*, AM.J.Pathol., 2013, 182(4) 1448-1458, dan a conocer que los niveles reducidos de CSE se asocian con resistencia vascular aumentada en gestaciones con crecimiento restringido. Tao *et al*, 2005, C.A. Database No. de reg. 2006:688906 estudian el H₂S en pacientes con hipertensión inducida por la gestación.

Actualmente, los inventores de la presente invención, han demostrado ahora que los niveles plasmáticos de H₂S en la madre y la expresión de CSE en la placenta se reducen en las gestaciones complicadas por la preeclampsia en comparación con los controles de la misma edad gestacional. Se da a conocer la evidencia de la reducción en el H₂S circulante en la preeclampsia y que se acompaña de regulación por disminución de la CSE placentaria, la enzima clave responsable de la generación de H₂S endógeno. La inhibición de la actividad de CSE *ex vivo* de explantes placentarios del primer trimestre (8-12 semanas) de gestación da como resultado una disminución marcada en la producción de factor de crecimiento placentario (PlGF) y se inhibe la invasión de trofoblasto *in vitro*. La inhibición de CSE en ratones gestantes induce hipertensión, aumenta los niveles de sFlt-1 y sEng y provoca anomalías placentarias debido a la inhibición de la producción de H₂S como un compuesto que genera H₂S, GYY4137, de liberación lenta, recuperó el crecimiento fetal alterado por la inhibición de CSE e inhibió la subida de los niveles de sFlt-1 y sEng circulantes. Estos hallazgos indican que una ruta disfuncional de CSE/H₂S contribuye a la patogenia de la preeclampsia.

La presente invención da a conocer sulfuro de hidrógeno (H₂S) o un compuesto que genera H₂S para su utilización en el tratamiento de preeclampsia (PE) o la restricción del crecimiento fetal inducida por hipertensión (FGR inducido por hipertensión o restricción del crecimiento fetal intrauterino).

La adición de H₂S se ha demostrado que estimula, por ejemplo, la angiogénesis, dando como resultado la recuperación de riego sanguíneo al feto.

Esto significa también que, por ejemplo, se puede tratar también el parto prematuro (que es sólo parte de la presente

invención por lo que respecta a que está dentro del alcance de las reivindicaciones).

La preeclampsia, tal como se describió anteriormente, es un síndrome hipertensivo y un factor contribuyente principal a la morbilidad fetal. De manera adicional, el feto puede tener un crecimiento fetal alterado debido a la hipertensión inducida por la gestación. Este "crecimiento fetal alterado" produce recién nacidos con peso de nacimiento inferior y recién nacidos con un riesgo aumentado de complicaciones posteriormente.

El sujeto es normalmente un mamífero, especialmente un ser humano.

El H₂S se puede administrar, por ejemplo, como un gas o una solución, tal como en un disolvente portador.

Se conocen compuestos que donan H₂S que se producen de manera natural. Estos incluyen alicina del ajo que se descompone en disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo. El sulforafano se produce por el brócoli y la erucina se descubrió en la rúcula (*Eruca Sativa*). Estos se pueden proporcionar por vía oral, tal como en forma de comprimidos o cápsulas.

Se conocen varios compuestos de H₂S sintéticos. Estos incluyen GYY4137 (fosfinoditiolato de morfolin-4-ilo-4-metoxifenil (morfolino)) de Cayman Chemical. Este se ha utilizado anteriormente en estudios con ratas para estudiar la actividad de H₂S mediante inyección por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía intravenosa (i.v.). El reactivo de Lawesson es otro donador de H₂S.

El SG1002 (Sulfa GENIX Inc) es también un compuesto que produce H₂S y se puede utilizar. Ver también la Patente US 8,361,514 B.

La Anetol tritiona es también un donador de H₂S utilizado comúnmente. Se ha utilizado sulfuro de sodio en tampón (producido por Ikaria como IK-1001) en ensayos clínicos para lesión por reperfusión. Otros compuestos que generan H₂S se dan a conocer en Bannenberg G.L. y Viera HLA (Expert Opin. Ther. Patents (2009) 19(5) 663-682).

Otros compuestos se dan a conocer en el artículo de Predmore B.L. et al (Antioxidants and Redox Signalling (2012) 17 (1) 119-140), que incluye compuestos ADT-OH, TBZ e isotiocianato de 4-hidroxifenilo.

El compuesto puede ser ACS-14, AC583, ACS 84, ACS 85, ACS 86 (Lee M, J. Biol Chem (2010) 285, 17318-17328), DATS (trisulfuro de dialilo), S-diclofenaco, sulfuro de sulfano, tiocisteína, hidropersulfuro de GSH, GYY4137, SG1002, un derivado donador de H₂S de sildenafil (ACS6-Sparatore A et al Expert Rev, Clin. Pharmacol (2011) 4, 109-121), ADT-OH, TBZ e isotiocianato de 4-hidroxifenilo, tioglicina, 1-tiolisina, 1-tiovalina o sales de los mismos.

Otros compuestos de interés incluyen H₂S-Latanoprost, H₂S-sildenafil, H₂S-Sartans o H₂S-L-DOPA y derivados de cualquiera de estos.

Los compuestos se pueden introducir mediante cualquier medio adecuado, que incluye por vía oral i.p., i.v., intrauterina, por ejemplo, como un óvulo vaginal o por vía intramuscular. Se pueden administrar junto con uno o varios portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las dosis típicas pueden ser de 10 mmol/kg a 0,01 mol/kg, normalmente de 10 mmol/kg a 0,1 mmol/kg.

Los procedimientos de monitorización del tratamiento de la preeclampsia o el crecimiento fetal alterado, que comprenden la medición de la cantidad de H₂S en una muestra de sangre, suero o plasma en un sujeto antes del tratamiento con H₂S, o un compuesto, tal como se describió anteriormente, y comparándola con la cantidad en una muestra tomada después del tratamiento. El tratamiento de parto prematuro se puede monitorizar de manera similar.

Esto permite que la cantidad de H₂S en el cuerpo tenga la capacidad de garantizar que se proporcionan los niveles óptimos de H₂S. La cantidad de H₂S detectada se puede detectar mediante técnicas conocidas generalmente en la materia, tales como el procedimiento de ensayo descrito a continuación.

El sujeto se puede haber tratado con un compuesto, tal como se describió anteriormente o de manera alternativa otro anti-PE no relacionado como un compuesto contra el crecimiento fetal alterado.

La presente invención se describirá, a continuación, a modo de ejemplo, sólo con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1. Expresión de CSE y niveles de H₂S en la preeclampsia.

Figura 2. Efectos de la inhibición de CSE sobre la liberación del factor de angiogénesis de placenta del 1^{er} trimestre humana.

Figura 3. La CSE modula la liberación de sFlt-1 y sEng en células endoteliales.

Figura 4. El H₂S rescata la inhibición inducida por suero preeclámpico de la formación de tubos in vitro.

Figura 5. La inhibición de la CSE reduce el H₂S endógeno circulante y fomenta la hipertensión y la vascularización placentaria anómala en ratones gestantes.

Figura 6. El compuesto generador de H₂S, GYY4137, recuperó el crecimiento fetal e inhibió los sFlt-1 y sEng inducidos por la inhibición de la CSE en ratones gestantes.

Figura 7. Efecto de la inhibición de la CSE sobre invasión celular del trofoblasto.

Figura 8. El donador de H₂S recupera la vascularización placentaria en ratones gestantes.

Materiales y procedimientos

Recogida y preparación de tejido placentario

El Comité de Ética Institucional aprobó la recogida de sangre y tejido y se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Los inventores de la presente invención analizaron muestras de sangre de mujeres con gestaciones únicas seleccionadas en clínicas de bajo y alto riesgo y en la unidad de partos. Se realizó el seguimiento de manera prospectiva de todas las mujeres desde el ingreso hasta el parto. Se recogieron tejidos placentarios humanos de gestaciones con complicaciones por preeclampsia y de gestaciones sin complicaciones con asistencia al parto por cesárea programada. Las muestras de tejido placentario se procesaron para la extracción de ARN y se utilizó el plasma materno de las mismas pacientes (PE n=14 y control n=14) para el análisis. A partir de otro conjunto de pacientes se recogió placenta (PE n=5 y control n=5) para el estudio de inmunohistoquímica. Se definió la preeclampsia como una tensión arterial >140/90 mm Hg, como mínimo, en 2 mediciones consecutivas y una proteinuria materna, como mínimo, de 300 mg/24 h. Se recuperaron tejidos placentarios del primer trimestre (6-9 semanas de edad gestacional) de gestaciones normales que habían sufrido un aborto provocado. Se prepararon explantes de vellosidades, tal como se describió anteriormente.²⁹ Brevemente, se incubaron explantes de vellosidades placentarias humanas con o sin PAG durante 24 horas, y se recogió medio acondicionado y se sometió a ensayo para determinar sFlt-1 o sEng y PIGF.

Protocolo experimental con animales

Se aparearon ratones C57/black6 de ocho a diez semanas de edad. El primer día de gestación (E0.5) se definió por la presencia de un tapón vaginal a la mañana siguiente. Se asignaron de manera aleatoria los ratones gestantes a cuatro grupos: (i) solución salina (control de vehículo), (ii) 25 mg/kg de DL-propargilglicina (PAG; Sigma, Poole, R.U.), (iii) 50 mg/kg de grupos PAG y (iv) 50 mg/kg de PAG con 0,25 mg/kg de donador de H₂S de liberación lenta, GYY4137(Sigma). Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) solución salina o PAG a partir del E8.5. Se midió la tensión arterial mediante pletismografía de manguito en la cola. Se entrenó a los ratones para la medición en días alternos desde el E4.5. Alternativamente, se anestesió a los ratones mediante un cóctel de ketamina/xilazina. Se aisló la arteria carótida y se insertó una cánula con un catéter de micropunta de alta fidelidad 3-Fr conectado a un transductor de presión (Millar Instruments, Houston, Texas, EE.UU.). Se registró la tensión arterial y se promedió a lo largo de un periodo de 10 minutos. En el E17.5, después de la medición de la tensión arterial y la recogida de muestras de sangre se sacrificaron los animales y se recogieron el riñón, el hígado y la placenta. Se recogieron y se pesaron los fetos y las placentas no absorbidos.

Toda la experimentación se realizó, según la Ley de Animales del Reino Unido (procedimientos científicos), 1986 usando los procedimientos aprobados por el Comité de Revisión de Ética de la Universidad de Edimburgo.

Histopatología

El riñón, el hígado y la placenta se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas y se procesaron en parafina. Se cortaron una serie de secciones de 5 µm y se procesaron en tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

Cultivo celular

Se aislaron células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC) y se cultivaron, tal como se describió anteriormente.³⁰ Se realizaron los experimentos en las HUVEC de tercer o cuarto paso.

Interferencia de ARN

Para silenciar la expresión de CSE humana, se realizó la transfección de dúplex de ARN de interferencia pequeña (ARNip) usando electroporación (Nucleofector, Amaxa). Se sintetizaron ARNip de control y de CSE por Eurogentec (Colonia, Alemania). El silenciamiento de la CSE en las HUVEC se confirmó utilizando transferencia de tipo Western.

Transferencia génica adenoviral

Se purificaron el vector de adenovirus deficiente en replicación recombinante que codifica la CSE humana (AdCSE) y el vacío (AdEV) en gradientes de CsCl, se valoraron y se almacenaron a -80 °C en tampón de almacenamiento viral antes de su utilización, tal como se describió anteriormente.³¹ La multiplicidad óptima de infección para la AdCSE se determinó que era de 20 IFU/célula mediante transferencia de tipo Western utilizando un anticuerpo de conejo anti-CSE (Abcam). Se utilizaron HUVEC infectadas con AdEV como un control negativo.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Se obtuvieron kits de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar Flt-1 soluble, endoglina soluble y PIGF humano y murino de R&D Systems y se realizaron según las especificaciones del fabricante.

Inmunohistoquímica

Se prepararon una serie de secciones de 3-5 µm de tejido placentario humano y murino fijado en formalina, incrustado en parafina para la inmunohistoquímica, tal como se describió anteriormente.²⁹ Se utilizaron isoelectina B4 marcada con biotina, anti-CSE (5 mg/ml) y control de isotipo. Se analizó la tinción utilizando un microscopio invertido Nikon y un software de análisis de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)

Se realizó la preparación de muestras y la PCR cuantitativa en tiempo real, tal como se describió anteriormente.³⁰ Brevemente, se extrajo ARNm de tejido placentario utilizando TRIzol y digestión/purificación de ADNasa-1 en columnas RNaseasy (Qiagen), y se realizó la transcripción inversa con el kit de síntesis de ADNc (Promega). Se amplificaron patrones y muestras de ADNc por triplicado en SensiMix que contenía SYBR green (Quantace) con cebadores específicos de CSE (GCC-CAG-TTC-CGT-GAA-TCT-AA; CAT-GCT-GAA-GAG-TGC-CCT-TA) o β-actina. Se normalizó el ciclo de umbral medio (CT) para CSE a β-actina y se expresó en relación con el control.

Ensayo de angiogénesis *in vitro*

La formación espontánea de estructuras similares a capilares por las HUVEC en Matrigel reducido con factor de crecimiento (Becton Dickinson, Bedford, MA), se utilizó para evaluar el potencial angiogénico. Se trataron HUVEC con muestras plasmáticas recogidas de gestaciones con complicaciones por preeclampsia y gestaciones sin complicaciones con o sin donador de H₂S (NaHS) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se recubrieron placas de noventa y seis pocillos con Matrigel (10 mg/ml) según las instrucciones del fabricante. A continuación, se sembraron las HUVEC (1 × 10⁴ células/pocillo) sobre placas recubiertas con Matrigel. Después de la incubación durante 6 horas, se observaron células con microscopio invertido Nikon y se registraron los resultados experimentales utilizando el software de análisis de imágenes Image Pro-Plus (Media Cybernetics).

Medición de H₂S en plasma

Se obtuvo sangre citrada de mujeres con gestaciones sin complicaciones (n=14) y preeclampsia (n=14) y también de ratones gestantes antes de la terminación de la gestación. Se midieron los niveles de H₂S, tal como se describió anteriormente, con modificación.³² Brevemente, se mezclaron 75 µl de plasma con 250 µl de acetato de zinc al 1 % (p/v) y 425 µl de agua, seguido por 250 ml de ácido tricloroacético al 50 % para retirar la proteína. A continuación, se añadieron 133 µl de sulfato de N-dimetil-p-fenilendiamina 20 mM en HCl 7,2 mM y 133 µl de FeCl₃ 30 µM en HCl 1,2 mM a la mezcla. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se sedimentaron las mezclas de reacción mediante centrifugación a 10.000 g (2 minutos). Se midió la absorbancia de la solución resultante a 670 nm con un espectrofotómetro en una placa de 96 pocillos. Se calculó la concentración de H₂S en la solución contra una curva de calibración de hidrogenosulfuro de sodio.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media±EEM. Se sometió a ensayo la significancia de la diferencia entre las medias mediante una prueba de la t de Man Whitney no paramétrica. Para el análisis estadístico de los cambios en muestras clínicas, se utilizó ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls según fuera apropiado. Un observador desconocedor del tratamiento realizó los análisis. La significancia estadística se estableció a p<0,05.

Resultados

La expresión de CSE de placenta se reduce en la preeclampsia

Para investigar si la actividad de CSE/H₂S se altera en la preeclampsia, se midió el H₂S en plasma obtenido de

gestaciones de control con la misma edad gestacional y las complicadas por preeclampsia. Los niveles plasmáticos maternos de H_2S se redujeron significativamente en la preeclampsia en comparación con el grupo de control (figura 1A). La PCR cuantitativa en tiempo real reveló que la expresión de ARNm de la CSE se redujo significativamente en la placenta preecláptica (figura 1B) y la tinción inmunohistoquímica confirmó que la inmunoreactividad de la CSE se redujo de manera drástica en estas muestras (figura 1C iv) lo que sugirió que los cambios en los niveles de CSE placentaria afectan a los niveles de H_2S circulante maternos. La expresión de la CSE se localizó en el trofoblasto, el endotelio y las células mesenquimatosas dentro del núcleo de las vellosidades coriónicas. Las últimas son posiblemente las células de Hofbauer, que son de origen mesenquimatoso (figura 1C iii). Las características clínicas de los pacientes del estudio se describen en la tabla 1.

La inhibición de la actividad de la CSE reduce la liberación de PIGF en explantes placentarios

Los factores angiogénicos producidos por la placenta son importantes en la regulación del desarrollo vascular placentario.³³ El desequilibrio de los factores proangiogénicos y antiangiogénicos generados por la placenta²⁹ puede explicar la disfunción endotelial materna extendida en la preeclampsia.³⁴ Para investigar si los niveles reducidos de CSE tienen algún efecto sobre la producción de factor angiogénico placentario, se midieron los niveles de sFlt-1, sEng y PIGF en medio acondicionado a partir de explantes placentarios humanos del primer trimestre en presencia de una concentración creciente de inhibidor de CSE PAG a lo largo de 24 horas. Mientras que los niveles de sFlt-1 y sEng permanecieron sin cambios por la inhibición de la actividad de la CSE, la producción de PIGF se redujo significativamente (figura 2). Esto sugiere que la reducción en el H_2S endógeno puede alterar la proporción sFlt-1/PIGF placentaria, que se ha implicado en la patogénesis de la preeclampsia.^{18, 29} Además, se observó una reducción significativa ($p < 0,01$) en la invasión celular cuando se incubaron células de trofoblasto del primer trimestre (HTR-8/SVneo) con el inhibidor específico de CSE, PAG (50 μM), en comparación con el control de vehículo (figuras S1A y S1B complementarias), lo que sugiere que la falta de actividad de la CSE puede afectar a la perfusión placentaria que es esencial para establecer una gestación normal.

La CSE modula la liberación de sFlt-1 y sEng en células endoteliales

Aunque se ha considerado que la placenta es la fuente principal de liberación de sFlt-1 y sEng en las pacientes con preeclampsia, algunos estudios han demostrado que los niveles de sFlt-1 permanecieron elevados en mujeres con antecedentes de preeclampsia en comparación con aquellas sin preeclampsia un promedio de 18 meses después del parto^{35, 36} lo que sugiere que otros medios antiangiogénicos están implicados en el proceso. Para investigar si la CSE afecta a la liberación de sFlt-1 y sEng en células endoteliales, se moduló la expresión de CSE por ARNip o adenovirus en HUVEC. La regulación por disminución de la CSE aumentó tanto la liberación de sFlt-1 como de sEng (figura 3A, 3B) mientras que la sobreexpresión de CSE inhibió la liberación de sFlt-1 y sEng por HUVEC (figura 3C, 3D). Estos datos respaldan además el concepto de que la pérdida de actividad de la CSE puede contribuir a la patología de la preeclampsia.

El H_2S rescata de manera parcial la inhibición inducida por plasma preecláptico de la formación de tubos *in vitro*

Se ha demostrado que el sFlt-1 en exceso generado por la placenta preecláptica inhibe la formación de tubos endoteliales *in vitro* y la retirada de sFlt-1 de las muestras con preeclampsia recupera la angiogénesis.²⁹ Para evaluar si el H_2S puede invertir los efectos antiangiogénicos de la preeclampsia, se añadió plasma de mujeres normotensas o preeclápticas a HUVEC que se hicieron crecer en Matrigel reducido en factor de crecimiento en presencia de NaHS 100 mM, un donador de H_2S , y se realizó el ensayo de formación de tubos *in vitro*. De manera coherente con los primeros hallazgos, el plasma preecláptico inhibió la formación de la red de tubos capilares en comparación con los sueros de control normales (figura 4). De manera más importante, el NaHS, un donador de H_2S , recuperó de manera parcial la capacidad de las HUVEC para formar una estructura similar a tubos (figura 4A, 4B).

El bloqueo de H_2S endógeno provoca hipertensión y vascularización placentaria anómala en ratones gestantes

Los inventores de la presente invención predijeron que la inhibición de la CSE *in vivo* podría provocar un síndrome similar a la preeclampsia en ratones gestantes. Se trataron diariamente tres grupos (5-8/grupo) de ratones C57B16/J gestantes con vehículo o 25 mg/kg de PAG o 50 mg/kg de PAG desde el E8.5 hasta el E16.5. Después de 8 días de tratamiento, se combinó plasma de todos los animales en cada grupo de tratamiento, y se midieron los niveles de H_2S combinados. La PAG provocó una disminución dependiente de la dosis en los niveles de H_2S circulante. La mayor dosis redujo los niveles plasmáticos de H_2S en aproximadamente el 50 % (figura 5A). De manera coherente con estos datos, se descubrió que la tensión arterial media en el grupo tratado con alta dosis de PAG fue significativamente mayor en comparación con el control de vehículo ($74,40 \pm 4,61$ y $64,74 \pm 2,04$) (tabla 2). Aunque no se observaron cambios patológicos renales, tales como la proteinuria en animales tratados con PAG (tabla 2), se descubrió daño hepático representado por un nivel aumentado de aspartato transaminas (AST) de enzimas hepáticas circulantes en animales tratados con PAG (tabla 2). Estos datos sugieren que la falta de actividad de la CSE puede provocar preeclampsia no proteinúrica. De manera interesante, todos los cambios de ratones gestantes

tratados con PAG se anularon mediante el tratamiento con compuesto generador de H₂S, GYY4137, de liberación lenta (0,25 mg/kg) (tabla 2). Los análisis histológicos ciegos de secciones placentarias mostraron que el espacio sanguíneo materno en la zona del laberinto pareció mayor en animales tratados con 50 mg/kg de PAG que en los controles de vehículo (figura 5B). La zona del laberinto consiste en células de trofoblasto y de origen mesodérmico que juntas experimentan una morfogénesis ramificada, lo que da como resultado una gran área superficial para el intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto. El espacio sanguíneo materno se reviste por trofoblasto. Durante el desarrollo placentario, este espacio se vuelve de manera progresiva más finamente dividido.^{37, 38} Usando isolectina B₄ para resaltar la célula endotelial fetal,³⁹ los inventores de la presente invención compararon las características anatómicas de la zona del laberinto en ratones tratados con vehículo y con 50 mg/kg de PAG. En los ratones de control, el laberinto apareció como vasos fetales organizados con morfogénesis ramificada bien desarrollada. En cambio, la vasculatura fetal de la placenta en animales tratados con PAG se observó como una ramificación irregular (figura 5C) y la vasculatura materna parecía estar dilatada. La morfología de la placenta de animales tratados con PAG sugiere un defecto vascular placentario debido a la inhibición de la actividad de la CSE. Este defecto también se recuperó mediante el tratamiento con el donador de H₂S, GYY4137 (figura S2).

Los efectos de la inhibición de la actividad de la CSE sobre los desenlaces fetales y la producción de sFlt-1 y sEng

El peso fetal disminuyó significativamente en los ratones que recibieron la mayor dosis de PAG (figura 6A). Esto podría explicarse por el defecto vascular placentario inducido por la inhibición de actividad de la CSE. GYY4137, a 0,25 mg/kg recuperó el crecimiento fetal comprometido por el inhibidor de CSE (figura 6A). Además, GYY4137 inhibió los niveles plasmáticos de sFlt-1 y sEng inducidos por la inhibición de CSE (figura 6B y 6C) en ratones tratados con 50 mg/kg de PAG (figuras 5B y 5C). El PIGF plasmático estaba por debajo del límite de detección del ensayo. Estos datos sugieren que la inhibición de la actividad de la CSE altera el equilibrio angiogénico materno y el H₂S puede ayudar a recuperar el estado angiogénico normal.

Análisis

La administración crónica de un inhibidor de CSE conduce a H₂S reducido y tensión arterial aumentada en ratas.⁷ Por tanto, es plausible que una reducción en el nivel de H₂S circulante pueda contribuir a la hipertensión en la preeclampsia. En este estudio se dan a conocer evidencias de que la preeclampsia se asocia con H₂S circulante reducido, que se acompaña de la regulación por disminución de la CSE placentaria, la enzima clave responsable de la generación de H₂S endógeno. Además, la inhibición de CSE en ratones gestantes induce hipertensión, aumenta los niveles de sFlt-1 y sEng y provoca anomalías placentarias. Esto es debido a la inhibición de la producción de H₂S ya que un compuesto que genera H₂S, GYY4137 de liberación lenta, inhibió los niveles de sFlt-1 y sEng circulantes y recuperó el crecimiento fetal comprometido por la inhibición de CSE. Estos hallazgos indican que una ruta disfuncional de CSE/H₂S puede contribuir a la patogenia de la preeclampsia.

El H₂S es un factor vasorrelajante que actúa a través de los canales de K_{ATP} que provocan la relajación del músculo liso.^{1, 40} Los estudios que usan ratones deficientes genéticamente en CSE demostraron que esta enzima es la principal fuente de H₂S tanto en la vasculatura como en los tejidos periféricos.⁹ Recientemente, se descubrió la expresión de CSE en la placenta y el miometrio gestante y se demostró que desempeña un papel en la contractilidad uterina.^{27, 28} En este estudio, los niveles de CSE placentaria se redujeron de manera drástica en las pacientes preeclámpticas en comparación con los controles normotensos. Un estudio reciente demostró también un patrón similar en la CSE en placenta preecláptica.⁴¹ Estos hallazgos sugieren que la falta de la CSE conduce a la reducción en el H₂S circulante.

El desequilibrio angiogénico se ha resaltado como el principal responsable de la preeclampsia por encima de la inflamación sistémica.^{42, 43} En este estudio, se descubrió que la CSE era un regulador negativo de los factores antiangiogénicos, sFlt-1 y sEng, en células endoteliales, lo que sugiere que la desregulación de la CSE puede contribuir a la disfunción endotelial duradera y a un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular en mujeres con antecedentes de preeclampsia. Además, la disminución de la actividad de VEGF y PIGF en la preeclampsia se cree que es el resultado del sFlt-1 en exceso.^{16, 18} Como los niveles de sFlt-1 son comparables a los controles sanos durante el primer trimestre de la gestación, esta teoría no explica por qué los niveles circulantes de PIGF son bajos en la gestación temprana en mujeres que desarrollan posteriormente preeclampsia.⁴⁴ Los hallazgos de que la inhibición de generación de H₂S placentaria endógena por el inhibidor de CSE atenúa la producción de PIGF en los explantes placentarios del primer trimestre dan a conocer una posible explicación y una nueva hipótesis para la prueba: concretamente, la disminución de la expresión de PIGF en la gestación temprana es debida a la pérdida o reducción en las enzimas que producen H₂S. Además, la inhibición de la actividad de la CSE suprimió la invasión de células de trofoblasto extravelosas del primer trimestre lo que sugiere que la desregulación de la ruta de CSE/H₂S puede cambiar no sólo el equilibrio de los factores placentarios proangiogénesis y antiangiogénesis, sino desregularizar también la remodelación de la arteria espiral materna y el desarrollo placentario.

En ratones gestantes, la inhibición de la CSE redujo el H₂S endógeno y esto se acompañó por un aumento de la tensión arterial, y daño hepático sin cambios patológicos renales tales como proteinuria y endoteliosis glomerular, un síndrome similar a la preeclampsia no proteinúrica. Sin embargo, sugiere también que otros factores están

implicados también en el espectro completo de la preeclampsia. La preeclampsia se asocia también de manera fuerte con anomalías placentarias incluyendo volumen de vellosidades y área superficial comprometidos, así como una vascularización placentaria reducida.^{15, 45} En los ratones tratados con PAG, el laberinto fetal mostró morfogénesis ramificada alterada, lo que indica que se requiere H₂S endógeno para el desarrollo placentario.

Se ha notificado que se produce perfusión placentaria y oxígeno subóptimo y difusión de nutrientes alterados como un resultado de la vascularización del laberinto inapropiada con estructuración, ramificación y dilatación alteradas.⁴⁶ Se rescataron la tensión arterial, la función hepática y el peso fetal comprometidos mediante el tratamiento con PAG por el compuesto generador de H₂S, GYY4137, de liberación lenta, lo que demuestra que los efectos del inhibidor de CSE se debieron a la inhibición de producción de H₂S. Estos resultados implican que se requiere H₂S endógeno para que una vasculatura placentaria sana apoye el bienestar fetal.

Perspectiva clínica

El presente estudio muestra que la desregulación de la ruta de CSE/H₂S se asocia con preeclampsia y la inhibición de la actividad de la CSE en ratones gestantes produce algunas de las características de la preeclampsia, incluyendo la hipertensión y desenlaces fetales alterados. Estos hallazgos apoyan el concepto de que el H₂S es un importante regulador del desarrollo de la vasculatura placentaria, cuya deficiencia parece asociarse con preeclampsia y restricción del crecimiento fetal.

PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

Ensayo de invasión de células de trofoblasto

La línea celular de trofoblasto extravelosa (EVT) humana HTR-8/SVneo fue un amable regalo del profesor Charles H. Graham, Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá. El ensayo de invasión se realizó, tal como se describió anteriormente, con modificación.³⁰ Brevemente, se colocaron las células HTR-8/SVneo (50.000) tratadas con o sin PAG en la cámara superior de insertos Transwell (1 mg/ml) recubiertos con Matrigel (poro de 8 µm, Falcon, BD, R.U.) y se colocaron en una placa de 24 pocillos. Se permitió que las células invadieran de un extremo a otro la matriz extracelular reconstituida durante 24 horas en presencia o ausencia de PAG 50 µM (n=3). Las células de trofoblasto localizadas sobre el envés de la membrana Transwell se fijaron con metanol enfriado con hielo y se tiñeron con hematoxilina, y se obtuvieron imágenes de campo claro obtenidas con un microscopio invertido Nikon y el software de análisis de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics).

Inmunohistoquímica

Se prepararon una serie de secciones de 3-5 µm de tejido placentario murino fijado en formalina, incrustado en parafina para la inmunohistoquímica, tal como se describió anteriormente.⁴⁸ Se utilizó isolectina B4 marcada con biotina. Se analizó la tinción utilizando un microscopio invertido Nikon y el software de análisis de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics).

Figura 7. Efecto de la inhibición de la CSE sobre la invasión celular del trofoblasto. Se realizaron ensayos de migración Transwell de células HTR-8/SVneo en presencia de 50 µM de PAG, tal como se describió en los Procedimientos. (A) Se tiñeron las HTR-8/SVneo migradas con hematoxilina, y se capturaron imágenes de campo claro. (B) Se contó el número de células, y se expresaron los resultados como un porcentaje del control (n=3).

Figura 8. El donador de H₂S recupera la vascularización placentaria en ratones gestantes. El tejido placentario de ratones recibió (A) PAG 50 mg/kg o (B) PAG 50 mg/kg más una inyección de GYY4137, se seccionaron y tiñeron con isolectina B4 para visualizar la zona del laberinto hemotricorial.

REFERENCIAS

1. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *Embo J.* 2001;20(21):6008-6016.
2. Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R, Szabo C. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(51):21972-21977.
3. Zanardo RC, Brancialeone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *Faseb J.* 2006;20(12):2118-2120.
4. Blackstone E, Roth MB. Suspended animationlike state protects mice from lethal hypoxia. *Shock.* 2007;27(4):370-372.
5. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H,

Chow CW, Lefer DJ. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15560-15565.

6. Kabil O, Vitvitsky V, Xie P, Banerjee R. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(2):363-372.

7. Yan H, Du J, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(1):22-27.

8. Yanfei W, Lin S, Junbao D, Chaoshu T. Impact of L-arginine on hydrogen sulfide/cystathionine-gamma-lyase pathway in rats with high blood flow-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(2):851-857.

9. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901):587-590.

10. Li L, Moore PK. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(2):84-90.

11. Banerjee R. Hydrogen sulfide: redox metabolism and signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(2):339-341.

12. Hogberg U. The World Health Report 2005: "make every mother and child count" - including Africans. *Scand J Public Health*. 2005;33(6):409-411.

13. Homer CS, Brown MA, Mangos G, Davis GK. Non-proteinuric pre-eclampsia: a novel risk indicator in women with gestational hypertension. *J Hypertens*. 2008;26(2):295-302.

14. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu*. 1972;1:177-191.

15. Egbor M, Ansari T, Morris N, Green CJ, Sibbons PD. Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction. *Bjog*. 2006;113(5):580-589.

16. Ahmed A, Cudmore MJ. Can the biology of VEGF and haem oxygenases help solve pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 6): 1237-1242.

17. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol*. 2011;31(1):33-46.

18. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350(7):672-683.

19. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*. 2006;355(10):992-1005.

20. Torry DS, Wang HS, Wang TH, Cudde MR, Torry RJ. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179(6 Pt 1): 1539-1544.

21. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(1):177-182.

22. Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, Blink AL, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. *Jama*. 2005;293(1):77-85.

23. Buhimschi CS, Norwitz ER, Funai E, Richman S, Guller S, Lockwood CJ, Buhimschi IA. Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(3):734-741.

24. Savvidou MD, Noori M, Anderson JM, Hingorani AD, Nicolaides KH. Maternal endothelial function and serum concentrations of placental growth factor and soluble endoglin in women with abnormal placentation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(7):871-876.

25. Foidart JM, Munaut C, Chantraine F, Akolekar R, Nicolaides KH. Maternal plasma soluble endoglin at 11-13

weeks' gestation in pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;35(6):680-687.

26. Noori M, Donald AE, Angelakopoulou A, Hingorani AD, Williams DJ. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. *Circulation.* 2010;122(5):478-487.

27. Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:10.

28. You XJ, Xu C, Lu JQ, Zhu XY, Gao L, Cui XR, Li Y, Gu H, Ni X. Expression of cystathionine betasynthase and cystathionine gamma-lyase in human pregnant myometrium and their roles in the control of uterine contractility. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e23788.

29. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res.* 2004;95(9):884-891.

30. Ahmad S, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, Haigh JJ, le Noble F, Wang L, Mukhopadhyay D, Ahmed A. Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res.* 2006;99(7):715-722.

31. Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, Devey LR, Wigmore SJ, Abbas A, Hewett PW, Ahmed A. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation.* 2007;115(13):1789-1797.

32. Zhuo Y, Chen PF, Zhang AZ, Zhong H, Chen CQ, Zhu YZ. Cardioprotective effect of hydrogen sulfide in ischemic reperfusion experimental rats and its influence on expression of surviving gene. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(8):1406-1410.

33. Reynolds LP, Redmer DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci.* 1995;73(6):1839-1851.

34. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111(5):649-658.

35. Saxena AR, Karumanchi SA, Brown NJ, Royle CM, McElrath TF, Seely EW. Increased sensitivity to angiotensin II is present postpartum in women with a history of hypertensive pregnancy. *Hypertension.* 2010;55(5):1239-1245.

36. Wolf M, Hubel CA, Lam C, Sampson M, Ecker JL, Ness RB, Rajakumar A, Daftary A, Shakir AS, Seely EW, Roberts JM, Sukhatme VP, Karumanchi SA, Thadhani R. Preeclampsia and future cardiovascular disease: potential role of altered angiogenesis and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6239-6243.

37. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2002;250(2):358-373.

38. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:180-193.

39. Ohlsson R, Falck P, Hellstrom M, Lindahl P, Bostrom H, Franklin G, Ahrlund-Richter L, Pollard J, Soriano P, Betsholtz C. PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev Biol.* 1999;212(1):124-136.

40. Tang G, Wu L, Wang R. The effect of hydroxylamine on KATP channels in vascular smooth muscle and underlying mechanisms. *Mol Pharmacol.* 2005;67(5):1723-1731.

41. Holwerda KM, Bos EM, Rajakumar A, Ris-Stalpers C, van Pampus MG, Timmer A, Erwich JJ, Faas MM, van Goor H, Lely AT. Hydrogen sulfide producing enzymes in pregnancy and preeclampsia. *Placenta.* 2012;33(6):518-521.

42. Ramma W, Ahmed A. Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans.* 2011;39(6):1619-1627.

43. Ramma W, Buhimschi IA, Zhao G, Dulay AT, Nayeri UA, Buhimschi CS, Ahmed A. The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia. *Angiogenesis.* 2012;15(3):333-340.

44. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, Ecker J, Karumanchi SA. First trimester placental growth factor and soluble fmslike tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(2):770-775.

5 45. Chen CP. Placental abnormalities and preeclampsia in trisomy 13 pregnancies. Taiwan J Obstet Gynecol. 2009;48(1):3-8.

46. Cross JC, Simmons DG, Watson ED. Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. Ann N Y Acad Sci. 2003;995:84-93.

10 47. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, *in vivo*. J Clin Invest. 1992;89(1):210-222.

15 48. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. Circ Res. 2004;95(9):884-891.

LISTA DE SECUENCIAS

20 <110> Aston University

<120> Compuestos de sulfuro de hidrógeno

<130> Patente p340883PCT

25 <150> Gbl303649.6
<151> 01-03-2013

<160> 2

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 20

35 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

40 gccacgttcc gtgaatctaa 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

catgctgaag agtgccctta 20

50

REIVINDICACIONES

1. Sulfuro de hidrógeno (H₂S) o compuesto que genera (H₂S) para su utilización en el tratamiento de preeclampsia (PE) o restricción del crecimiento fetal inducido por hipertensión.

5 2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que el compuesto es H₂S, ACS 14, ACS583, ACS 84, ACS 85, ACS 86, DATS (trisulfuro de dialilo), S-diclofenaco, sulfuro de sulfano, tiocisteína, hidropersulfuro de GSH, GYY4137, SG1002, un derivado donador de H₂S de sildenafil, ADT-OH, TBZ e isotiocianato de 4-hidroxifenilo, tioglicina, 1-tiolisina, 1-tiovalina o sales de los mismos, H₂S-Sartans o H₂S-L-DOPA.

10 3. Procedimiento de monitorización del tratamiento de preeclampsia o crecimiento fetal alterado inducido por hipertensión, que comprende medir la cantidad de H₂S en una muestra de sangre, suero o plasma en un sujeto gestante antes del tratamiento y compararla con la cantidad en una muestra tomada después del tratamiento, en el que el sujeto se ha tratado con H₂S, un compuesto que genera H₂S o compuesto de estimulación de la producción
15 de H₂S.

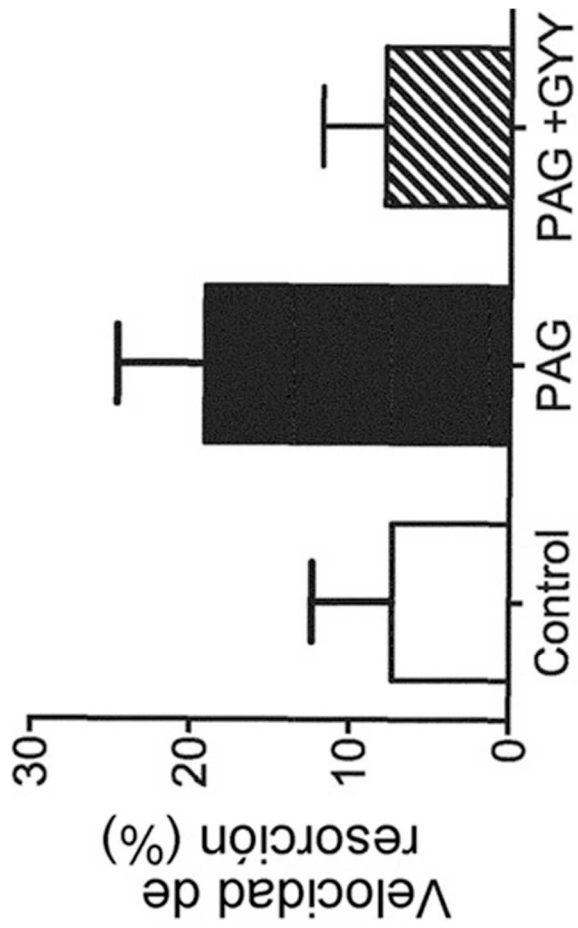


Figura 1

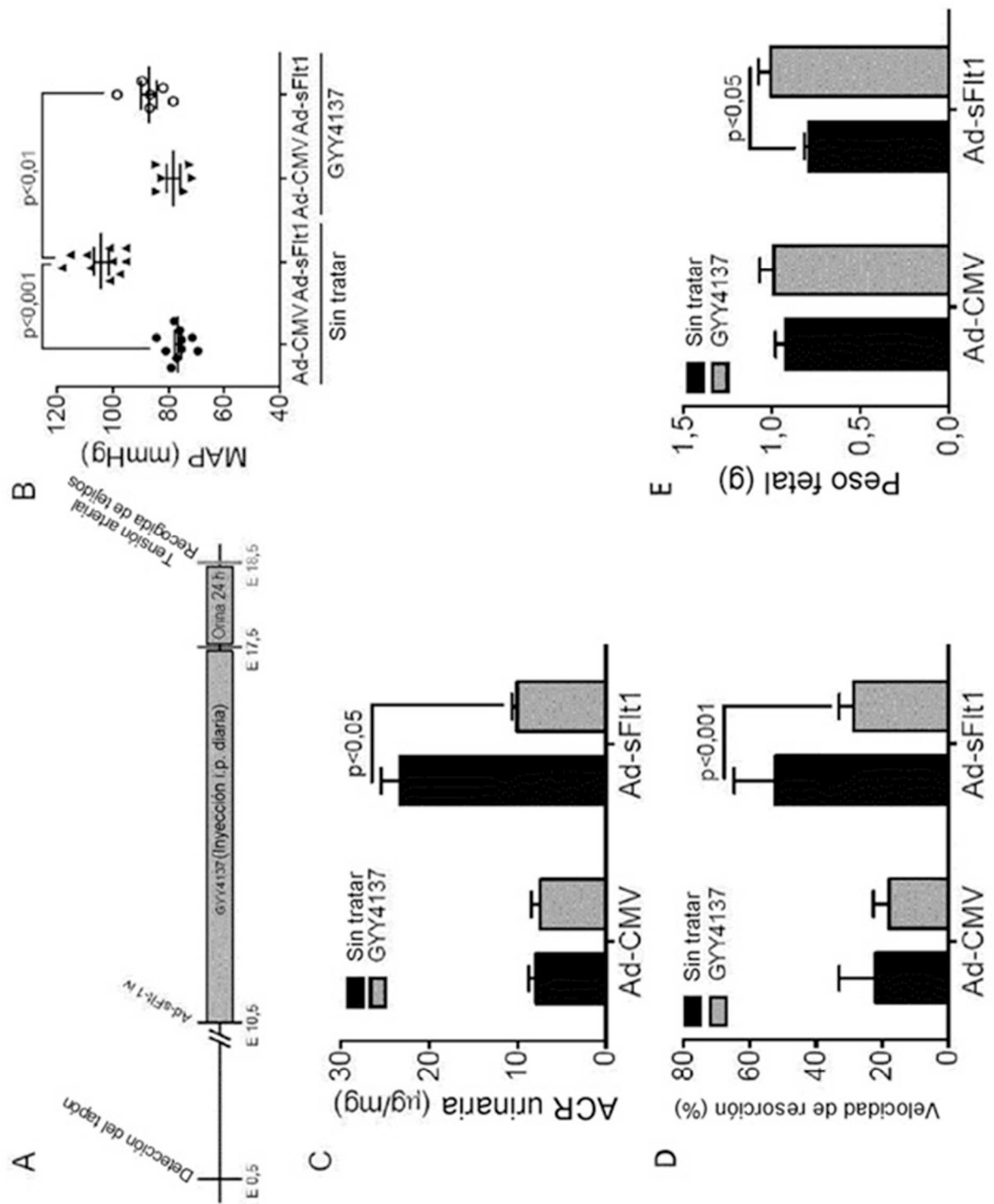


Figura 2

Figura 3

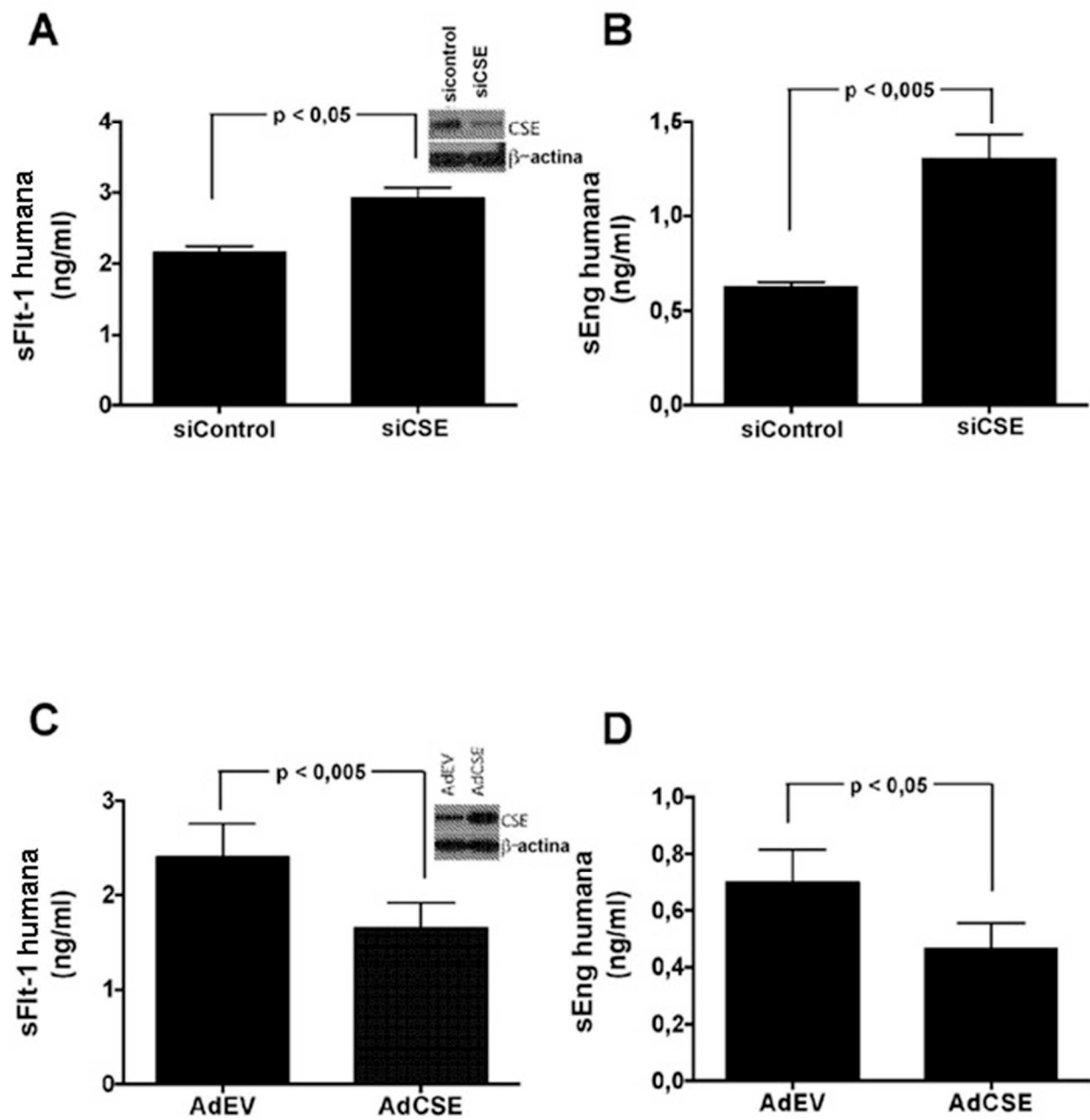


Figura 4

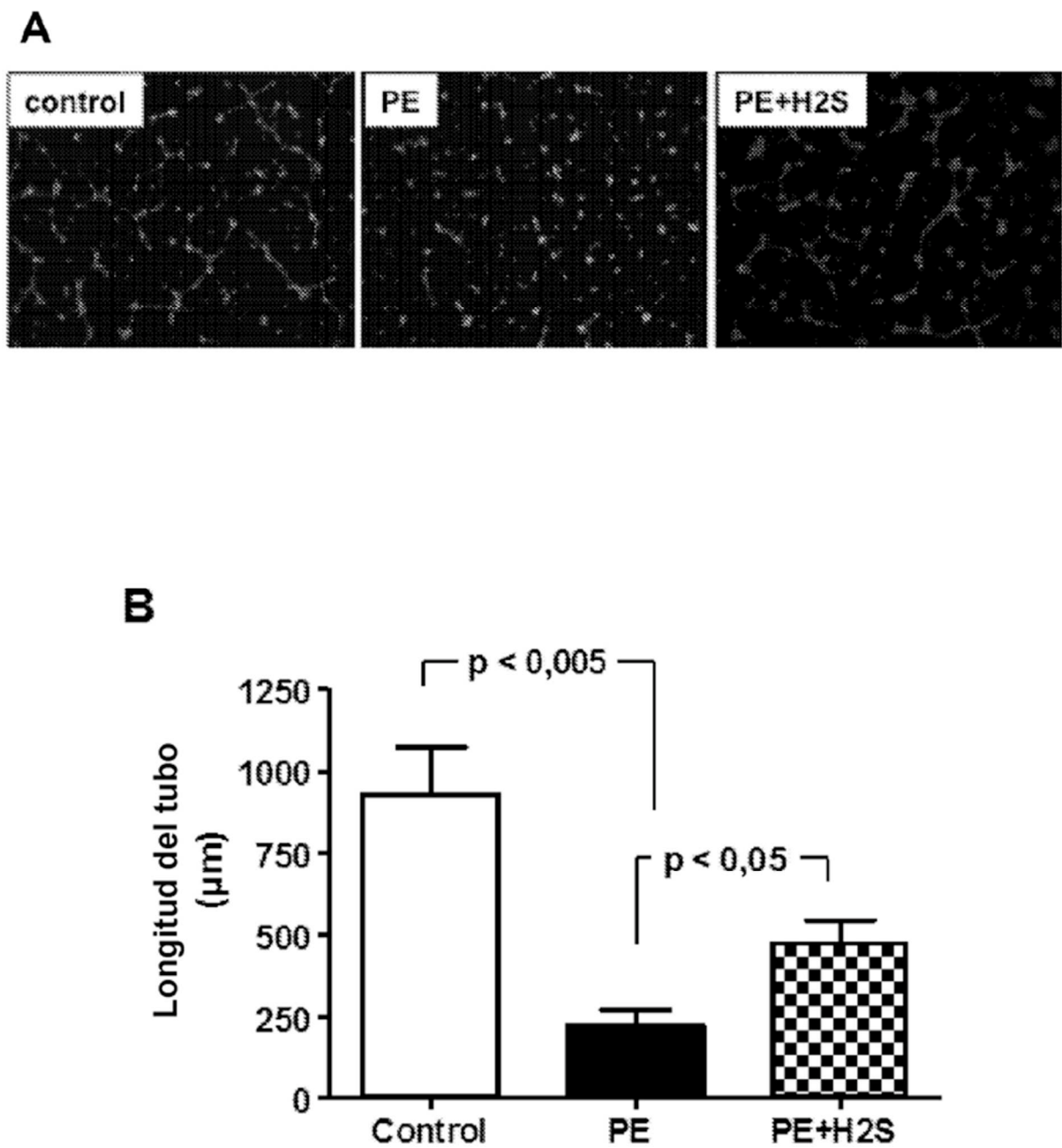


Figura 5

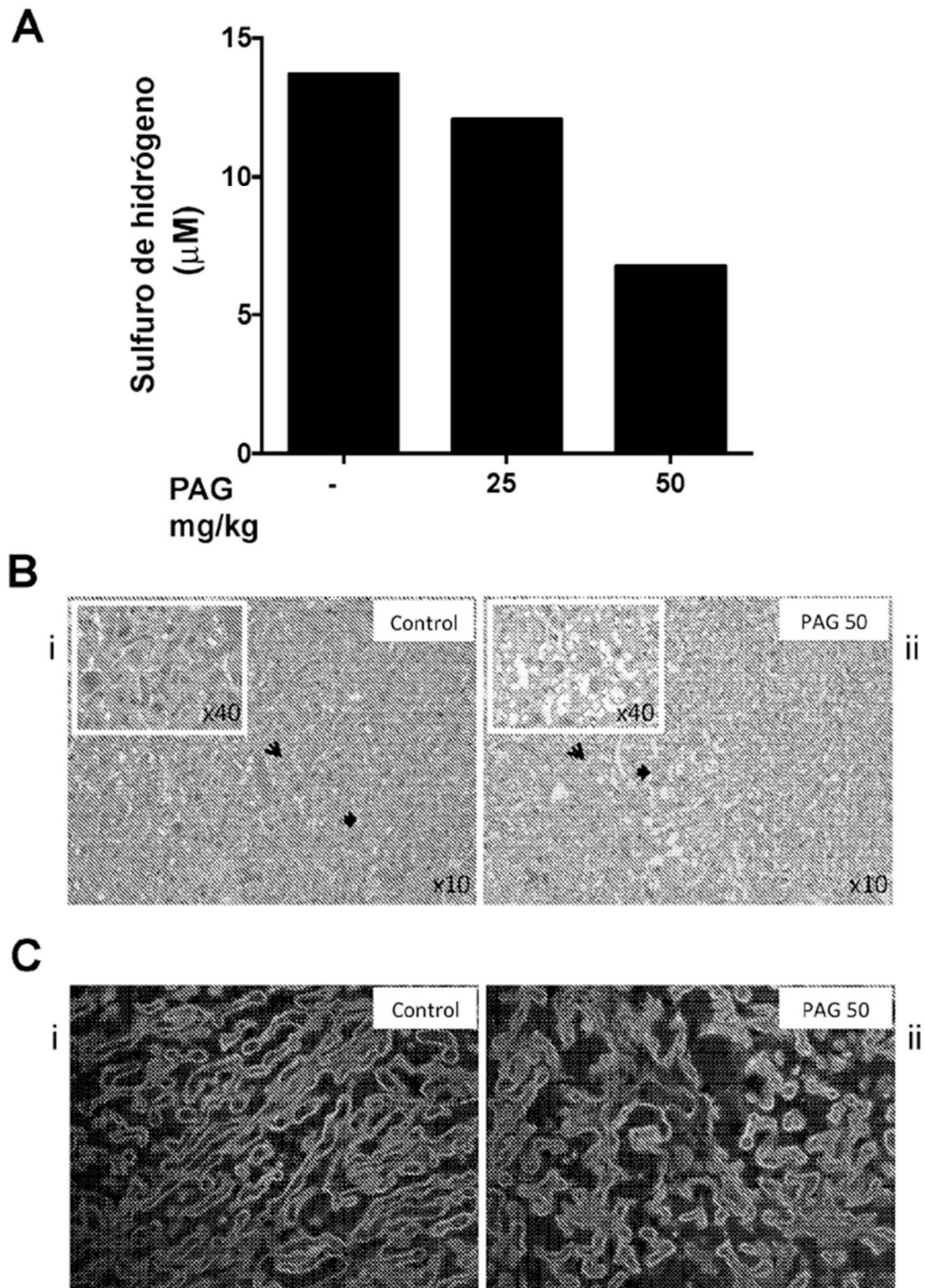


Figura 6

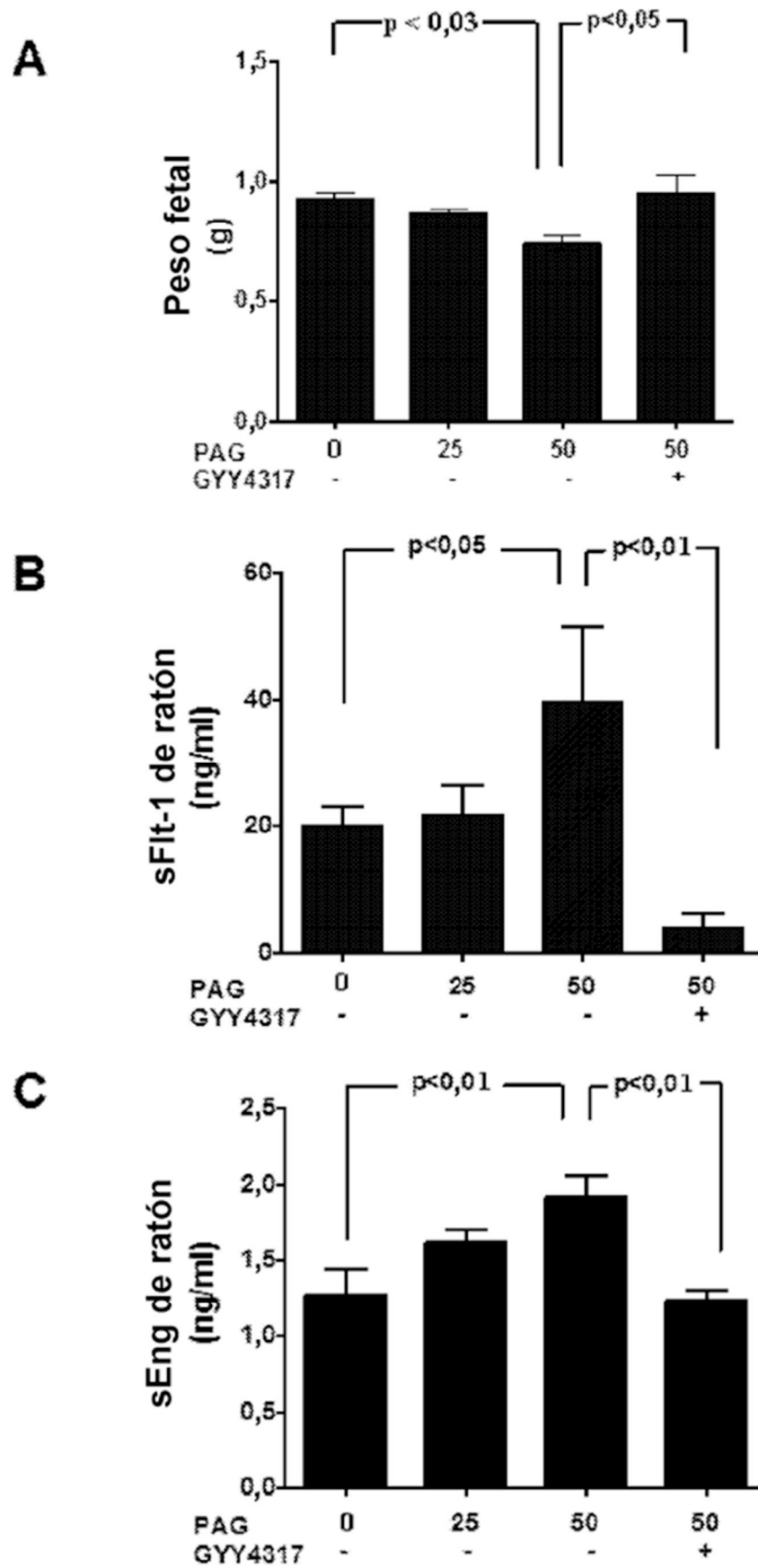
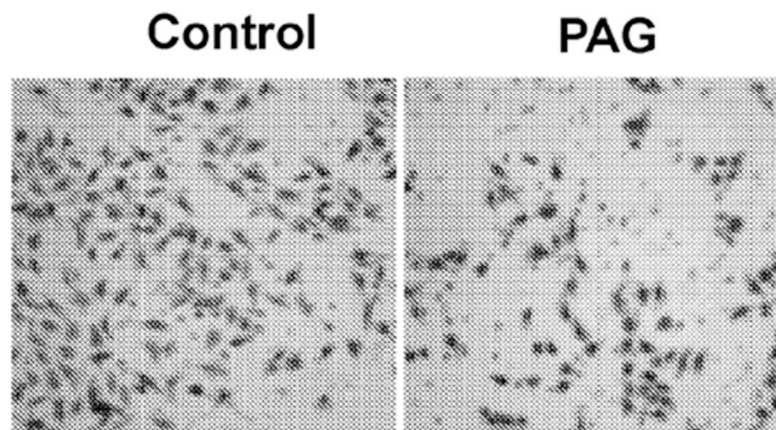


Figura 7

A



B

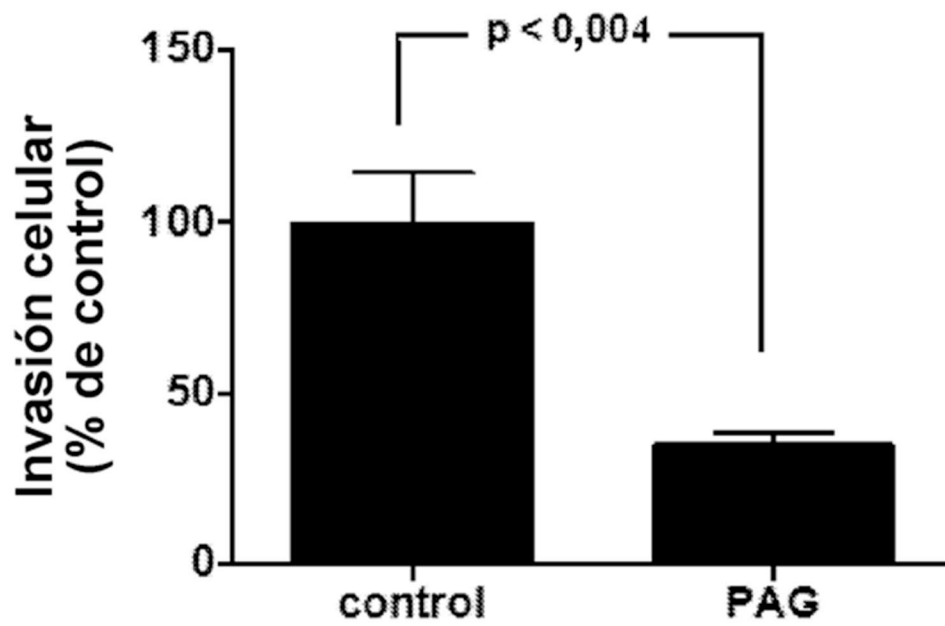
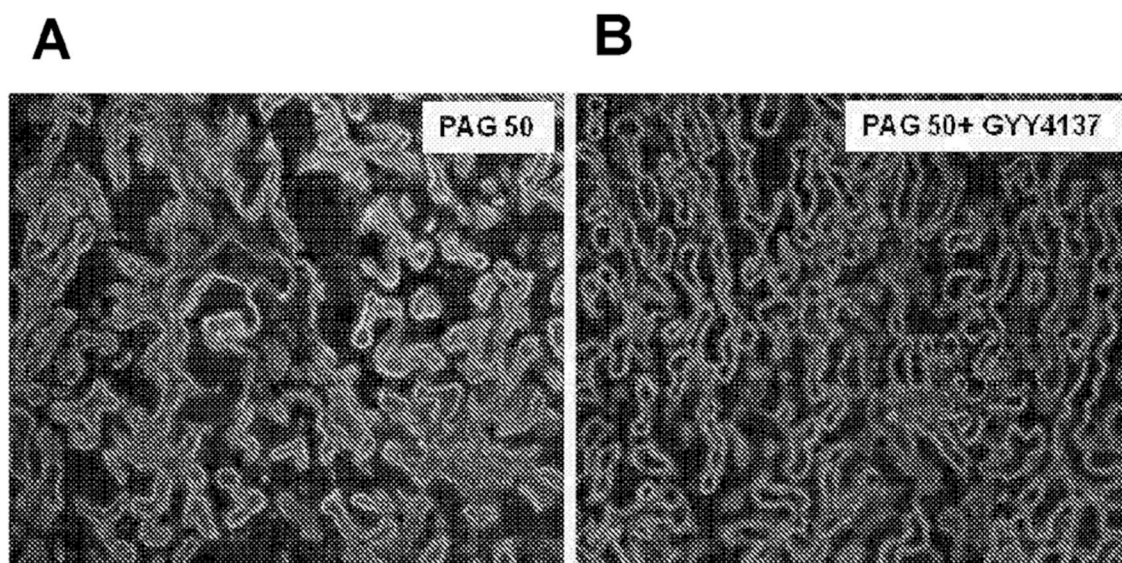


Figura 8



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 8361514 B

Literatura no patente citada en la descripción

- **YU.** *Placenta*, 2012, vol. 33 (6), 487-494
- **CINDROVA-DAVIES.** *AM.J.Pathol.*, 2013, vol. 182 (4), 1448-1458
- C.A. Database Acc. 2006:688906
- **BANNENBERG G.L.; VIERA HLA.** *Expert Opin.Ther. Patents*, 2009, vol. 19 (5), 663-682
- **PREDMORE B.L. et al.** *Antioxidants and Redox Signalling*, 2012, vol. 17 (1), 119-140
- **LEE M. J.** *Biol Chem*, 2010, vol. 285, 17318-17328
- **ACS6-SPARATORE A et al.** *Expert Rev. Clin. Pharmacol*, 2011, vol. 4, 109-121
- **ZHAO W; ZHANG J; LU Y; WANG R.** The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *Embo J.*, 2001, vol. 20 (21), 6008-6016
- **PAPAPETROPOULOS A; PYRIOCHOU A; ALTAANY Z; YANG G; MARAZIOTI A; ZHOU Z; JESCHKE MG; BRANSKI LK; HERNDON DN; WANG R.** Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2009, vol. 106 (51), 21972-21977
- **ZANARDO RC; BRANCALEONE V; DISTRUTTI E; FIORUCCI S; CIRINO G; WALLACE JL.** Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *Faseb J.*, 2006, vol. 20 (12), 2118-2120
- **BLACKSTONE E; ROTH MB.** Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. *Shock*, 2007, vol. 27 (4), 370-372
- **ELROD JW; CALVERT JW; MORRISON J; DOELLER JE; KRAUS DW; TAO L; JIAO X; SCALIA R; KISS L; SZABO C.** Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2007, vol. 104 (39), 15560-15565
- **KABIL O; VITVITSKY V; XIE P; BANERJEE R.** The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H2S production in murine tissues. *Antioxid Redox Signal.*, 2011, vol. 15 (2), 363-372
- **YAN H; DU J; TANG C.** The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2004, vol. 313 (1), 22-27
- **YANFEI W; LIN S; JUNBAO D; CHAOSHU T.** Impact of L-arginine on hydrogen sulfide/cystathionine-gamma-lyase pathway in rats with high blood flow-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006, vol. 345 (2), 851-857
- **YANG G; WU L; JIANG B; YANG W; QI J; CAO K; MENG Q; MUSTAFA AK; MU W; ZHANG S.** H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*, 2008, vol. 322 (5901), 587-590
- **LI L; MOORE PK.** Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?. *Trends Pharmacol Sci.*, 2008, vol. 29 (2), 84-90
- **BANERJEE R.** Hydrogen sulfide: redox metabolism and signaling. *Antioxid Redox Signal.*, 2011, vol. 15 (2), 339-341
- **HOGBERG U.** The World Health Report 2005: "make every mother and child count" - including Africans. *Scand J Public Health.*, 2005, vol. 33 (6), 409-411
- **HOMER CS; BROWN MA; MANGOS G; DAVIS GK.** Non-proteinuric pre-eclampsia: a novel risk indicator in women with gestational hypertension. *J Hypertens.*, 2008, vol. 26 (2), 295-302
- **BROSENS IA; ROBERTSON WB; DIXON HG.** The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu.*, 1972, vol. 1, 177-191
- **EGBOR M; ANSARI T; MORRIS N; GREEN CJ; SIBBONS PD.** Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction. *Bjog.*, 2006, vol. 113 (5), 580-589
- **AHMED A; CUDMORE MJ.** Can the biology of VEGF and haem oxygenases help solve pre-eclampsia?. *Biochem Soc Trans.*, 2009, vol. 37, 1237-1242
- **MAYNARD SE; KARUMANCHI SA.** Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol.*, 2011, vol.31 (1), 33-46

- **LEVINE RJ; MAYNARD SE; QIAN C; LIM KH; ENGLAND LJ; YU KF; SCHISTERMAN EF; THADHANI R; SACHS BP; EPSTEIN FH.** Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.*, 2004, vol. 350 (7), 672-683
- **LEVINE RJ; LAM C; QIAN C; YU KF; MAYNARD SE; SACHS BP; SIBAI BM; EPSTEIN FH; ROMERO R; THADHANI R.** Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.*, 2006, vol. 355 (10), 992-1005
- **TORRY DS; WANG HS; WANG TH; CAUDLE MR; TORRY RJ.** Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol.*, 1998, vol. 179 (6), 1539-1544
- **TAYLOR RN; GRIMWOOD J; TAYLOR RS; MCMASTER MT; FISHER SJ; NORTH RA.** Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.*, 2003, vol. 188 (1), 177-182
- **LEVINE RJ; THADHANI R; QIAN C; LAM C; LIM KH; YU KF; BLINK AL; SACHS BP; EPSTEIN FH; SIBAI BM.** Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. *Jama*, 2005, vol. 293 (1), 77-85
- **BUHIMSCHI CS; NORWITZ ER; FUNAI E; RICHMAN S; GULLER S; LOCKWOOD CJ; BUHIMSCHI IA.** Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*, 2005, vol. 192 (3), 734-741
- **SAVVIDOU MD; NOORI M; ANDERSON JM; HINGORANI AD; NICOLAIDES KH.** Maternal endothelial function and serum concentrations of placental growth factor and soluble endoglin in women with abnormal placentation. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 2008, vol. 32 (7), 871-876
- **FOIDART JM; MUNAUT C; CHANTRAINE F; AKOLEKAR R; NICOLAIDES KH.** Maternal plasma soluble endoglin at 11-13 weeks' gestation in pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 2010, vol. 35 (6), 680-687
- **NOORI M; DONALD AE; ANGELAKOPOULOU A; HINGORANI AD; WILLIAMS DJ.** Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. *Circulation*, 2010, vol. 122 (5), 478-487
- **PATEL P; VATISH M; HEPTINSTALL J; WANG R; CARSON RJ.** The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol.*, 2009, vol. 7, 10
- **YOU XJ; XU C; LU JQ; ZHU XY; GAO L; CUI XR; LI Y; GU H; NI X.** Expression of cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase in human pregnant myometrium and their roles in the control of uterine contractility. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6 (8), e23788
- **AHMAD S; AHMED A.** Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res.*, 2004, vol. 95 (9), 884-891
- **AHMAD S; HEWETT PW; WANG P; AL-ANI B; CUDMORE M; FUJISAWA T; HAIGH JJ; LE NOBLE F; WANG L; MUKHOPADHYAY D.** Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res.*, 2006, vol. 99 (7), 715-722
- **CUDMORE M; AHMAD S; AL-ANI B; FUJISAWA T; COXALL H; CHUDASAMA K; DEVEY LR; WIGMORE SJ; ABBAS A; HEWETT PW.** Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation*, 2007, vol. 115 (13), 1789-1797
- **ZHUO Y; CHEN PF; ZHANG AZ; ZHONG H; CHEN CQ; ZHU YZ.** Cardioprotective effect of hydrogen sulfide in ischemic reperfusion experimental rats and its influence on expression of surviving gene. *Biol Pharm Bull.*, 2009, vol. 32 (8), 1406-1410
- **REYNOLDS LP; REDMER DA.** Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci.*, 1995, vol. 73 (6), 1839-1851
- **MAYNARD SE; MIN JY; MERCHAN J; LIM KH; LI J; MONDAL S; LIBERMANN TA; MORGAN JP; SELLKE FW; STILLMAN IE.** Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.*, 2003, vol. 111 (5), 649-658
- **SAXENA AR; KARUMANCHI SA; BROWN NJ; ROYLE CM; MCEL RATH TF; SEELY EW.** Increased sensitivity to angiotensin II is present postpartum in women with a history of hypertensive pregnancy. *Hypertension*, 2010, vol. 55 (5), 1239-1245
- **WOLF M ; HUBEL CA; LAM C; SAMPSON M; ECKER JL; NESS RB; RAJAKUMAR A; DAFTARY A; SHAKIR AS; SEELY EW.** Preeclampsia and future cardiovascular disease: potential role of altered angiogenesis and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2004, vol. 89 (12), 6239-6243
- **ADAMSON SL; LU Y; WHITELEY KJ; HOLMYARD D; HEMBERGER M; PFARRER C; CROSS JC.** Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.*, 2002, vol. 250 (2), 358-373

- **WATSON ED; CROSS JC.** Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)*, 2005, vol. 20, 180-193
- **OHLSSON R; FALCK P; HELLSTROM M; LINDAHL P; BOSTROM H; FRANKLIN G; AHRLUND-RICHTER L; POLLARD J; SORIANO P; BETSHOLTZ C.** PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev Biol.*, 1999, vol. 212 (1), 124-136
- **TANG G; WU L; WANG R.** The effect of hydroxylamine on KATP channels in vascular smooth muscle and underlying mechanisms. *Mol Pharmacol.*, 2005, vol. 67 (5), 1723-1731
- **HOLWERDA KM; BOS EM; RAJAKUMAR A; RIS-STALPERS C; VAN PAMPUS MG; TIMMER A; ERWICH JJ; FAAS MM; VAN GOOR H; LELY AT.** Hydrogen sulfide producing enzymes in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*, 2012, vol. 33 (6), 518-521
- **RAMMA W; AHMED A.** Is inflammation the cause of pre-eclampsia?. *Biochem Soc Trans.*, 2011, vol.39 (6), 1619-1627
- **RAMMA W; BUHIMSCHI IA; ZHAO G; DULAY AT; NAYERI UA; BUHIMSCHI CS; AHMED A.** The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia. *Angiogenesis*, 2012, vol. 15 (3), 333-340
- **THADHANI R; MUTTER WP; WOLF M; LEVINE RJ; TAYLOR RN; SUKHATME VP; ECKER J; KARUMANCHI SA.** First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2004, vol. 89 (2), 770-775
- **CHEN CP.** Placental abnormalities and preeclampsia in trisomy 13 pregnancies. *Taiwan J Obstet Gynecol.*, 2009, vol. 48 (1), 3-8
- **CROSS JC; SIMMONS DG; WATSON ED.** Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann N Y Acad Sci.*, 2003, vol. 995, 84-93
- **DAMSKY CH; FITZGERALD ML; FISHER SJ.** Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest.*, 1992, vol. 89 (1), 210-222