(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 747 995**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/422 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2015** **PCT/RU2015/000413**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016** **WO16003327**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2015** **E 15815425 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 3165223**

(54) Título: **Uso de 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para tratar trastornos sexuales**

(30) Prioridad:

04.07.2014 RU 2014127279

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2020

(73) Titular/es:

LIMITED LIABILITY COMPANY "KONSORTSIUM-PIK" (100.0%)
Oruzheiniy per. 25, Str. 1
Moscow 125047, RU

(72) Inventor/es:

KHMELSHCHIKOV, YURI VLADIMIROVICH y NOSKOV, DMITRIY SERGEEVICH

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 747 995 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

Uso de 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para tratar trastornos sexuales

La invención pertenece a la industria química y farmacéutica, incluyendo la creación de un nuevo agente medicinal destinado a tratar trastornos sexuales, y se puede utilizar en la bioquímica, la fisiología y medicina.

Antecedentes de la invención

La función independiente de endotelio vascular en la regulación del tono vascular se afirmó en primer lugar en el artículo Furchgott y Zawadzki publicado en Nature, 1980 [1]. Los autores revelaron la capacidad de cambios de tono muscular independientes en la arteria aislada en respuesta a la acetilcolina, sin la participación de mecanismos centrales (neuro-humorales).

Otros estudios confirman que el endotelio no es una barrera pasiva entre la sangre y los tejidos, sino una estructura activa. Su disfunción es inherente a la patogénesis de casi cualquier trastorno cardiovascular, incluida la aterosclerosis, hipertensión, enfermedad cardiaca coronaria (CHD), insuficiencia cardíaca crónica (CHF). Además, participa en las reacciones inflamatorias, procesos autoinmunitarios, diabetes, trombosis, sepsis, crecimiento maligno, etc. [1].

Normalmente, la reacción endotelial consiste en el aumento de la producción de sustancias que conducen a la relajación de los músculos lisos de la pared vascular, principalmente de óxido nítrico (NO) y sus derivados (factores de relajación endotelial), junto con la prostaciclina y factor de hiperpolarización dependiente del endotelio. Cabe señalar que los efectos de NO no están limitados por la dilatación local, sino que incluyen un efecto antiproliferativo sobre los músculos lisos vasculares. Además, el NO ejerce varios efectos sistémicos importantes dentro del lumen vascular, incluidos los que protegen las paredes vasculares y evitan la formación de coágulos: bloqueo de la agregación plaquetaria, de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), de expresión de moléculas de adhesión, de adhesión de monocitos y plaquetas a la pared vascular, de la producción de endotelina. En ciertos casos, el endotelio se convierte en una causa de constricción vascular, tanto debido a la producción reducida de NO como al aumento de síntesis de vasoconstrictores (factores de constricción endotelial): aniones sobreoxidados, prostenoides vasoconstrictores como el tromboxano A2 y endotelina-1 (ET-1) La exposición prolongada a varios factores dañinos (hipoxia, intoxicación, inflamación, sobrecarga hemodinámica) da como resultado el agotamiento gradual y la inversión de la capacidad de dilatación compensatoria del endotelio, y el predominio de la vasoconstricción y la proliferación endotelial en respuesta a los estímulos habituales. La activación crónica excesiva del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) es el factor más importante de la disfunción endotelial. [1]

La molécula de óxido nítrico (NO) es un agente vasodilatador principal. Normalmente, los niveles bajos de NO se liberan continuamente del endotelio y favorecen la dilatación de los vasos. La búsqueda de métodos eficaces de corrección de las funciones endoteliales deterioradas en pacientes con CHD es uno de los objetivos importantes de la cardiología moderna. En este contexto, tanto la medicina experimental como la práctica expresan interés en los estudios de un fenómeno fisiológico llamado “preacondicionamiento”. El preacondicionamiento como resultado de episodios cortos de isquemia-reperfusión conduce a una mejor resistencia del tejido a la isquemia. Hay varios métodos de preacondicionamiento disponibles. Clínicamente, el preacondicionamiento farmacológico es preferible debido a la simplicidad tecnológica y la ausencia de peligro isquémico potencial para los tejidos afectados. Entre las sustancias farmacológicas, Nicorandil es uno de los agentes humorales más prometedores que participan en la implementación del fenómeno de preacondicionamiento. Nicorandil posee propiedades favorables, como la ausencia de efectos adversos. Además, es uno de los donantes de óxido nítrico [2].

Staroseltseva OA et al. demostró una protección endotelial y cardíaca significativa debido al preacondicionamiento isquémico en el modelo de deficiencia de NO inducida por L-NAME. Esta protección se manifiesta en la reducción de la relación de disfunción endotelial (EDR) a 2.5±0.3AU, la prevención de la depresión del nivel de NO (4.8±0.29 mcmol/L) y el aumento de la PCR (0.74±0.05 mg/dL), la prevención de la reactividad adrenérgica excesiva, y en el aumento de la contractilidad cardíaca hasta el 87.1 ± 6.4% durante las pruebas de resistencia; El preacondicionamiento de Nicorandil (4 mg/kg) resultó en una protección endotelial y cardíaca significativa en el modelo de deficiencia de NO inducida por L-NAME, lo que resultó en una reducción de EDR a 1.76±0.18AU, prevención completa de la reducción del nivel de NO (6.2±0.25 mcmol/L) y del aumento de la PCR (0.6±0.1 mg/dL), prevención de reactividad adrenérgica excesiva y aumento de la contractilidad del miocardio hasta 77.2±8.3% durante las pruebas de resistencia. Los estudios patomorfológicos revelaron una disminución en la aparición de glomerulopatía membranosa, hipertrofia de miocitos cardíacos y necrosis de cardiomiocitos, cambios destructivos del endotelio vascular e hipertrofia de las paredes vasculares en los riñones y en el miocardio. La glibenclamida (4 mg/kg) proporcionó el bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP y los efectos protectores neutralizados del preacondicionamiento isquémico distante en el endotelio y el corazón, así como del preacondicionamiento de helio (gas inerte), del preacondicionamiento farmacológico con el uso de Nicorandil en el modelo de deficiencia de NO inducida por L-NAME. Esto dio como resultado un aumento de EDR hasta los valores cercanos a los del grupo L-NAME, en la reducción de NO y aumento de la proteína C reactiva en cualquier grupo [2].

Bloqueo de NO-sintasa debido a 7 días de duración de administración de L-NAME se sabe que induce la hipertensión arterial (presión arterial media sistólica 191.3±7.1, significa PA diastólica 146.0±4.2 mm Hg) y aumento de 5 veces de relación de disfunción endotelial. Se demostró el efecto del uso concomitante de donador de NO, L-arginina e inhibidores de la arginasa L-norvalina y nor-NONA, lo que condujo a la disfunción endotelial inducida por L-NAME neutralizado, que resultó en EDR y reducción de la presión arterial. La combinación más eficaz incluyó L-arginina 70 mg/kg y L-norvalina 10 mg/kg en forma de acción prolongada con un período de liberación de 12 horas.

Uno de los principales mecanismos fisiológicos de la relajación del músculo liso consiste en el aumento del nivel de cGMP (nucleótido cíclico). En la actualidad, la vía de relajación vascular dependiente de NO-cGMP está bien estudiada. Esta vía está mediada por la activación de guanilato ciclasa soluble (sGC). Aquí, se usan los fármacos que pueden producir NO. Esto conduce a un rápido aumento del nivel de cGMP en los músculos lisos vasculares por un corto tiempo. Sin embargo, el uso repetido de donadores de NO conduce a la desensibilización de la vía dependiente de NO-cGMP y a la tolerancia que resulta en su ineficacia en casos de administración a largo plazo. Por lo tanto, la búsqueda de mecanismos y fármacos capaces de activar sGC durante mucho tiempo es uno de los conceptos prometedores en la fisiología y farmacología del sistema cardiovascular. En 1966, se reveló el efecto hipotensor de los derivados de oxatriazol en perros anestesiados. No se investigó el mecanismo del efecto hipotensor del oxatriazolio-5-olato.

Uno de los derivados oxatriazolio-5-olato, 3-(3-[1,2,4]triazolo)-oxatriazolio-5-olato (AS-6), proporciona un efecto hipotensor prolongado en ratas SHR y Wistar conscientes. En el presente estudio, se examinó el nivel de activación de sGC purificado obtenido de los pulmones del conejo, con el fin de evaluar el mecanismo bioquímico de los efectos de AS-6. In vitro, AS-6 (100 mcmol/L) activa sGC hasta 30 veces en comparación con la actividad basal. La activación de sGC aumenta después del aumento del nivel de AS-6, por lo tanto, este efecto depende de la dosis. Además, AS-6 proporciona la activación de la síntesis de cGMP en la aorta de ratas Wistar hasta un nivel de 13 veces en comparación con los valores iniciales. Por lo tanto, AS-6 estimuló la síntesis de cGMP inducida tanto por sGC purificada como por sGC en el tejido aórtico. La activación de sGC depende de la dosis [3].

Recientemente, se atribuye una importancia significativa a la disfunción endotelial como una posible causa de la disfunción eréctil [4, 5]. Este fenómeno conduce a la pérdida de las propiedades reguladoras del endotelio, principalmente de la capacidad de cambiar el tono del músculo liso en el límite del endotelio debido a la disminución local de la producción de NO. El papel clave del aumento de la descarga de NO en el inicio, desarrollo y mantenimiento de la erección está bien establecido [6].

Por otra parte, los agentes farmacéuticos utilizados para la mejora de la potencia sexual, son conocidos [7].

Sin embargo, tales agentes farmacéuticos no se pueden utilizar únicamente para el tratamiento de trastornos sexuales, y se aplican con fines profilácticos.

Un agente farmacéutico que mejora la potencia sexual está disponible [8].

Este agente farmacéutico es más bien utiliza según sea necesario, y su administración no es para propósitos de tratamiento.

El análogo más cercano representa un agente farmacéutico usa para tratar los trastornos sexuales [9].

Sin embargo, este agente no proporciona la producción de NO local eficaz y cualquier efecto hipotensor, por lo tanto, no puede ser eficaz en el tratamiento de los trastornos sexuales.

Resumen de la invención

En el contexto de los hechos anteriores, el propósito de la presente invención consiste en la creación de un nuevo agente farmacéutico que proporciona un tratamiento eficaz de los trastornos sexuales.

El resultado técnico de la presente invención consiste en la expansión de la esfera de uso de 3-(3-[1,2,4]triazolo)-oxatriazolio- 5-olato.

Otro resultado técnico de esta invención consiste en la creación de una composición farmacéutica que proporciona un tratamiento eficaz de los trastornos sexuales.

Este resultado técnico se puede obtener debido a la utilización de 3-(3-[1,2,4]triazolo)-oxatriazolio-5-olato como un tratamiento de los trastornos sexuales como parte de la composición farmacéutica destinada para el tratamiento de trastornos sexuales.

La forma de realización de esta invención trata con 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para su uso en el tratamiento de trastornos sexuales y la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de trastornos sexuales que contiene 3- (3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - Diagrama de dependencia de absorción de endotelina-1 (ET-1) frente a la concentración de analito.

Figura 2 - Diagrama de dependencia de la absorción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) frente a la concentración de analito en ratas.

Figura 3 - Diagrama de dependencia de la absorción de óxido nítrico libre (NOx) frente a la concentración de analito.

Realizaciones de invención

En consecuencia, uno de los modos de implementación de la presente invención consiste en al menos un 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de trastornos sexuales.

Otra realización de esta invención se refiere a 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para su uso en el tratamiento de trastornos sexuales que se caracterizan por la selección de los trastornos sexuales de las siguientes series: ausencia o pérdida del deseo sexual, reacción genital insuficiente, disfunción orgásmica.

Otra realización de esta invención se refiere a la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de trastornos sexuales que contiene al menos 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato como un ingrediente activo en la dosis necesaria para lograr el efecto terapéutico

Otra realización de esta invención se refiere a la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de trastornos sexuales que contiene al menos 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato como un ingrediente activo en la dosis necesaria para lograr el efecto terapéutico, caracterizándose por la selección de trastornos sexuales de las siguientes series: ausencia o pérdida del deseo sexual, reacción genital insuficiente, disfunción orgásmica.

Otra realización de esta invención consiste en 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para su uso en el tratamiento de trastornos sexuales como un ingrediente activo de la composición farmacéutica de la dosis 0,005 g a 0,116 g.

Resumen de la invención

La síntesis de composiciones farmacéuticas que contienen al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable derivado oxatriazolio-5-olato, se basa en el estado de la técnica y no necesita una descripción detallada. Estas composiciones pueden obtenerse con el uso de tecnologías conocidas (como la fabricación de tabletas) y pueden estar presentes en cualquier forma farmacéutica del estado de la técnica (es decir, tabletas, formas líquidas, cápsulas).

Con el fin de controlar la exactitud y aplicabilidad de la presente invención técnica, el estudio de investigación se puso en marcha con el objetivo de evaluar la actividad farmacológica específica de los compuestos. Otros resultados se presentarán con el ejemplo de 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato (Azasidnon, AS-6).

Con base en el artículo 11 de la Ley Federal “Sobre la circulación farmacéutica” (#61-FZ), “La evaluación preclínica de los agentes medicinales se realiza en base a los métodos científicos de evaluación de los efectos de la obtención de las evidencias de la seguridad, calidad y eficacia de los fármacos”.

Las abreviaturas utilizadas en el texto son las siguientes:

ET-1 - endotelina-1 de rata

L-NAME – clorhidrato éster metílico de N-omega-nitro-L-arginina

NO - óxido nítrico

NO - óxido nítrico, libre

VEGF libre - vascular factor de crecimiento endotelial

AH - hipertensión arterial

IG - modo de administración intragástrica

DBP - presión arterial diastólica

MLP - período de latencia creciente

RAAS - Sistema de Aldosterona Angiotensina Renina

SBP - presión arterial sistólica

HR - frecuencia cardíaca

ED - disfunción endotelial.

Materiales y métodos del estudio de investigación

Los materiales y métodos utilizados para evaluar la actividad específica de AS-6 en el modelo experimental de la hipertensión arterial con la disfunción endotelial

En el modelo de hipertensión arterial con disfunción endotelial, se administró por vía intraperitoneal, 25 mg/kg, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) bloqueador NOS endotelial, diariamente, durante 7 días [2, 3]. El bloqueador se administró en cloruro de sodio al 3% en la dosis de 1 ml/100 g de peso corporal. Esta combinación de inhibidor de NO-sintasa con solución hipertónica proporciona activación de RAAS, descarga de aldosterona, retención de sodio y agua, deterioro funcional del endotelio vascular.

Modelo experimental se basó en el uso de clorhidrato de éster metílico de N-ω-nitro-L-arginina, ($C_7H_{15}N5O_4xHCl$, M.w. 269.7 [Sigma-Aldrich, EE.UU.]) y de cloruro de sodio (Reachim, Rusia).

La solución de inhibidor se preparó en el agua purificada, 250 mg por 100 ml de cloruro de sodio al 3%. El pesaje de los reactivos se realizó en la balanza analítica GH-300 (A&D, Japón).

Animales y su manejo, grupos experimentales

La gestión de los animales de laboratorio se organizó de acuerdo con las “Normas sanitarias de organización, equipamiento y gestión de clínicas biológicas experimentales (viveros)” (RF, aprobada el 06 abril 1973), “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de laboratorio” (Estados Unidos, National Academy Press, Washington, DC, 1996); “Directrices sobre el manejo y uso de animales de laboratorio” (FELASA, 2010), “Animales de laboratorio” (reglamento y directriz, Academia Rusa de Ciencias Médicas, Moscú, 2003).

Los experimentos se realizaron con el uso de 40 ratas Wistar macho blancos con un peso corporal inicial de 220-240 g y 20 ratas hembra vírgenes blancas 180-200 g. Los animales fueron comprados en la granja Rappolovo (Academia Rusa de Ciencias Médicas, San Petersburgo). Además del forraje mezclado, las ratas recibieron pan.

La duración del período de adaptación (aclimatación) fue de 14 días para cada animal. Durante el período de aislamiento, los animales fueron examinados diariamente (comportamiento y estado general), dos veces al día, los animales fueron evaluados en las jaulas (morbilidad y mortalidad). Antes del experimento, los animales que cumplían con los criterios de elegibilidad fueron asignados aleatoriamente a grupos de estudio. Los animales no elegibles fueron excluidos del estudio durante el período de aislamiento.

Se colocaron jaulas de animales en salas separadas. El control del medio ambiente se realizó diariamente durante el estudio. Este control incluía control de temperatura y humedad. El período de luz incluyó 12 horas de noche más 12 horas de día (luz artificial de lámparas fluorescentes). La temperatura del aire se mantuvo al nivel de 20-22°C, la humedad relativa al nivel del 50-70%. El régimen de intercambio de aire proporcionó aproximadamente 15 volúmenes de sala por hora, el nivel de CO_2 no más de 0.15% v/v, el nivel de amonio no más de 0.001 mg/L.

Durante el estudio, cada animal se examinó diariamente. El examen incluyó la evaluación del comportamiento general y del estado general. Cada animal fue etiquetado con el uso de ácido pícrico en el pelaje (ratas). Los datos se registraron en los registros de laboratorio.

Se utilizó la sustancia AS-6 (lote 080909) que contenía el 101,0% del ingrediente activo, de acuerdo con el Protocolo de Análisis No. 80-Pr, fechado el 25 de septiembre de 2009 (Oficina de Tecnología y Construcción Especial de Empresa Unitaria del Estado Federal “Tekhnolog”). La sustancia se utilizó para la preparación de soluciones para la administración oral diaria basada en la solución salina fisiológica.

La solución salina fisiológica se utilizó como placebo. Las soluciones se administraron diariamente a través del tubo de alimentación metálico atraumático con aceituna pulida al fuego con el uso de una jeringa dosificadora.

Los animales se dividieron en las ramas de la siguiente manera: 1 - animales intactos; 2 - grupo de control, machos (L-NAME + NaCl; solución salina fisiológica como placebo); 3 - ratas macho que recibieron AS-6 en la dosis de 0,5 mg/kg (dosis 1); 4 - ratas macho que recibieron AS-6 en la dosis de 5 mg/kg (dosis 2); 5 - ratas macho que recibieron AS-6 en la dosis de 10 mg/kg (dosis 3); 6 - ratas hembras vírgenes (solo en la evaluación de la actividad sexual). Cada grupo incluía 8 animales.

Materiales y métodos utilizados para evaluar los parámetros funcionales de las funciones cardiovasculares

La medición de la presión sanguínea en ratas se realizó con el uso del sistema para la medición de la presión arterial no invasivo para animales pequeños dentro del complejo Polígrafo para estudios electrofisiológicos (MP150WSW "BIOPAC Systems, Inc.", EE.UU.).

Procedimiento

Las ratas se colocaron en cajas especiales. HR y BP (SBP y DBP) se registraron varios minutos después de la estabilización de los parámetros medidos. Los parámetros se midieron en las colas con el uso de una sonda piezoeléctrica y el manguito correspondiente, varios minutos después de la colocación del animal en la lámina termostatizada que mantuvo la temperatura en las cámaras dentro de 26-27°C. La prueba cardiovascular funcional se realizó antes (al inicio del estudio) y después de la administración del inhibidor de NOS y al final del tratamiento.

Materiales y métodos utilizados para evaluar los parámetros funcionales del endotelio.

Los parámetros bioquímicos fueron evaluados con el uso de kits preestablecidas (USCN Life Science Inc., USA, Bender MedSystems GmbH, Austria, R&D Systems, EE.UU.). La medición se realizó con el uso del fotómetro multifuncional Synergy-2 (BioTek Instruments, Inc., EE. UU.). Todos los estudios se realizaron de conformidad con la normativa vigente de laboratorio [12-13].

La evaluación del factor de crecimiento endotelial vascular endotelina-1, y los niveles de óxido nítrico y se llevó a cabo en el suero de ratas al final del experimento con el uso de análisis de inmuno-enzimas y análisis espectrofotométrico con anticuerpos específicos de especies (específico de las ratas).

La medición cuantitativa de endotelina-1 (ET-1) se realizó con el uso de ELISA con USCN Life Science Inc. (EE.UU.) kits. Se introdujeron muestras de suero de los animales experimentales (50 mcl) y estándares de concentraciones conocidas en los pocillos de la placa. Luego, se introdujeron 50 mcl de solución de detección (reactivo A). Después de 1 hora de incubación a 37°C, los pocillos se enjuagaron 3 veces y se introdujeron 100 mcL de solución de detección (reactivo B) en cada pocillo. Posteriormente, la placa se incubó nuevamente a 37°C durante 30 minutos. La placa se enjuagó 5 veces con tampón de lavado y se introdujeron 90 ml de sustrato TMB en cada pocillo. Después de 15 minutos de incubación a 37°C, se añadieron 50 mcL de solución de parada. La reacción se leyó a 450 nm. Los diagramas de dependencia de la absorción frente a la concentración de analito y los parámetros de la ecuación se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetro de la ecuación de dependencia de la concentración de endotelina

Nombre de curva	Fórmula de curva	A	B	C	D	R2
ET-1	Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D	3.93	1.03	9.25	0.0328	0.995

La medición cuantitativa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se llevó a cabo con el uso de ELISA con los kits Bender MedSystems GmbH (Austria). Solución de calibración 100 mcL, muestras de suero de los animales experimentales (50 mcL) y diluyente de muestra (50 mcL) se introdujeron en los pocillos de la placa. Luego, se añadieron 50 mcL de conjugado de biotina. Después de 2 horas de incubación a 20°C, los pocillos se enjuagaron 6 veces y se introdujeron 100 mcL de conjugado de estreptavidina/peroxidasa de rábano en cada pocillo. Posteriormente, la placa se incubó nuevamente a 37°C durante 1 hora. La placa se enjuagó 6 veces con tampón de lavado, y se introdujeron 100 mcL de sustrato TMB en cada pocillo. Después de una incubación de 30 minutos a 20°C, se añadieron 100 mcL de solución de parada. La reacción se leyó a 450 y 620 nm. Los diagramas de dependencia de la absorción frente a la concentración de analito y los parámetros de la ecuación se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de la ecuación de dependencia de la concentración de VEGF

Nombre de curva	Fórmula de curva	A	B	C	D	E	R2
VEGF	Y = (A-D)/(1+(X/C)^B)^E + D	0.0209	1.86	1.60E+04	4.27	10.8	1

La medición cuantitativa de óxido nítrico no unido se realizó con el uso de espectrofotometría con kits R&D Systems (EE.UU.). Las proteínas se precipitaron con sulfato de zinc/hidróxido de sodio. Se introdujeron muestras de sobrenadante en suero de los animales experimentales (50 mcL) y estándares de concentraciones conocidas en los pocillos de la placa. Luego, se añadieron 50 mcl de diluyente de muestra, reactivo Griss 1 y reactivo Griss 2. La reacción se leyó a 540 y 690 nm después de una incubación de 10 minutos a 37°C. Los diagramas de dependencia de la absorción frente a la concentración de analito y los parámetros de la ecuación se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de la ecuación de dependencia de la concentración de NO

Nombre de curva	Fórmula de curva	A	B	C	D	R2
NOx	Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D	0.00145	1.23	125	0.904	1

Materiales y métodos utilizados para evaluar la actividad sexual

La prueba de la actividad sexual de los animales se realizó después del final del ciclo de tratamiento. El macho probado se colocó en la cámara de prueba (40x40x30 cm), 5 minutos antes de la presentación de la rata hembra sexualmente receptiva. Se colocó una hembra al lado de cada macho. La evaluación del comportamiento sexual se realizó en el cuarto oscuro con luz roja ciega. Los componentes de la actividad sexual se registraron visualmente durante un período de 30 minutos: latencia de montaje (intervalo ML desde la colocación de la hembra en la jaula hasta el primer montaje de macho) y la tasa de montajes, intromisiones y eyaculaciones [14-15].

Materiales y métodos utilizados en el procesamiento estadístico de datos

Los datos de la observación grabados en los registros de laboratorio, las grabaciones de instrumentos y los datos de medición obtenidos durante la prueba de parámetros fisiológicos y bioquímicos se introdujeron en la matriz primaria de datos en Microsoft Excel 2003. Una tabla de niveles múltiples se compone, con los animales distribuido de acuerdo con los números y las dosis de fármacos correspondientes.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete de software Statistica 8.0. En primer lugar, se verificó la normalidad de distribución de los valores (prueba de Shapiro-Wilk). En base a esta verificación, los resultados no se distribuyeron normalmente. Por lo tanto, se utilizaron pruebas no paramétricas, es decir, la prueba de dispersión de rango de Kruskal-Wallis. El nivel de significación fue de 0.05 para cada análisis.

Resultados del estudio

Efecto de Azasidnon sobre la presión arterial en ratas en el modelo de hipertensión con disfunción endotelial

Los efectos de diferentes dosis de AS-6 en los parámetros cardiovasculares de ratas en el modelo de hipertensión arterial con la disfunción endotelial se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de Azasidnon en los parámetros de presión sanguínea en ratas

Brazos de estudio (n=8)	Parámetros de estudio (M ± m)								
	Valor inicial (Día 0)			Dosis posterior L-Nombre (Día 7)			Después de tratamiento (Día 14)		
	SBP	DBP	HR	SBP	DBP	HR	SBP	DBP	HR
Sin tratamiento	128.4 ± 6.4	96.2 ±5.4	429.1 ± 13.5	126.1 ± 3.4	91.1 ±3.3	400.5 ±11.8	124.6 ±3.7	96.1 ±2.4	390.6 ±6.2
control	128.1 ± 6.4	99.6 ±4.8	397.1 ±15.0	149.0 ± 2.7*/**	111.0 ± 6.2	358.6 ±6.7	145.4 ± 4.4*/**	109.8 ±9.1	389.8 ±13.4
AS-6 0.5 mg/kg	126.2 ± 2.5	98.7 ±2.2	417.6 ± 17.6	145.0 ±3.1	113.8 ± 4.6*/**	351.8 ± 8.7	153.1 ± 7.3*/**	111.9 ± 5.2*/**	420.0 ± 13.7
AS-6 5 mg/kg	123.8 ± 3.4	97.9 ±3.2	428.2 ±22.1	148.6 ± 4.5*/**	117.0 ± 4.4*/**	376.0 ±15.3	141.9 ± 7.1**	111.5 ± 7.9	435.9 ±28.9
AS-6 10 mg/kg	130.5 ± 4.6	98.5 ±4.7	393.6 ±19.1	149.1 ± 3.4*/**	120.1 ± 5.0*/**	357.1 ±14.8	123.4 ± 4.2	102.0 ± 3.2	404.4 ±17.6

Tabla 4 notas:

* $p < 0.05$, diferencia significativa vs. Animales sin tratamiento

** $p < 0.05$, diferencia significativa vs. Valor inicial

El modelo experimental mostró un aumento de la presión arterial sistólica en 20 mm de Hg en la BP diastólica media e incrementada de por 10 mm Hg en la media. AS-6 proporcionó una disminución de la presión arterial dependiente de la dosis, con un pico de 10 mg/kg después de 7 días de tratamiento. No se observaron cambios significativos en la frecuencia cardíaca ni en el brazo control ni en el experimental.

El AS-6 en la dosis de 0.5 mg/kg no afectó los niveles de SBP o DBP en ($p>0.05=1$). Con un aumento de dosis de 10 veces hasta 5 mg/kg, se observó la disminución de la PAD elevada y la PBE elevada sin cambios ($p<0.05$). AS-6 en la dosis de 10 mg/kg proporcionó la normalización de la presión arterial frente a los valores basales y el modelo experimental (diferencia significativa, $p<0.05$).

Efecto de AS-6 sobre los parámetros de disfunción endotelial

Los parámetros que caracterizan el estado endotelial en el modelo de hipertensión arterial con la disfunción endotelial vs. dosis Azasidnon se muestran en la Tabla 5.

Parámetros de estudio	Brazos de estudio (n=8; M ± m)				
	Sin tratamiento	Control	AS-6, 0.5 mg/kg	AS-6, 5.0 mg/kg	AS-6, 10.0 mg/kg
ET-1, pg/mL	1.28 ± 0.22	3.45 ± 0.72*	2.48 ± 0.50	1.75 ± 0.48	0.78 ± 0.29^#
VEGF, pg/mL	123.33 ±31.97	41.66 ± 5.34	46.01 ± 2.42	79.49 ± 19.75	91.9 ± 21.84
NO, mcmol/l	9.61 ± 0.58	5.26 ± 0.51*	8.83 ± 1.06	10.75 ± 0.55^	14.08 ± 1.25*^

Tabla 5 notas:

* $p<0.05$, diferencia significativa vs. Animales sin tratamiento;

^ $p<0.05$, diferencia significativa vs. animales de control;

# $p<0.05$, diferencia significativa vs. AS-6 0.5 mg/kg brazo.

Después de la administración de solución salina hipertónica y el inhibidor de la NO-sintasa, los animales de control demostraron el deterioro del endotelio vascular asociado con la hiperexpresión significativa y relevante de la endotelina-1, vasoconstrictor principal ($p=0.0201$ vs. ratas machos sin tratamiento previo), deprimido producción de NO, factor de relajación endotelial vascular ($p=0.0000$ frente a ratas machos sin tratamiento previo), y una tendencia a la disminución de la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ($p=0.071$ vs. ratas machos sin tratamiento).

El tratamiento con AS-6 dio como resultado cambios favorables significativos de los niveles de endotelina-1 (los cambios más significativos se observaron después del uso de AS-6 en la dosis máxima de 10 mg/kg: $p=0.010$ frente a animales control y $p=0.015$ vs. 1 dosis de AS-6 0.5 mg/kg). Además, se observó la tendencia dependiente de la dosis a la normalización de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (dosis de 10 mg/kg: $p=0.116$ vs. ratas macho de control).

Durante AS-6 administración, (NO) se observó la producción del aumento dependiente de la dosis de óxido nítrico, que supera el nivel de los animales sin tratamiento previo a la dosis de AS-6 10 mg/kg ($p=0.0024$ vs. ratas macho intactas; $p=0.0000$ vs. grupo control; $p=0.058$ vs. 0.5 mg/kg y dosis de 5 mg/kg).

El análisis de los datos obtenidos condujo a una conclusión acerca de AS-6 que es un donante de óxido nítrico indirecto en los animales (in vivo), por lo que esto se asoció con cambios significativos del nivel de nitritos detectables en suero. Además, es un protector endotelial que proporciona la normalización de la producción de endotelina y la tendencia a la normalización del factor de crecimiento endotelial vascular en ratas.

Efectos de Azasidnon sobre la actividad sexual en ratas macho

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 6.

Los machos de control demostraron disminución de medidas de la actividad sexual en comparación con los animales sin tratamiento previo. La mayoría de los animales demostraron 1 episodio de actividad sexual durante el estudio. En estas ratas, el intervalo entre las sesiones de actividad sexual mostró una acumulación no significativa en comparación con los animales sin tratamiento. En el grupo control, solo se observaron intromisiones en el 12% de los hombres. Al mismo tiempo, entre los animales sin tratamiento, se observaron 2 sesiones de actividad sexual; El 25% de ellos demostraron intromisiones.

Tabla 6. Efecto de Azasidnon sobre el comportamiento sexual en ratas macho

Parámetros de estudio	Brazos de estudio (n=8; M±m)				
	Sin tratamiento	Control	Azasidnon 0.5 mg/kg	Azasidnon 5.0 mg/kg	Azasidnon 10.0 mg/kg
Acariciar con el hocico, lamer las hembras	+	+	+	+	+
Tasa de montaje	4.4 ± 1.5	2.4 ± 0.5	6.6 ± 2.8	7.4 ± 3.1	8.6 ± 2.6
Tasa de intromisión	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1	1.6 ± 1.4	1.4 ± 1.1	3.1 ± 1.5
Tasa de eyaculación	-	-	-	-	-
Latencia de montaje, min.	11.3 ± 1.0	8.7 ± 1.2	3.9 ± 0.9*^	4.2 ± 1.9*^	3.2 ± 1.4*^
Intervalo entre sesiones, min.	10.6 ± 1.2	15.0 ± 1.0	8.8 ± 0.9	10.2 ± 2.2	7.5 ± 1.9
Notas * p<0.05, diferencia significativa vs. Animales sin tratamiento; ^ p<0.05, diferencia significativa vs. Animales de control; + - presente; - - ausente.					

Los animales AS-6 (todas las dosis de estudio) demostraron la activación de cualquier parámetro de comportamiento sexual deteriorado: aumento de la tasa de montaje e intromisión, reducción significativa de la latencia de montaje. En estas ratas, el intervalo entre las sesiones de actividad sexual fue similar al de los animales sin tratamiento.

El AS-6 de 0.5 y 5 mg/kg condujo a una mayor tasa de montaje vs. el control en el 40% de los animales, a una mayor tasa de intromisión en el 25% de las ratas y a una disminución de 1.5 veces en el NM.

Se observó el efecto del tratamiento más significativa en relación con los parámetros de estudio en los animales que recibieron la dosis de 10 mg/kg. El número de animales con intromisiones aumentó al 50% (en ratas sin tratamiento) y al 25%, entre los animales que recibieron las dosis de 0.5 y 5 mg/kg. Se demostró una disminución de la latencia de montaje en comparación con los animales sin tratamiento y de control, y se demostró la disminución de la tendencia al intervalo entre sesiones.

El AS-6 no influyó en parámetros de la función sexual como la eyaculación. Dentro de las condiciones metodológicas dadas del estudio de la actividad sexual, esta característica estuvo ausente tanto en los machos de control y experimentales como en las ratas sin tratamiento.

De este modo, AS-6 proporciona disminución de la latencia y aumento no significativo de la tasa de montaje de montaje. El efecto máximo se observó después de la administración de 10 mg/kg de AS-6, lo que contribuyó al aumento

del número de animales con intromisiones (aumento de 4 veces vs. el control), aumento de la tasa de sesiones de actividad sexual, disminución de la latencia de montaje e intervalo intermontaje.

La actividad farmacológica de la sustancia AS-6 se estudió en el modelo de hipertensión arterial con la disfunción endotelial en el Laboratorio Toxicológico de Fármacos. Se demostró la actividad dependiente de la dosis de la sustancia, así como la protección endotelial debido a la normalización de la producción de endotelina-1 y al aumento del nivel de óxido nítrico en el fondo de la inhibición de la NO-sintasa endotelial inducida por L-NAME.

Sin dependencia de la dosis se demostró en la influencia sobre la actividad sexual de los machos. Se registró el aumento de la actividad sexual (disminución de la latencia de montaje, intervalo reducido entre sesiones de cópula, aumento de la tasa de intromisión).

Los datos obtenidos llevaron a una conclusión acerca de la posibilidad de utilizar los derivados de oxatriazolio-5-olato en el tratamiento de trastornos sexuales, tales como: ausencia o pérdida del deseo sexual, la reacción genital insuficiente, disfunción orgásmica.

Referencias

1. Ageev, F.T., Ovchinnikov, A.G., Mareev, V.Yu., Belenkov, Yu.N. Endothelial dysfunction and heart failure: pathogenetic relations and possibility of treatment with the use of angiotensin-converting enzyme // Consilium medicum, volume 3, No. 2, 2001. - media/consilium /01_02/61.shtml :: sunday, 22-apr-2001 15:01:07

2. Startoseltseva, O.A. Use of pharmacological preconditioning with Nicorandil... Author's dissertation abstract...Candidate of Medical Sciences, Kursk. - 2012.

3. Patent RU 2351328 C1 (Limited Liability Company Consortium-PIK), 10 April, 2009.

4. Bivalacyna T.I., Usta M.F., Champion H.C. et al. // I. Androl. - 2003. - V.24, Nº 6. - P. 17-37.

5. Solomon H., Man J.M., Jackson G. // Heart. - 2003.- V. 89. - P. 251-253.

6. Pyrochkin, V.M., Mironchik, E.V. Erectile dysfunction: new symptom for cardiologist? // Meditsinskie novosti. No. 10, 2010. -www.mednovosti.by.

7. International application WO 2013100340 A1 (JEONNAM BIOINDUSTRY FOUNDATION), 04 July, 2013.

8. US application US 2012277200 A1 (EMOTIONAL BRAIN BV), 01 November, 2012.

9. International application WO 2011161655 A1 (HORPHAG RES IP PRE LTD et al.), 29 December, 2011.

10. T.L. Thomas, M. Fedorchuk, B.V. Shetty, E.E. Amderson. «The Synthesis and Activity of Some 3-Substituted 1,2,3,4-Pseudooxatriazol-5-ones and Their Precursors and Related Compounds» // Pennwalt Corporation, Pharmaceutical Division, Department of Organic Chemistry, Rochester, New York, 11.08.1969.

11. Mary Q. Lurid, Lemont B. Kier, Richard A. Glennon, John L. Egle, Jr. «Preliminary Studies of Mesoionic 3-(Substituted-aryl)-ψ-oxatriazoles as Potential Antihypertensive Agents» // Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, and Department of Pharmacology, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23298, 12.04.1982.

12. Medical laboratory technologies. Volume 2. Prof. A.I. Karpishchenko (ed.) - SPb: Intermedica, 2002, -600 pp.

13. Menshikov, V.V. Clinical laboratory analytics: vol.1, vol.2. Special analytical technologies in the clinical laboratory. - M.: Labirinform - RAMLD, 1999. 352 pp., in 2 vol.

14. Bairamov, A.A., Zaichenko, I.N., Bogdanovca, L.A., Sapronov, N.S. Role of cholinergic pathways in the regulation of sexual activity in the acute and chronic stress // Farmakologiya, Vol. 7, 2006. P.18-28.

15. Buresh, Ya., Bureshova, O., Houston, D.P. Methods and main experiments in the studies of brain and behaviour./Batuev, A.S. (ed.). - M.: Vysshaya shkola, 1991. 399 pp.

16. Glanz S. Medico-biological statistics. - M.: Praktika, 1998. 459 pp.

17. Statistics: Statistica 6.0 (Company guideline) StatSoft, 1999. 3756 pp.

REIVINDICACIONES

1. 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para uso en el tratamiento de trastornos sexuales.

2. 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para uso en el tratamiento de trastornos sexuales de acuerdo con la reivindicación 1, donde los trastornos sexuales se seleccionan entre los siguientes: ausencia o pérdida de deseo sexual, reacción genital insuficiente, disfunción orgásmica.

3. 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato para su uso en el tratamiento de trastornos sexuales de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el 3-(3-[1,2,4]-triazolo)-oxatriazolio-5-olato se formula en una formulación farmacéutica en la cantidad de 0.005 g a 0.116 g por dosis.

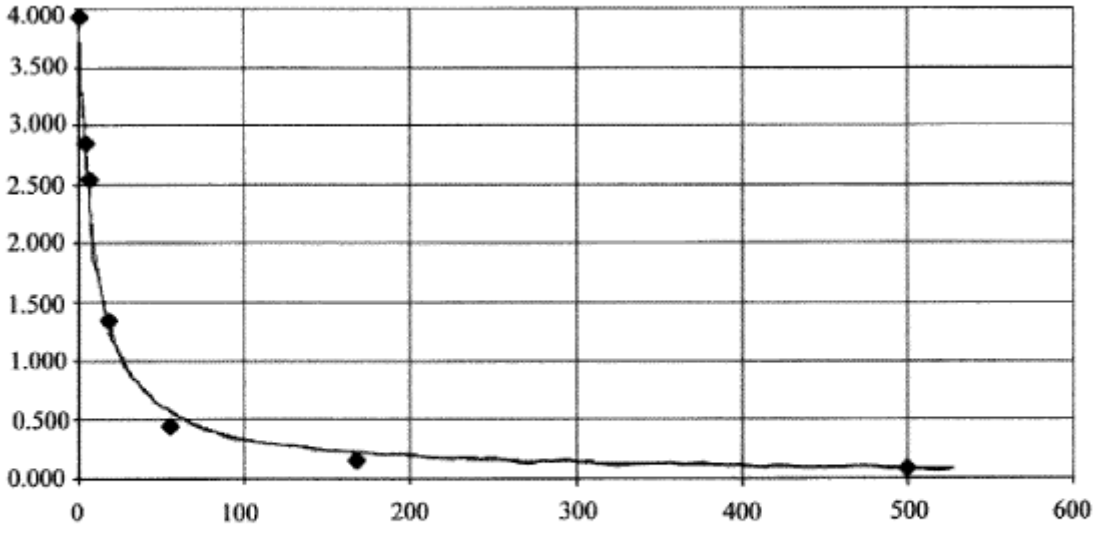
4.000
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
0
100
200
300
400
500
600

Fig 1

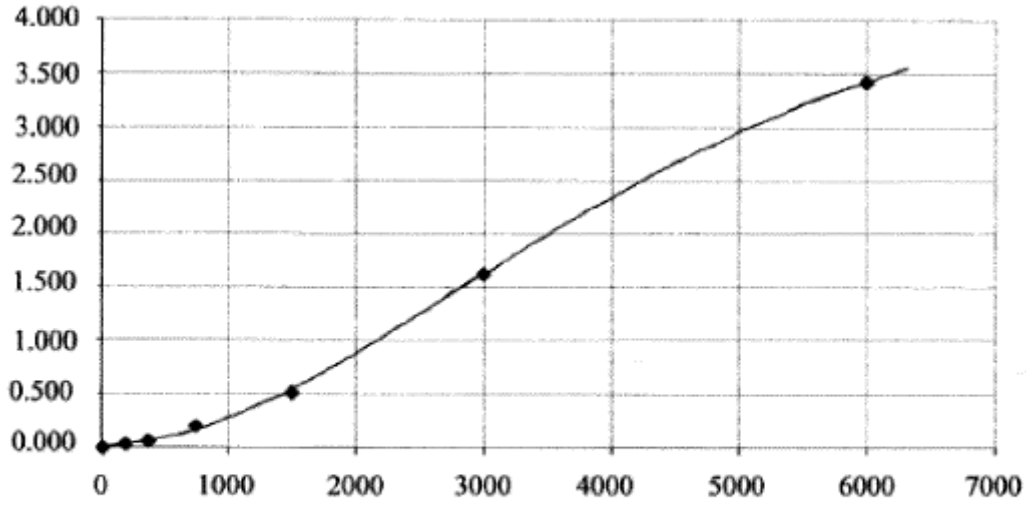
4.000
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

Fig 2

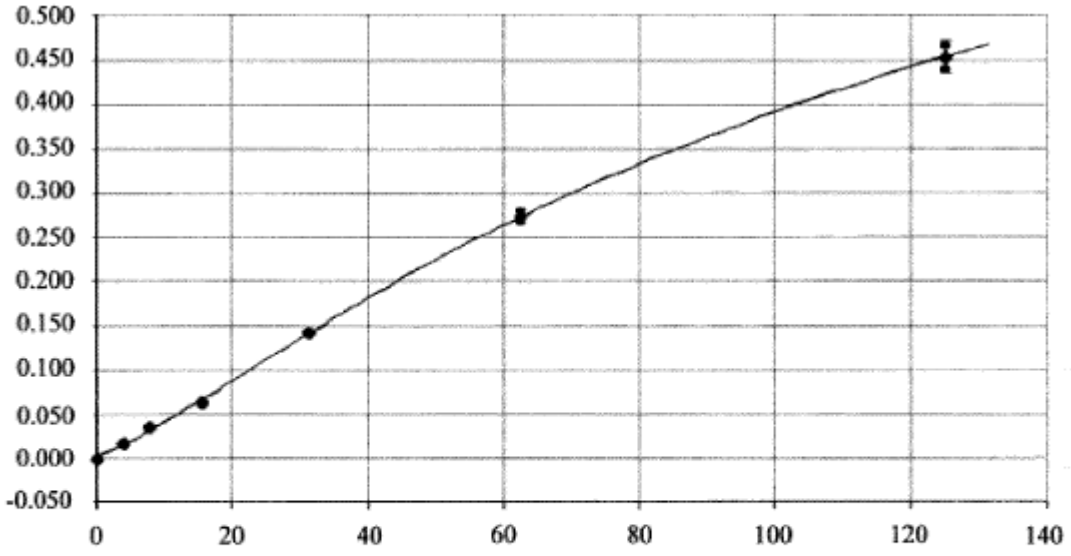
0.500
0.450
0.400
0.350
0.300
0.250
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
-0.050
0
20
40
60
80
100
120
140

Fig 3