



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

Of.

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

**PCT**  
**PATENTE DE INVENCION**

**06-41525**

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO DERIVADOS DE DISULFURO. SULFURO. SULFO-  
XIDO. Y SULFONA DE AZUCARES CICLICOS Y SUS  
USOS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

C07D 493/04  
A61K31/34, A61P9/00, 9/10

71. SOLICITANTE

LACER S.A.

DOMICILIO

Sardenya 350. E-08025 BARCELONA  
ESPAÑA

74. APODERADO

ALVARO CORREA  
T.P. 20.281

22. BOGOTA, D.C.,

3 DE MAYO DE 2006

# PETITORIO

000001

**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Raj: 05-041585 -0000-0000 Fec 2006-05-03 16:33:21  
Dep 2020 NUECREACIONES  
Trz 11 PATENTE/II Ex 379 FASENACIONAL/II  
Act 411 PRESENTACION F la 256

ación

## FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

03-Mayo-2006

①

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒ X

Capítulo II.

②

SOLICITANTE  
(71)

Nombre: LACER S.A.

Dirección: Sardenya 350, E-08025 Barcelona, España

Nacionalidad o Domicilio: España

Lugar de Constitución:

Teléfono:

Fax:

E-Mail:

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE  
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒ X

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79.143.366 de

Usaquén

TP 20.281

④

INVENTOR (ES)  
(72)

Nombre: REPOLLES MOLINER, José; SALAS PEREZ-RASILLA, Eduardo; PUBILL COY, Francisco

Dirección: Sardenya 350 E-08025 Barcelona, España.

Nacionalidad o Domicilio: España

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/010882

Fecha 29-sep-04

Publicación Internacional No. WO 2005/037842 A1

Fecha 28-abr-05

⑥ Título (54)

DERIVADOS DE DISULFURO, SULFURO, SULFÓXIDO Y SULFONA DE AZÚCARES CÍCLICOS Y SUS USOS

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07D 493/04

A61C 31/34, A61P 9/07, 9/10

⑧

Prioridad

SI ☒ X

NO ☐

(33) País de Origen

ES

(32) Fecha

3-oct-03

(31) Número de Solicitud

200302368

⑨

Comprobante de pago No. 05-43232 y 5-77831

Fecha 14-jun-05 y 7-oct-05

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

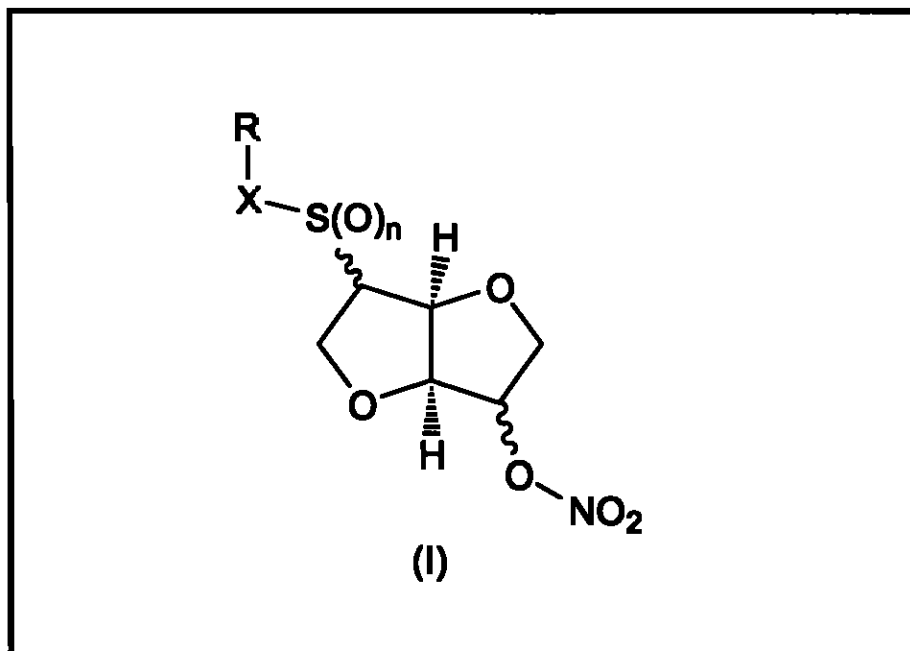
10

ANEXOS

000002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☒ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros: Tarjetas extracto publicación, propietario y archivo temático. Reporte de Búsqueda Internacional

11 FIGURA CARATERISTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Rad: 05-041525-00000-0000 Fec: 2006-05-03 16:33:01  
Dep: 2020 NUECREACIONES  
Tra: 11 PATENTE/II Ene 379 FABENACIONALI  
Act: 411 PRESENTACION Folio: 236

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 43,232  
FECHA : JUNIO 14 DE 2005

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE           | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PAGO | Vc. PAGO       |
|-----------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|----------------|
| ALVARO CORREA ORDONEZ | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 350-00110-6 | 28104072 | 14/06/2005 | 139,171,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|-------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 | SOLICITUDES                         |                |
|       |             | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 443,000.00     |
|       |             | TOTAL :                             | \$ 443,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

000004

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Rad: 05-041625-00000-0000 Fec: 2005-05-03 15:33:21  
Dep. 2020 NUECREACIONES  
Trz: 11 PATENTEYH Eya 379 FASENACIONALII  
Act 411 PRESENTACION Folio: 255

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 5 - 77,831  
FECHA : OCTUBRE 7 DE 2005

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE           | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-----------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|---------------|
| ALVARO CORREA ORDONEZ | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 36864753 | 07/10/2005 | 99,278,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. RENTISTICO                             | CONCEPTO                             | TOTAL CONCEPTO |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I | 54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRANI | 20,000.00      |
|                                              | TOTAL :                              | \$ 20,000.00   |

SOM: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
28 April 2005 (28.04.2005)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2005/037842 A1

(51) International Patent Classification: C07D 493/04, A61K 31/34

(74) Agents: HOFFMANN EITLÉ et al.: Arabellastrasse 4, 81925 München (DE).

(21) International Application Number:  
PCT/EP2004/010882

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:  
29 September 2004 (29.09.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
200302368 3 October 2003 (03.10.2003) ES

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR). OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): LÁCER, S.A. [ES/ES]; Sardenya 350, E-08025 Barcelona (ES).

(72) Inventors; and

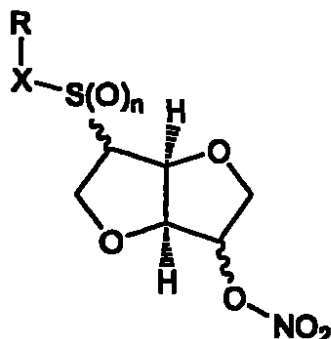
(75) Inventors/Applicants (for US only): REPOLLES MOLINER, Jose [ES/ES]; LÁCER, S.A., Sardenya 350, E-08025 Barcelona (ES). SALAS PEREZ-RASILL, Eduardo [ES/ES]; LÁCER, S.A., Sardenya 350, E-08025 Barcelona (ES). PUHILL COY, Francisco [ES/ES]; LÁCER, S.A., Sardenya 350, E-08025 Barcelona (ES).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DISULFIDE, SULFIDE, SULFOXIDE, AND SULFONE DERIVATIVES OF CYCLIC SUGARS AND USES THEREOF



(I)

(57) Abstract: In the present invention there are disclosed new derivatives of dianhydrohexite mononitrate corresponding to formula (I), tautomers, pharmaceutically acceptable salts, prodrugs and solvates thereof as well as pharmaceutical compositions comprising these compounds and uses thereof.

## **Disulfide, Sulfide, Sulfoxide, and Sulfone Derivatives of Cyclic Sugars and Uses Thereof**

### **Field of the invention**

The present invention relates to disulfide, sulfide, sulfoxide, and sulfone derivatives of 1,4:3,6 - dianhydrohexite mononitrate and their use for the prevention and/or treatment of vascular disorders.

### **Technical background**

Nitric oxide (NO) is one of the smallest and simplest of the biologically active molecules in nature. Moreover, NO appears to be one of the most ubiquitous molecules in mammalian species. As one of the most widespread signalling molecules, NO is a major player in controlling nearly every cellular and organ function in the body. NO is the only endogenous molecule able to function as a neurotransmitter, autacoid, constitutive mediator, inducible mediator, cytoprotective molecule, and cytotoxic molecule.

Because NO plays multiple physiological roles in regulating numerous and diverse organ functions, defects in the NO pathway lead to the development of many different pathological conditions. These disorders include hypertension, atherosclerosis, coronary artery diseases, cardiac failure, pulmonary hypertension, stroke, impotence, vascular complications in diabetes mellitus, gastrointestinal ulcers, asthma, and other central- and systemic- nervous system disorders.

All nitric oxide donors (NODs) share the common property of producing NO-related activity when applied in biological systems and thus mimic endogenous NO responses. However, the pathways leading to NO formation/release differ significantly among the compound classes, as do their chemical reactivities. Whereas some compounds require enzymatic catalysis, others produce NO non-enzymatically. In some compounds, the liberation of NO is preceded by a reduction or an oxidation. The process is complicated still more by the specific susceptibility of compounds to the changes in pH, oxygen, light and temperature and by the different by-product formation that takes place during the decomposition or the metabolism. In addition, the kinetics of NO release from a given compound is often more important than the absolute amount of NO released. Moreover, the tissue distribution of the NODs and the site where NO is generated is also of great importance. All these considerations are important since they explain the very different pharmacological profiles obtained with the different NODs described in the literature and make it necessary to fully characterize the pharmacological profile of newly developed NODs in research and development.

Pharmaceutically useful NODs having a isosorbide-mononitrate skeleton are disclosed in WO 00/20420. The compounds as such disclosed therein do not form part of the present invention. That application describes organic nitrates capable of providing a potent vasodilating effect and which at the same time show a small or null tolerance effect. However, no indication exists for the possible use of said compounds for the treatment of platelet activation; thrombosis; stroke; tissue damage due to ischemia and/or to ischemia/reperfusion; pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis; and/or atherosclerosis. Accordingly the new use of said compounds forms part of the present invention.

One of the principal problems of the nitrated organic compounds described in the literature and those used clinically resides in the fact that their mechanism of action is the relaxation of vascular smooth muscle without modifying other pathologic processes involved in cardiovascular diseases.

Tissue ischemia results in the depletion of intracellular adenosine triphosphate (ATP) stores, which subsequently compromises the function of membrane-associated, ATP-dependent ionic pumps in endothelial cells. This membrane dysfunction allows entry of calcium, sodium, and water into the cells. The resultant accumulation of calcium and other ions in the cell can result in cell swelling and the inappropriate activation of cellular enzymes. One enzyme that is activated by the rise in intracellular calcium during ischemia is xanthine dehydrogenase (XDH). Under normal conditions, hypoxanthine (a breakdown product of ATP metabolism) is oxidized by XDH, in an NADPH-dependent manner, to produce xanthine and uric acid. However, during the hypoxic condition of ischemia, hypoxanthine levels rise within the cell due to ATP hydrolysis, and there is a calcium-dependent activation of proteases that convert the NADPH-reducing XDH to an oxygen-reducing form of the enzyme, namely, xanthine oxidase (XO). On restoration of blood flow (reperfusion) to the tissue and with the reintroduction of molecular oxygen, XO will convert hypoxanthine to xanthine and uric acid, and it will catalyze the reduction of molecular oxygen to form both superoxide anion radicals ( $O_2^-$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). This XO-dependent mechanism of oxygen radical production has been invoked to explain the involvement of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  in reperfusion injury to a variety of organs, including intestine, brain, heart, and skeletal muscle.

The generation of oxygen radicals in postischemic tissues appears to overcome the capacity of endogenous antioxidants

such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione to protect endothelial and parenchymal cells. Exogenous antioxidants such as SOD and catalase have been shown to attenuate the leukocyte infiltration and tissue injury elicited by ischemia and reperfusion.

Nitric oxide bioavailability appears to be reduced in reperfusion, which is likely due to a decline in endothelial NO production and an increased inactivation of NO by endothelial-cell-derived  $O_2^-$ . The limited bioavailability of NO contribute to the abnormal cell-cell interactions and vascular dysfunction during reperfusion. Nitric oxide-donating compounds have shown promise as protective agents in experimental models of ischemia-reperfusion. However, considering the processes involved in the damage by ischemia-reperfusion it would be of great interest to have a molecule with both properties: being a NO-donor and at the same time with antioxidant properties.

Atherosclerosis is an active process initiated by a continuous damage of the vascular endothelium. The view of atherosclerosis as a response to a damage of the endothelium was developed when the association of atherosclerosis with risk factors (high LDL plasma levels, low HDL plasma levels, hypertension, oxidative stress, tobacco consumption, diabetes mellitus, high Lp(a) plasma levels or modification of LDL such as oxidation or glycation that prevent LDL removal by the specific receptors) was studied. LDL accumulates in the vascular wall as a consequence of a vascular endothelial cells active transport. During this process, the LDL suffers the oxidation of a part of the molecule. The presence of oxidated-LDL (ox-LDL) is of capital importance in the development of the atherosclerotic lesion. To the same extent, the theory that oxidized LDL is responsible for some of the pathological features of atherosclerotic lesions derives from the findings in cultured cells systems that oxidized LDL causes cellular changes that correlate with

known aspects of arterial lesions but are not induced by native LDL. Endothelial injury, LDL retention in intimal interstitium, monocyte recruitment into intima, engorgement of macrophages with lipoprotein-derived lipid, smooth muscle cell migration and proliferation, accumulation of necrotic cell debris, and tendencies towards vasoconstriction and procoagulant activity are characteristics of atherosclerosis.

Cardiac allograft vasculopathy is an unusually accelerated and diffuse form of coronary atherosclerosis that limits the long-term success of cardiac transplantation. Coronary endothelial vasodilator dysfunction is a common and early marker for the development of cardiac allograft vasculopathy.

Accordingly, novel nitrated organic compounds which, in addition to the vasodilating activity, could combine activities that would allow them to modify other pathologic processes involved in cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia and reperfusion, will represent an important advantage with respect to the compounds nowadays in use.

#### **Summary of the invention**

An object of the invention is a novel type of compounds, derivatives of dianhydrohexite mononitrate, which are capable of providing a potent vasodilating effect and which at the same time modify other pathologic processes involved in cardiovascular diseases such as, atherosclerosis, cardiac allograft vasculopathy, and tissue damage due to ischemia and/or to ischemia-reperfusion.

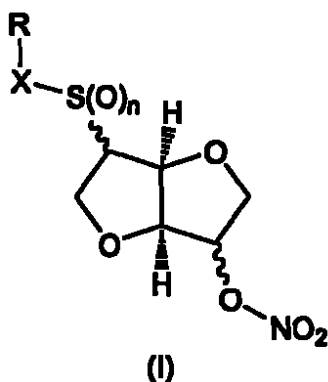
Another object of the invention is a novel type of compounds, derivatives of dianhydrohexite mononitrate, which are capable of providing a potent antithrombotic effect even at a dose that does not modify the blood pressure.

Another object of the invention is a novel type of compounds, derivatives of dianhydrohexite mononitrate, which are capable of providing a synergistic effect with thrombolytic drugs, anticoagulants, antithrombotics, antioxidants and hypolipemiant drugs.

A further object of the present invention relates to the new use of derivatives of dianhydrohexite mononitrate for the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of cardiovascular disorders related to atherosclerosis.

#### Detailed description of the invention

It is an object of the present invention to provide a compound according to formula (I), or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



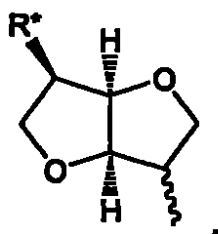
wherein:

$n$  is an integer of 0, 1, or 2,

$\text{X}$  represents  $-\text{S}(\text{O})_m-$ ,  $-(\text{C}=\text{O})-$  or a single bond, wherein  $m$  is an integer of 0, 1, or 2; with the proviso that when  $\text{X}$  represents  $-(\text{C}=\text{O})-$  then  $n$  is 0,

R represents hydrogen or is a residue  $R^a$ , which residue  $R^a$  is selected from the group consisting of:

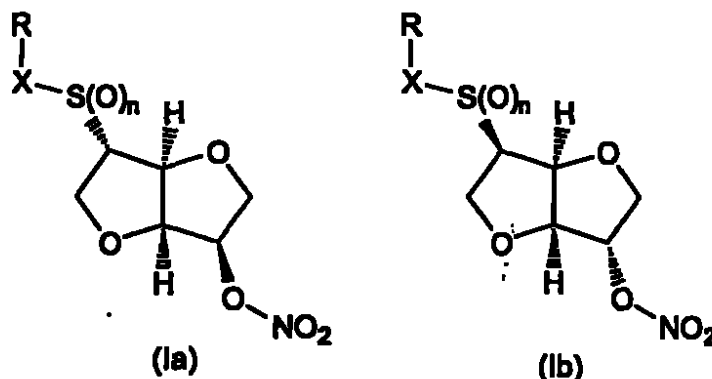
C<sub>1-6</sub> alkyl;  
C<sub>2-6</sub> alkenyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
phenyl;  
pyridyl;  
thiophenyl;  
nitrosyl;  
S-cysteinyll;  
S-glutathionyl; and



wherein  $R^*$  is selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

wherein  $R^a$  optionally is substituted by one to three groups independently selected from C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen.

It is preferred in the compounds according to formula (I) when  $\text{RXS(O)}_n^-$  and  $-\text{ONO}_2$  are trans to each other with respect to the ring plane, as depicted in formulae (Ia) and (Ib):



that then  $\text{RXS(O)}_n^-$  does not represent  $\text{Z-C(=O)-S-}$ , wherein Z is an  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  alkyl group, aryl group, or an aralkyl group.

Surprisingly, in addition to the potent vasodilating effect with small or null tolerance, the compounds of formula (I) possess anti platelet activation, anti thrombotic, anti stroke, anti oxidant, anti tissue injury/damage due to ischemia and/or ischemia/reperfusion, and anti atherosclerotic properties.

Another embodiment of the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising as active ingredient at least one of the derivatives of dianhydrohexite mononitrate according to formula (I), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof.

A further embodiment of the present invention relates to the use of at least one derivative of dianhydrohexite mononitrate according to formula (I), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof as active ingredient for the manufacture of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, endothelial dysfunctions, vasospasm, cardiac

Examples of basic salts include inorganic salts such as salts of sodium, potassium, calcium, ammonium, magnesium, aluminium and lithium, and organic salts such as ethylenediamine, ethanolamine, N,N-dialkyleneethanolamine, triethanolamine, glucamine and basic salts of amino acids.

The particularly preferred derivatives or prodrugs are those that increase the bioavailability of compounds of the present invention when such compounds are administered to a patient (for example, allowing that an administered compound of oral form more quickly is absorbed in blood) or those that increase the liberation of the corresponding compound to a biological compartment (for example, the brain or the lymphatic system).

Any compound that is a prodrug of a compound of formula (I) belongs to the scope of the invention. The term "prodrug" is used in the amplest sense and includes derivatives that "in vivo" are metabolized into compounds of the invention. Such derivatives include, depending on the present functional groups in the molecule and without limitation, the following derivatives: esters, esters of amino acids, phosphate esters, metallic salts of sulfonated compounds, carbamates and amide esters.

The compounds of the present invention can preferably be in their crystalline form, or like free compounds or solvates. The solvation methods which can be applied are those generally known in the art. The suitable solvates are pharmaceutically acceptable solvates. It is preferred that the solvate is a hydrate.

It is preferred that the compounds of formula (I), or their salts or solvates are in their acceptable pharmaceutically substantially pure form. By pharmaceutically acceptable form it is understood, "inter alia", having an pharmaceutically acceptable level of purity excluding usual pharmaceutical

allograft vasculopathy, dysfunctions of the circulatory system, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis such as but not limited to Alzheimer's disease, pathological conditions where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion.

The above used expressions will be outlined in more detail below:

The expression "pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug thereof" describes any pharmaceutically acceptable salt, ester, solvate or any other compound that, administered to a patient (directly or indirectly), provides a compound described herein. Nevertheless, it will be considered that the pharmaceutically non acceptable salts also are included within the limits of this invention since these compounds can be useful in the preparation of pharmaceutically acceptable salts. Preparation of salts, prodrugs and derivatives can be carried out by methods known in the state of the art.

For example, pharmaceutically acceptable salts of compounds described herein are synthesized from the corresponding compound, that contains an acid or basic group, by conventional chemical methods. Generally, these salts are, for example, prepared by means of the reaction of free acidic or basic forms of these compounds in a stoichiometric amount with a corresponding base or acid in water or an organic dissolvent or a mixture of both. Non-aqueous media like ether, ethyl acetate, isopropanol or acetonitrile are generally preferred. Examples of acid salts include mineral acid salts such as hydrochloride, hydrobromide, hydriodide, sulphate, nitrate, phosphate and organic acid salts such as acetate, maleate, fumarate, citrate, oxalate, succinate, tartrate, mandelate, methylsulphonate and p-toluensulphonate.

additives such as diluents and carriers, and including material considered non-toxic at levels of normal doses. The levels of purity for the drug are over 50%, preferably over 70% and still more preferable over 90%. In an even more preferred embodiment the compounds of formula (I), or the salts, solvates or prodrugs thereof have purity over 95%.

The compounds of the present invention represented by the formula (I) can include enantiomers, depending on the presence of chiral or isomeric centers, and/or depending on the presence of multiple bonds (for example, Z, E). The pure isomers, enantiomers or diastereoisomers and their mixtures are within the scope of the present invention.

The term "halogen" refers to fluorine, chlorine, bromine, or iodine, whereof bromine is preferred.

The term "C<sub>1-6</sub> alkyl" as used herein refers to a straight or branched chain alkyl moiety having from 1 to 6 carbon atoms, including for example, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, iso-butyl, sec-butyl, t-butyl, pentyl, and hexyl.

The term "C<sub>2-6</sub> alkenyl" as used herein refers to a straight or branched chain alkenyl moiety having from 2 to 6 carbon atoms and at least one double bond of either E or Z stereochemistry where applicable. This term would include, for example, vinyl, allyl, 1- and 2-butenyl, and 2-methyl-2-propenyl.

The term "C<sub>3-8</sub> cycloalkyl" as used herein refers to an alicyclic group having from 3 to 8 carbon atoms. Some illustrative examples of such cycloalkyl groups are cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl and cyclohexyl.

Accordingly, the term "C<sub>3-8</sub> cycloalkyl wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>" refers to an alicyclic group having from 3 to 8 carbon atoms wherein one CH<sub>2</sub> group is

replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>. Some illustrative examples of such groups are tetrahydropyrane, tetrahydrofuran, pyrrolidine, piperidine, and tetrahydrothiophene.

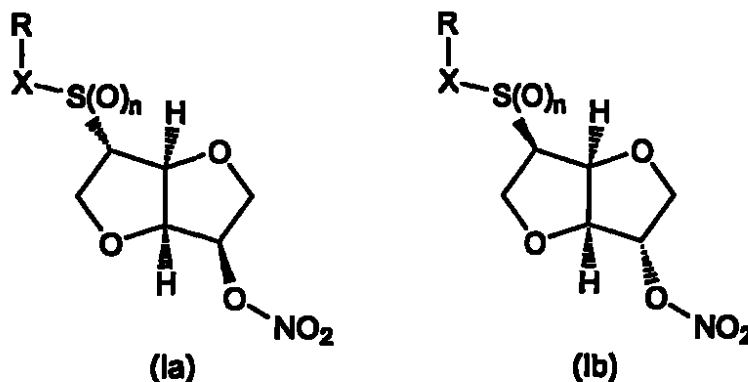
The term "C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl" refers to an alicyclic group having from 4 to 8 carbon atoms. Some illustrative examples of such cycloalkenyl groups are cyclopentenyl, cyclohexenyl, cycloheptenyl and cyclooctenyl.

It is preferred that R represents hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, (C<sub>1-6</sub> alkyl)C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, (C<sub>1-6</sub> alkyl)C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, phenyl or (C<sub>1-6</sub> alkyl)phenyl, whereas C<sub>1-6</sub> alkyl is especially preferred.

It is further preferred that in formula (I) either one or both of m and n is 0.

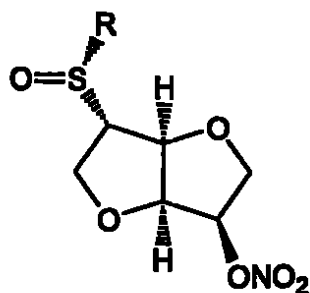
Also it is preferred that X represents a single bond or -S-.

It is especially preferred that the compounds of formula (I) correspond to compounds which are represented by formula (Ia) and/or formula (Ib):

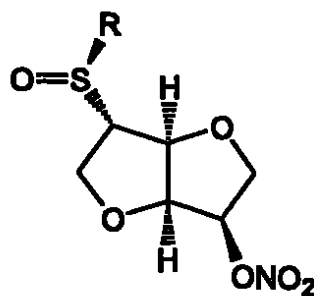


The compounds of formula (I) also include (R) and (S) diastereoisomers according to the formulas (Ic) and (Id):

13



(1c)

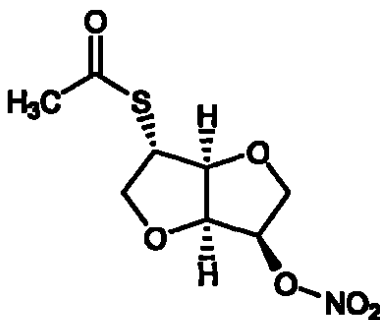


(1d)

Especially preferred compounds of formula (I) are:

2-thioisosorbide 5-mononitrate,   
 5,5'-dinitrato-2,2'-dithiodiisosorbide,   
 2-methylthioisosorbide 5-mononitrate,   
 2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate,   
 2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate,   
 2-methyl-sulfinylisosorbide 5-mononitrate,   
 2-methylsulfonylisosorbide 5-mononitrate,   
 S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate,   
 2-(tetrahydropyran-2-yl-thio)isosorbide 5-mononitrate,   
 2-(isosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate, and   
 2-(5'-acetyloxyisosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate.

Further, it is especially preferred to use 2-acetylthio-isosorbide-5-mononitrate (compound (12)), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug and/or a solvate thereof:

12

as active ingredient for the manufacture of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of thrombosis, ischemia, cell/tissue damage induced by ischemia and/or by ischemia and reperfusion, hypertension, vasospasm, atherosclerosis and/or cardiac graft vasculopathy.

Additionally, the compounds of formula (I), especially 2-acetylthioisosorbide 5-mononitrate (12), their tautomers, pharmaceutically acceptable salts, prodrugs and solvates thereof, may also be used in a therapy for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, cardiac allograft vasculopathy, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion. These compounds may especially be used in the prevention and/or treatment of pathological conditions, where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, such as allergy, stroke, Alzheimer's disease, and/or ischemic cardiovascular diseases. The pharmaceutical compositions may be administered by different routes. For example, they may be administered orally in form of pharmaceutically preparations such as tablets, capsules, syrups and suspensions. Parenterally in form of solutions or emulsions, etc. They may also be administered topically in form of creams, pomades, balsams, etc., and transdermically for example through the use of patches or bandages. They may also be applied directly in the rectum as suppositories. The preparations may comprise physiologically acceptable carriers, excipients, activators, chelating agents, stabilizers, etc. In case of injections there may be incorporated physiologically acceptable buffers, solubilizing agents or isotonicity.

The pharmaceutical compositions according to the present invention may further comprise a thrombolytic agent, preferably plasminogen activator, urokinase, streptokinase, alteplase or anistreplase. They may also contain an

anticoagulant agent, preferably heparin, dicoumarol, acenocoumarol, enoxaparine or pentosan polysulfate. Moreover, they may contain additionally an antithrombotic agent preferably acetyl salicylic acid, dipyridamole, ticlopidine, clopidogrel, triflusal, pentosan polysulfate or abciximab. They can further comprise an immunoglobulin or fragment thereof having a specificity for glycoprotein IIb/IIIa.

Alternately, the pharmaceutical compositions according to the invention may further comprise an hypolipemiant agent preferably simvastatin, lovastatin, atorvastatin, pravastatin, fluvastatin, eptastatin, lifibrol, acifran, acitemate, glunicate or rosuvastatine. They may also contain an antioxidant / free radical scavengers agent, preferably selected from nicaraven, ranolazine, emoxipin, glutathione, edaravone, raxofelast, lycopene, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-D-cysteine, a racemic mixture of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-D-cysteine, or carvedilol.

The pharmaceutical compositions according to the present invention may be used for the treatment and/or prevention of atherosclerosis, cardiac allograft vasculopathy, platelet activation, thrombosis, stroke, tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion, and/or pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis (such as but not limited to allergy, stroke, Alzheimer's disease, ischemic cardiovascular diseases); and/or pathological conditions where a deficit of NO plays an important role in their pathogenesis. They can also be used for the treatment and/or prevention of dysfunctions of the circulatory system preferably cardiovascular and coronary dysfunctions.

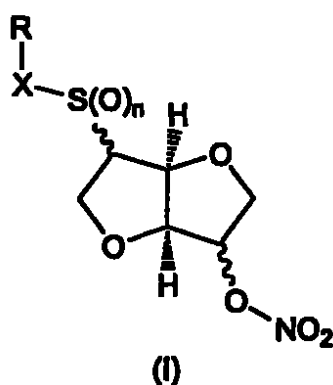
The daily dose may be varied depending on the specific symptoms, the age, the body weight of the patients, the specific mode of administration, etc., and a daily normal dose for an adult person could be between 0.1 to 500 mg, and

could be administered as one dose only or divided into several doses during the day.

The compounds of the present invention can be prepared by preparation methods known in the art, by adaptation of the known processes by the skilled person or by a new process described below.

Hence, another embodiment of the present invention relates to a processes for preparing compounds of formula (I), tautomers, pharmaceutically acceptable salts, prodrugs and solvates thereof.

According to the invention it is preferable to prepare a compound of the formula (I), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof by the process outlined below:



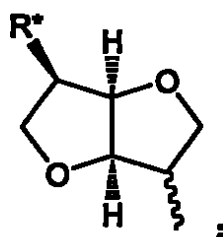
wherein:

$n$  is an integer of 0, 1, or 2,

$X$  represents  $-S(O)_m-$  or a single bond, wherein  $m$  is an integer of 0, 1, or 2,

and  $R$  represents hydrogen or is a residue  $R^a$ , which residue  $R^a$  is selected from the group consisting of:

C<sub>1-6</sub> alkyl;  
C<sub>2-6</sub> alkenyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O,  
S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by  
O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
phenyl;  
pyridyl;  
thiophenyl;  
nitrosyl;  
S-cysteinyll;  
S-glutathionyl; and



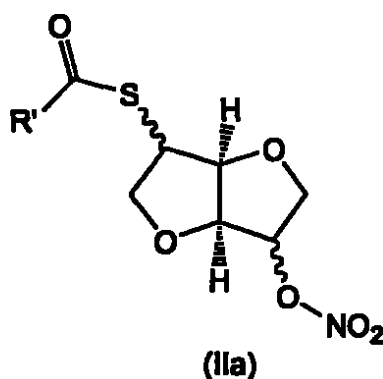
wherein R\* is selected from the group consisting of  
hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl,  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and  
halogen,

wherein R<sup>a</sup> optionally is substituted by one to three  
groups independently selected from the group consisting of  
C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub>  
cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

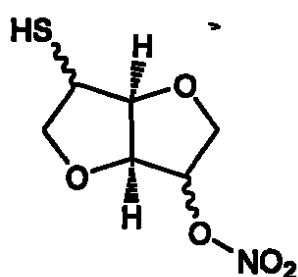
which process comprises conducting the following steps:

a) effecting the hydrolysis of a compound of formula  
(IIa):

18



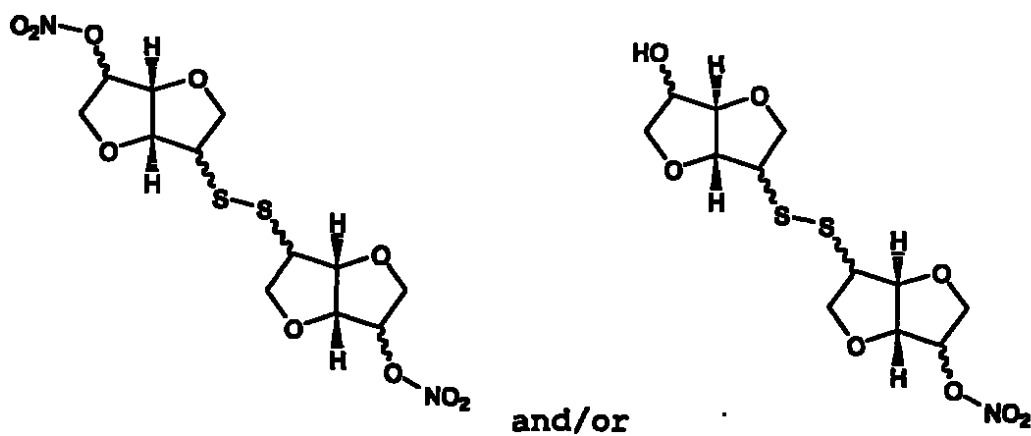
wherein R' is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, preferably methyl, to obtain the following compound:



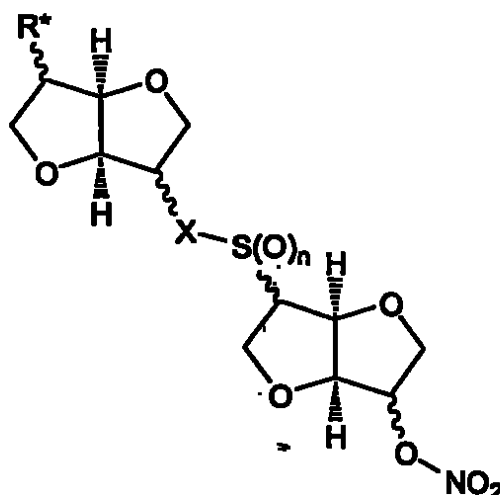
and

(b) optionally, effecting on the compound prepared according to the step (a):

I. an oxidation reaction to obtain:



optionally followed by a second oxidation to obtain the following compound:



wherein:

$n$  is 1 or 2,

$X$  is  $-S(O)_m-$ , wherein  $m$  is 0, 1 or 2, and

$R^*$  represents hydroxyl or  $ONO_2$ ;

II. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (I), wherein:

$n$  is an integer of 0,

$X$  represents a bond,

and  $R$  does not represent nitrosyl,

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (I), wherein:

$n$  is an integer of 0,

$X$  represents  $-S(O)_m-$ , wherein  $m$  is an integer of 0 or 1,

and  $R$  does not represent nitrosyl;

III. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (I), wherein:

n is an integer of 0, and

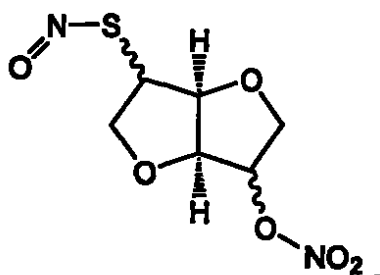
X represents -S-;

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (I), wherein:

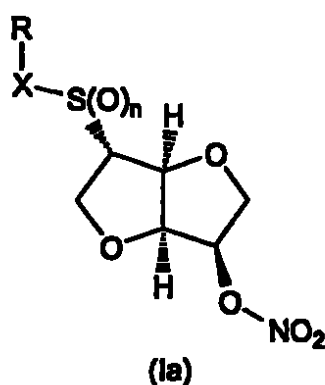
n is an integer of 1 or 2, and

X represents -S(O)<sub>m</sub>-, wherein m is 0, 1 or 2; or

IV. a nitrosation reaction to obtain:



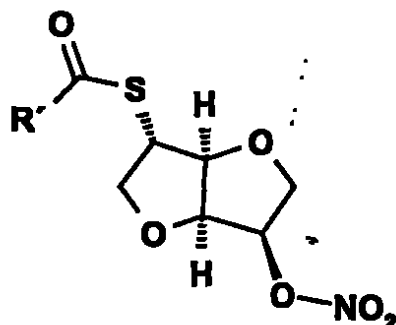
According to the above process of the invention it is especially preferable to prepare a compound of the formula (Ia), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



wherein n, X, m and R have the above meaning,

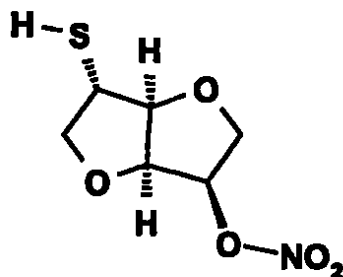
and wherein said process comprises conducting the following steps:

- a) effecting the hydrolysis of a compound of formula (II):



(II)

wherein R' is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, preferably methyl, to obtain 2-thioisosorbide 5-mononitrate (1),



(1)

and

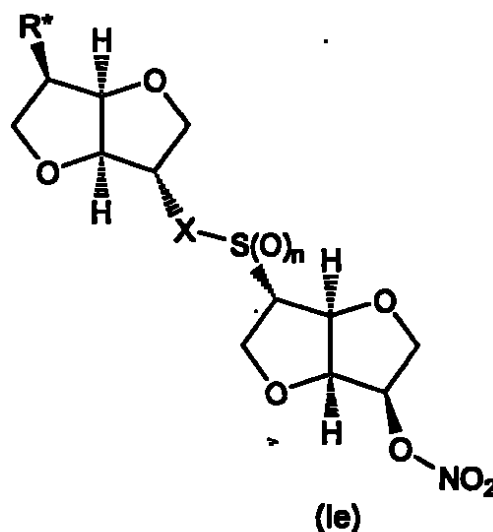
- (b) optionally, effecting on compound (1) prepared according to the step (a):

I. an oxidation reaction to obtain:

5,5'-dinitrato-2,2'-dithiodiisosorbide (2) or  
2-(isosorbidyl-2'-dithio)isosorbide  
5-mononitrate (8),

22

optionally followed by a second oxidation to obtain a compound according to formula (Ie):



wherein:

$n$  is 1 or 2,

$X$  is  $-S(O)_m-$ , wherein  $m$  is 0, 1 or 2, and

$R^*$  represents hydroxyl or  $ONO_2$ ;

II. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (Ia), wherein:

$n$  is an integer of 0,

$X$  represents a bond,

and  $R$  does not represent nitrosyl,

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (Ia), wherein:

$n$  is an integer of 0,

$X$  represents  $-S(O)_m-$ , wherein  $m$  is an integer of 0 or 1,

and  $R$  does not represent nitrosyl;

III. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 0, and

X represents -S-;

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 1 or 2, and

X represents -S(O)<sub>m</sub>-, wherein m is 0, 1 or 2; or

IV. a nitrosation reaction to obtain:

S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate (6).

Optional step (b) of this new process of the invention is described schematically in Schemes 1 to 4 for specific compounds of the invention. These Schemes 1 to 4 relate to the oxidation reaction I, the substitution reaction II, the substitution reaction III, and the nitrosation reaction IV, respectively.

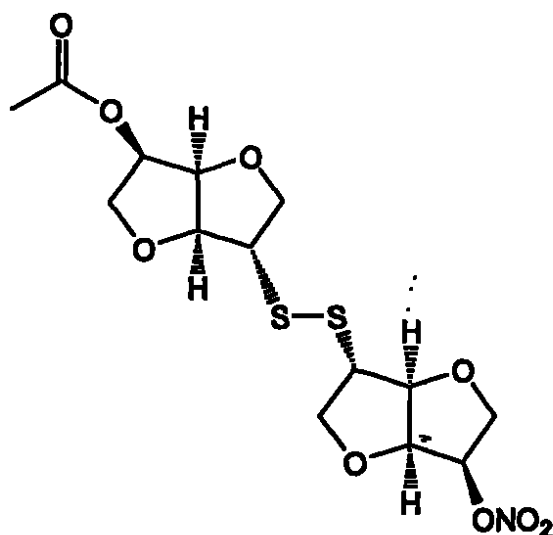
A specifically preferred process of the invention includes steps (a) and (b) II for the preparation of:

2-[(R)-alkylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate and/or  
2-[(S)-alkylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate.

It is further preferred that both diastereoisomers are separated subsequently, which separation may be carried out by using conventional methods known in the art.

A further preferred preparation process of the invention concerns the preparation of a compound of formula (11) or a

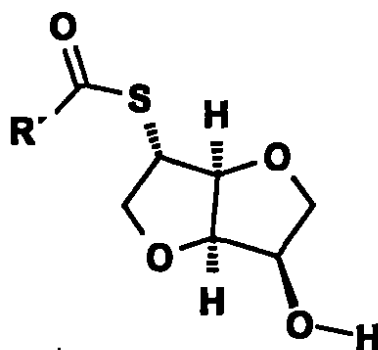
tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



(11)

which process comprises the following steps:

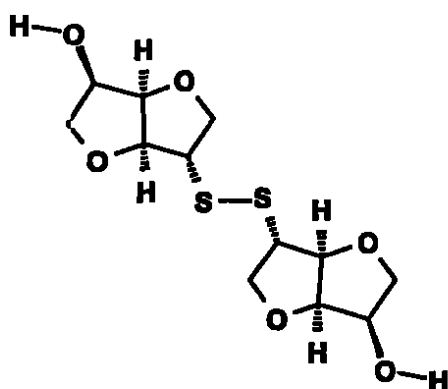
- a) effecting an oxidation reaction of a compound of formula (III):



(III)

wherein R' is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, preferably methyl, to obtain 2,2'-dithio-diisobutide (10),

25



(10)

and

(b) effecting a nitration reaction of the compound prepared in step (a) with a nitrating agent in the presence of a carboxylic anhydride, preferably acetic anhydride.

Finally, another embodiment of the present invention relates to 2,2'-dithiodiisosorbide, compound (10), which is an intermediate compound in the preparation of compound (11) of the invention.

In the working examples herein (*vide infra*) there are described in detail suitable processes to obtain various of the compounds according to the general formula (I). In view of these examples, it is within the skilled persons general knowledge to obtain the compounds not explicitly exemplified herein via suitable modifications of the working examples herein. It will be apparent to the skilled person that these examples are solely for illustrative purposes and must not be considered to limit the invention.

### Examples

The compounds obtained in the examples that appear below are identified by their proton ( $^1\text{H}$ -NMR) and carbon-13 ( $^{13}\text{C}$ -NMR) nuclear magnetic resonance spectroscopy data.

The nuclear magnetic resonance spectra were recorded with Varian Gemini-2000 or Varian Gemini-300 spectrometers.

The operating frequency and the solvent used to record the spectrum are indicated in the  $^1\text{H}$ -NMR spectra. The position of the signals is indicated in  $\delta$  (ppm), with the signal of the solvent protons taken as the reference. The reference values were 7.24 ppm for deuterated chloroform and 2.49 ppm for deuterated dimethyl sulfoxide. The signal obtained from tetramethylsilane (TMS) protons is occasionally taken as an internal reference, with 0 ppm used as a reference value. The number of protons for each signal as measured by electronic integration and the type of signal are indicated in parentheses, using the following abbreviations: s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublet of doublets), bs (broad signal), cs (complex signal), s.a.  $\text{D}_2\text{O}$  (simplifies upon deuteration), d.a.  $\text{D}_2\text{O}$  (disappears upon deuteration).

The operating frequency and the solvent used in each spectrum are indicated in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra. The position of the signals is indicated in  $\delta$  (ppm), with the signal of the solvent carbons taken as the reference. The reference values are 77.00 ppm for deuterated chloroform and 39.50 ppm for hexadeuterated dimethyl sulfoxide.

In some cases, nuclear magnetic resonance experiments were also carried out using the pulse sequences APT (Attached Proton Test), HETCOR (Heteronuclear Chemical Shift Correlation) or COSY (Correlated Spectroscopy) as an aid to assignment.

In the experimental part the following abbreviations are used:

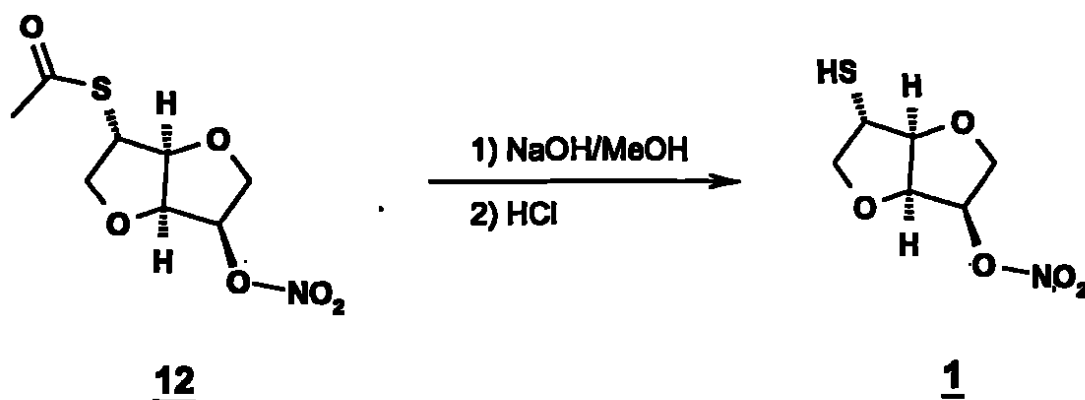
AcOEt

ethyl acetate

|                     |                                                                                         |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| AcOH                | acetic acid                                                                             |
| DMSO-d <sub>6</sub> | hexadeuterated dimethyl sulfoxide                                                       |
| EtOH                | ethyl alcohol                                                                           |
| EtOEt               | ethyl ether                                                                             |
| HPLC                | high performance liquid chromatography                                                  |
| Hx                  | hexane                                                                                  |
| MeI                 | methyl iodide                                                                           |
| MeOH                | methyl alcohol                                                                          |
| LC-(ApcI)MS         | liquid chromatography-atmospheric<br>pressure chemical ionization mass<br>spectrometry. |
| s.d.                | standard deviation                                                                      |
| s.e.m.              | standard error of mean                                                                  |
| THP                 | tetrahydropyranyl                                                                       |

**EXAMPLE 1**

Method to obtain 2-thioisosorbide 5-mononitrate (**1**).



In a 50 mL flask, 1.00 g (4.02 mmol) of 2-acetylthioisosorbide 5-mononitrate (**12**) obtained according to WO 00/20420 were dissolved in 20.0 mL of methyl alcohol. 10.0 mL of a 10% methanol solution of sodium hydroxide were added all at once. After rapidly covering and stirring for 1 min at room temperature (ca. 25 °C), 2.23 mL of concentrated hydrochloric acid were added all at once. It was stirred and

concentrated until dryness, eliminating the solvent at reduced pressure at a temperature below 30 °C.

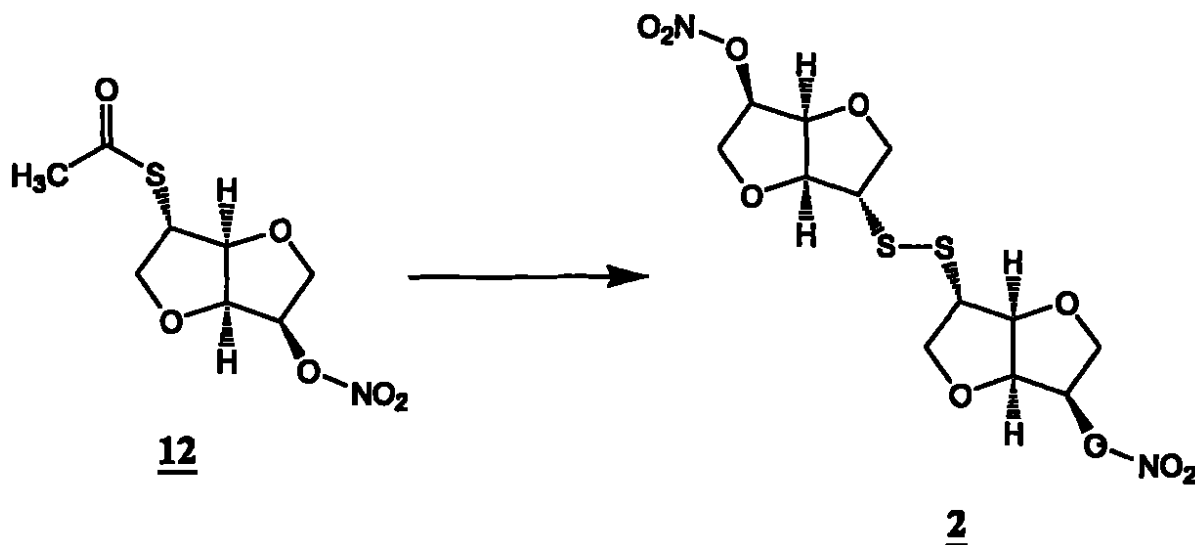
The residue was suspended in chloroform. This chloroform solution was filtered and then dried over anhydrous magnesium sulfate. After filtering the solvent was eliminated at reduced pressure. It was dried at reduced pressure to obtain 0.83 g of an orange-yellow oil corresponding to the product of interest. Yield: 100%.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.36-5.26 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 4.95 (1H, t, J=5.0 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4.42 (1H, d, 4.8 Hz, CHCHS), 4.07 (1H, dd, J=4.6 Hz, J=4.4 Hz, H-CHCHS), 3.97 (1H, dd, J=5.64 Hz, J=2.5 Hz, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 3.87-3.76 (2H, cs, H-CHCHS, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 3.45-3.35 (1H, m, CHS), 1.77 (1H, d, J=8.6Hz, SH).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 91.21 (CHCHS), 81.22 (CHONO<sub>2</sub>), 81.07 (CHCHONO<sub>2</sub>), 76.15 (CH<sub>2</sub>CHS), 69.26 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 42.82 (CHS).

## EXAMPLE 2

Method to obtain 5,5'-dinitrato-2,2'-dithiodiisosorbide (2)



**Procedure 1:**

0.50 g of 2-acetylthioisosorbide 5-mononitrate (12) obtained according to WO 00/20420 was dissolved in 10.0 mL of methyl alcohol. This solution was slowly added, drop by drop, to 200 mL of human plasma in a 250 mL flask with strong magnetic stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 hours. The reaction crude was poured over 500.0 mL of acetonitrile while stirring vigorously, observing the instant precipitation of a flocculant white solid corresponding to the plasma proteins. It was centrifuged at 3000 rpm and at 20 °C for 30 min, the liquid separated and the solid (protein mass) suspended over 250.0 mL of acetonitrile. It was stirred and centrifuged under the same conditions as above (3000 rpm/20 °C/30 min).

The supernatant liquor was decanted and combined with the previous one. The solvent was evaporated at reduced pressure at a temperature below 30 °C. The resulting aqueous residue (about 200 mL) was extracted with 4 x 500 mL chloroform. The organic phases were combined and dried over anhydrous magnesium sulfate. After filtering the solvent was concentrated at reduced pressure. This results in 350 mg of a white solid which is purified by chromatography: (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 6:1), isolating 250 mg of a white solid corresponding to the 2-thioisosorbide 5-mononitrate disulfide product (2). Yield: 60%.

**Procedure 2:**

In a 50 mL flask, 1.00 g (4.02 mmol) of 2-acetylthioisosorbide 5-mononitrate (12) obtained according to WO 00/20420 was dissolved in 20 mL of methyl alcohol and 10 mL of a 10% methanol solution of potassium hydroxide were added. The reaction mixture was covered and stirred for 5 hours at room temperature. The precipitation of a white solid

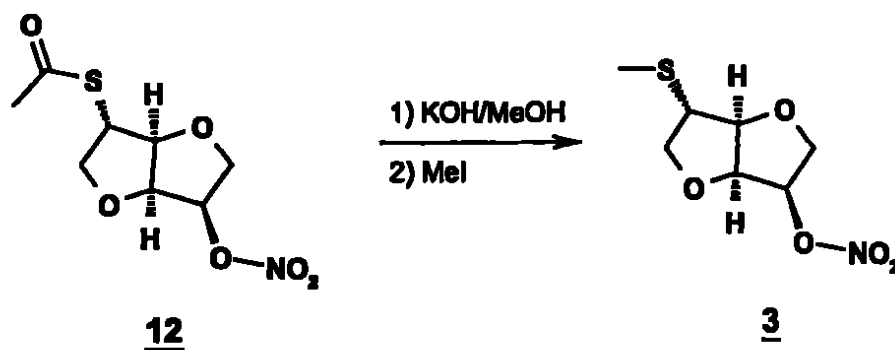
corresponding to the disulfide (2) is observed during the reaction. The solid was filtered off and washed several times with methyl alcohol. Drying at reduced pressure, yields 0.58 g of a white solid corresponding to the 2-thioisosorbide 5-mononitrate disulfide product of interest (2). Yield: 70%.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 5.51-5.43 (2H, m,  $2\text{CHONO}_2$ ), 4.96 (2H, t,  $J=5.4$  Hz,  $2\text{CHCHONO}_2$ ), 4.51 (2H, d,  $J=4.8$  Hz,  $2\text{CHCHS}$ ), 4.04-3.73 (10H, cs,  $2\text{CH}_2\text{CHONO}_2$ ,  $2\text{CH}_2\text{CHS}$ ,  $2\text{CHS}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 88.46 ( $2\text{CHCHS}$ ), 83.31 ( $2\text{CHONO}_2$ ), 81.50 ( $2\text{CHCHONO}_2$ ), 73.24 ( $2\text{CH}_2\text{CHS}$ ), 69.95 ( $2\text{CH}_2\text{CHONO}_2$ ), 54.01 ( $2\text{CHS}$ ).

### EXAMPLE 3

Method to obtain 2-methylthioisosorbide 5-mononitrate (3).



In a 50 mL flask, 1.00 g (4.02 mmol) of 2-acetylthioisosorbide 5-mononitrate (12) obtained according to WO 00/20420 were dissolved in 20.0 mL of methyl alcohol and 5.0 mL of a 10% methanol solution of potassium hydroxide was added all at once. The reaction mixture was covered and stirred for 5 minutes at room temperature. 2.0 mL of methyl iodide (32.00 mmol) were added all at once, the mixture covered and stirred for 2 hours at room temperature. It was concentrated to dryness, eliminating the solvent at reduced

pressure. The residue was dissolved in 250 mL of chloroform and washed with 50 mL of water. The organic phase was separated and washed with 3 x 50.0 mL of water.

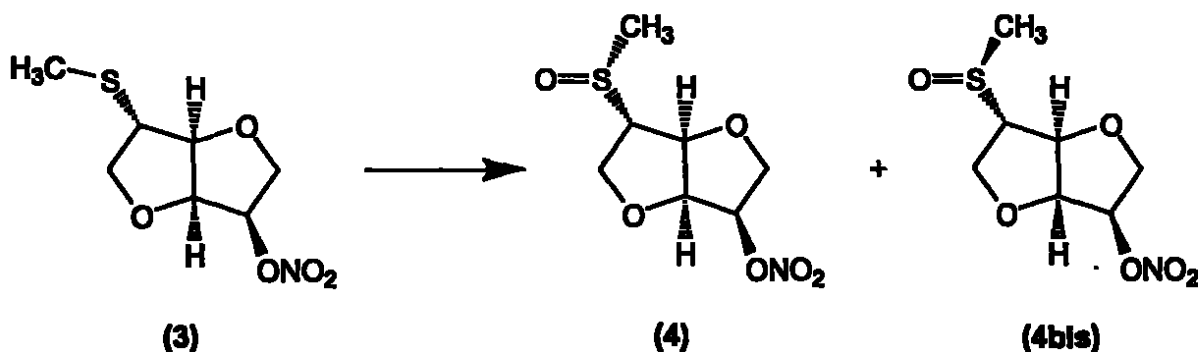
After drying over anhydrous magnesium sulfate, it was filtered and the solvent eliminated at reduced pressure. After drying at reduced pressure, this results in 0.68 g of a white solid corresponding to the product of interest. Yield: 76%.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.34-5.26 (1H, m,  $\text{CHONO}_2$ ), 4.93 (1H; t,  $J=5.2$  Hz,  $\text{CHCHONO}_2$ ), 4.48 (1H, d,  $J=4.8$  Hz,  $\text{CHCHS}$ ), 4.14 (1H, dd,  $J=9.7$  Hz,  $J=4.8$  Hz,  $\text{H-CHCHS}$ ), 4.01 (1H, dd,  $J=11.2$  Hz,  $J=3.0$  Hz,  $\text{H-CHCHONO}_2$ ), 4.01-3.81 (2H, cs,  $\text{H-CHCHS}$ ,  $\text{H-CHCHONO}_2$ ), 3.30-3.24 (1H, m,  $\text{CHS}$ ), 2.15 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 88.65 ( $\text{CHCHS}$ ), 81.55 ( $\text{CHCHONO}_2$ ), 81.26 ( $\text{CHONO}_2$ ), 73.87 ( $\text{CH}_2\text{CHS}$ ), 69.10 ( $\text{CH}_2\text{CHONO}_2$ ), 50.74 ( $\text{CHS}$ ), 14.74 ( $\text{CH}_3$ ).

#### EXAMPLE 4

Method to obtain 2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate (4) and 2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate (4bis)



In a 500 mL flask, it was dissolved 7.3 g (32.9 mmol) of 2-methylthioisosorbide 5-mononitrate (3) obtained according to Example 3 in 75 mL of dioxane. A solution of 7.04 g (32.9 mmol) of NaIO<sub>4</sub> in 110 mL of water was added very slowly, drop by drop, and then stirred for 1 hour at room temperature. The mixture was filtered and then the dioxane was eliminated from the filtrate at reduced pressure. 150 mL of water were added. The mixture was extracted with 2 x 300 mL portions of chloroform. it was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and the solvent eliminated at reduced pressure. This results in 6.6 g of a reaction crude containing a mixture of diastereoisomers in a proportion of 65% of (4) and 35% of (4bis). The resulting reaction crude was recrystallized from dioxane twice to obtain 2.9 g of the product of interest (4) with a purity of 95% by HPLC. Using the mother liquors from the first recrystallization, the solvent was eliminated at reduced pressure and the resulting residue recrystallized from dioxane to obtain 1 g of the product of interest (4bis) with a purity of 95% by HPLC.

**2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate (4):**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.39-5.28 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 5.02 (1H, dd, J=5.6 Hz, J=1.6 Hz, CHCHS), 4.89 (1H, t, J=5.5 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4.29 (1H, dd, J=10.4 Hz, J=6.4 Hz, H-CHCHS), 4.20-3.91 (3H, cs, H-CHCHS, CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 3.38-3.31 (1H, m, CHSO), 2.61 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 82.11 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81.51 (CHCHS), 80.55 (CHONO<sub>2</sub>), 69.65 (CH<sub>2</sub>CHS), 69.28 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 66.24 (CHSO), 37.28 (CH<sub>3</sub>).

**Microanalysis**

calculated (%): 35.44 C; 4.67 H; 5.90 N; 13.51 S; 40.47 O  
experimental (%): 35,31 C; 4,67 H; 5,98 N; 13,5 S; 40,60 O

**Mass Spectrometry (LC-(ApcI)MS to 20V): 238 (M+1)<sup>+</sup>**

**Melting Point: 153 °C by DSC**

**Monocrystal X-Ray Diffraction:** The configuration of the diastereomer (4) is establish as: (R)-S, (S)-C2, (S)-C3, (S)-C4, (R)-C5

**2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate (4bis):**

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 5.39-5.28 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 4.89 (1H, t, J=5,6 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4.68 (1H, d, 5,4 Hz, CHCHS), 4.40-3.88 (4H, cs, CH<sub>2</sub>CHS, CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 3.48-3.40 (1H, m, CHSO), 2.58 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 82.89 (CHCHS), 82.26 (CHCHONO<sub>2</sub>), 80.55 (CHONO<sub>2</sub>), 69.19 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 67.88 (CH<sub>2</sub>CHS), 66.94 (CHSO), 36.64 (CH<sub>3</sub>).

**Microanalysis**

calculated (%): 35.44 C ; 4.67 H; 5.90 N; 13.51 S; 40.47 O

experimental (%): 35.65 C; 4.66 H; 5.87 N; 13.56 S; 40.57 O

**Mass Spectrometry (LC-(ApcI)MS to 20V): 238 (M+H)<sup>+</sup>**

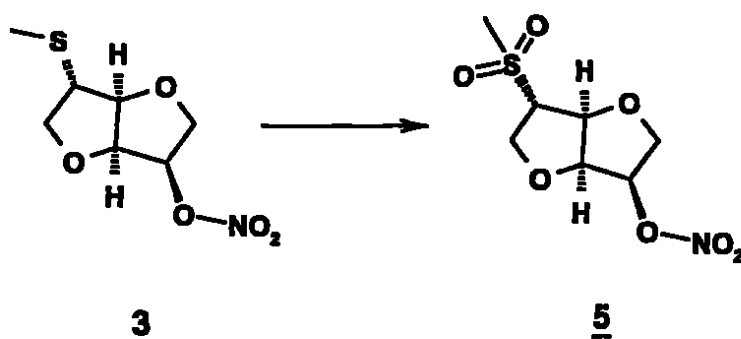
**Melting Point: 115 °C by DSC**

**Monocrystal X-Ray Diffraction:** The configuration of the diastereomer (4bis) is establish as: (S)-S, (S)-C2, (S)-C3, (S)-C4, (R)-C5

**EXAMPLE 5**

**Method to obtain 2-methylsulfonylisosorbide 5-mononitrate (5)**

34



In a flask it was dissolved 1.0 g (4.5 mmol) of 2-methylthioisosorbide 5-mononitrate (**3**) obtained according to example 3 in 20 mL of acetonitrile. A solution of 4.11 g (18,1 mmol) of periodic acid ( $H_5IO_6$ ) was added at once, and then stirred during 48h at room temperature. 50 mL of a saturated solution of  $Na_2SO_3$  are added. It is extracted with 2 x 30 mL of methylene chloride. The organic phases are united and they are washed with 2 x 30 mL of a saturated solution of  $Na_2SO_3$ . It was dried over anhydrous magnesium sulphate, filtered and the solvent eliminated at reduced pressure. 662 mg are obtained of the product of interest (**5**). 640 mg of the crude are suspended in 25 mL of hexane, filtered, and washed with 7.5 mL of chloroform, obtaining 450 mg of the product (**5**) with a purity of 99.7% by HPLC.

$^1H$ -NMR (200 MHz,  $DMSO-d_6$ ): 5.53-5.47 (1H, m,  $CHONO_2$ ), 5.00-4.88 (2H, cs,  $CHCHONO_2$ ,  $CHCHS$ ), 4.38 (1H, dd,  $J=9.8$  Hz,  $J=1.8$  Hz, H- $CHCHS$ ), 4.12-3.86 (4H, cs, H- $CHCHS$ ,  $CH_2CHONO_2$ ,  $CHSO_2$ ), 3.07 (3H, s,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (50 MHz,  $DMSO-d_6$ ): 82.77 ( $CHCHS$ ), 82.36 ( $CHCHONO_2$ ), 81.81 ( $CHONO_2$ ), 68.95 ( $CH_2CHONO_2$ ), 68.46 ( $CH_2CHS$ ), 67.48 ( $CHSO_2$ ), 39.31 ( $CH_3$ ).

#### Microanalysis

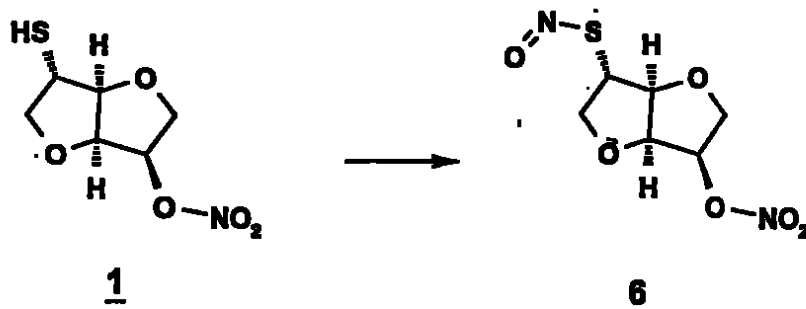
calculated (%): 33.20 C; 4.38 H; 5.53 N; 12.66 S; 44.23 O  
 experimental (%): 33.45 C; 4.34 H; 5.52 N; 12.69 S; 44.43 O

Mass Spectrometry (LC-(ApcI)MS to 20V): 254 (M+H)<sup>+</sup>

Melting Point: 173 °C by DSC

#### EXAMPLE 6

Method to obtain S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate (6)



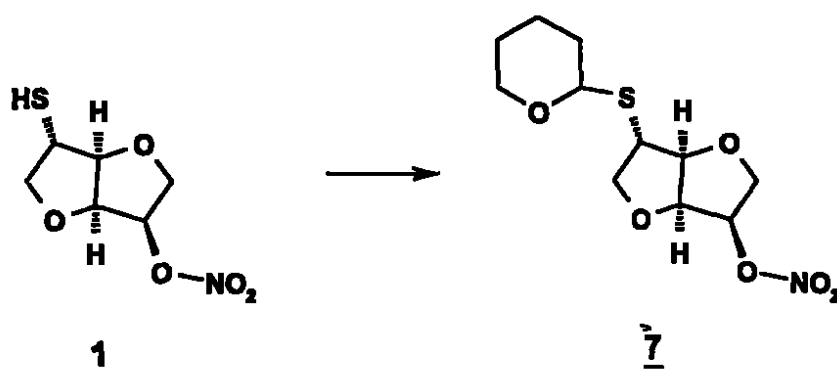
In an amber vial, 0.5 g (2.41 mmol) of 2-thioisosorbide 5-mononitrate (1) obtained according to Example 1 were dissolved in 4.0 mL of MeOH, covered and stirred in an ice bath. 320  $\mu$ L (0.249 g, 2.41 mmol) of tert-butoxynitrite were added and stirred while covered and under cold conditions for 7 hours. The white solid was filtered off and the filtrate was concentrated to dryness at reduced pressure protected from exposure to light and at room temperature. This results in 0.48 g (yield: 84%) of a deep red solid identified as S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate (6).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 5.40-5.25 (sc, 1H, CHONO<sub>2</sub>), 4.84-4.64 (sc, 2H, CHSNO, CHCHONO<sub>2</sub>), 4.40-4.30 (m, 2H, H-CHCHSNO, CHCHSNO), 4.12 (dd, 1H, J=11.4 Hz, J=2.6 Hz, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 4.00-3.80 (sc, 2H, H-CHCHSNO, H-CHCHONO<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): 88.2 (CHCHSNO), 81.9+81.1 (CHCHONO<sub>2</sub>, CHONO<sub>2</sub>), 73.4 (CH<sub>2</sub>CHSNO), 69.5 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 51.6 (CHSNO).

**EXAMPLE 7**

**Method to obtain 2-(tetrahydropyran-2-yl-thio)isosorbide 5-mononitrate (7)**



0.5 g (2.41 mmol) of 2-thioisosorbide 5-mononitrate (1) obtained according to Example 1 were suspended in 6 mL of 3,4-dihydro-2H-pyran and the mixture cooled in an ice bath. 0.10 g (0.40 mmol) of pyridinium p-toluenesulfonate were added and stirred overnight under a nitrogen atmosphere at room temperature. 50 mL of EtOEt were added and the mixture washed with 2 x 40 mL of a saturated NaCl solution. This results in 1.15 g of a reaction crude that is purified by chromatography (Hx:AcOEt = 3:2), which yields 0.65 g of the product of interest with a purity of 83%. Recrystallization from hexane gave 0.45 g of the product with a purity of 95%, identified by its spectroscopy data as 2-(tetrahydropyran-2-yl)-2-thioisosorbide 5-mononitrate (7)

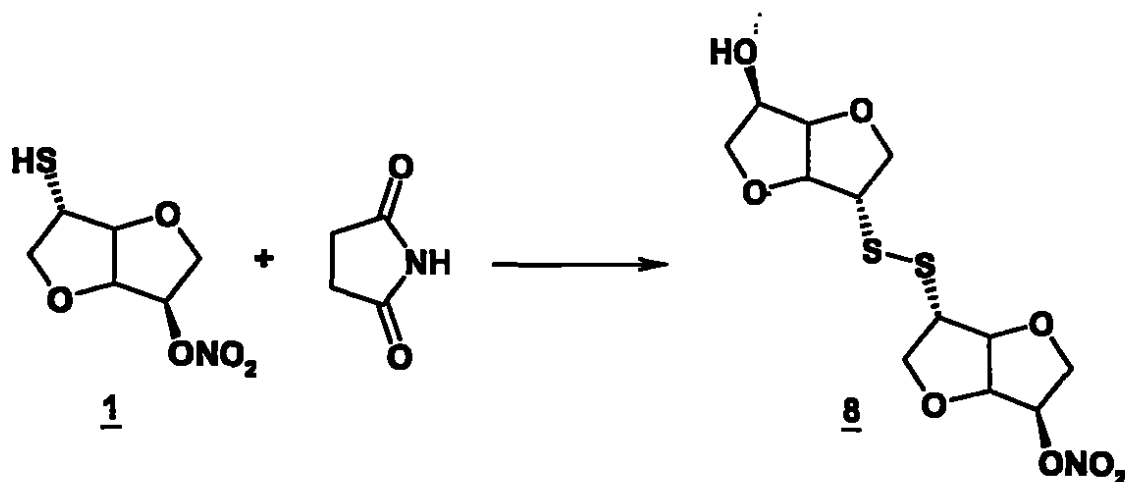
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 5.28 (ddd, 1H, J=11.0Hz, 5.4Hz, 2.8Hz, CHONO<sub>2</sub>), 5.0-4.85 (sc, 2H, CHSTHP, CHCHONO<sub>2</sub>), 4.59 (dd, 1H, J=11.2Hz, 4.6Hz, CHCHSTHP), 4.20-3.80 (sc, 5H, CH<sub>2</sub>CHSTHP, H-CHCHONO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> THP), 3.60-3.40 (sc, 2H, H-CHCHONO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> THP), 2.00-1.45 (sc, 6H, 3CH<sub>2</sub> THP).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): 89.5 and 89.1 (CHCHS), 83.0 and 81.6 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81.4 and 81.3 (CHSTHP, CHONO<sub>2</sub>), 74.9 and 74.1 (CH<sub>2</sub> THP), 69.0 and 68.9 (CH<sub>2</sub>CHSTHP), 64.8 and 64.7 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>),

49.1 and 47.6 (CH<sub>2</sub> THF), 31.3 and 31.2 (CH<sub>2</sub> THF), 25.4 (CH<sub>2</sub> THF), 21.7 and 21.6 (CH<sub>2</sub> THF).

#### EXAMPLE 8

Method to obtain 2-(isosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate (8)



A solution of 0.170 g (1.72 mmol) of succinimide in EtOH was added to 0.323 g (1.56 mmol) of 2-thioisosorbide 5-mononitrate (1). After a white precipitate appears, 0.168 mg (2 mmol) of NaHCO<sub>3</sub> were added. After stirring at room temperature for 3 hours and 45 minutes an additional 100 mg (1.19 mmol) of NaHCO<sub>3</sub> and 10 drops of water were added. After an additional 1 hour and 30 minutes of stirring, the mixture was brought to reflux. After two hours at reflux, the EtOH was eliminated at reduced pressure; 150 mL of water and 150 mL of AcOEt were added. An emulsion is formed and NaCl<sub>(s)</sub> is added until the two phases are separated. The organic phase is separated and the aqueous phase washed with 2 x 150 mL portions of AcOEt. Each of the three organic phases is washed separately with 100 mL of water and the organic phases are combined and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. This is filtered, washed with AcOEt and the solvent eliminated from the filtrate at reduced pressure, obtaining 336 mg of a reaction crude on which flash chromatography is performed. Use of a

mixture of 1:1  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$  as an eluent for the chromatographic separation results in a fraction of 98 mg of the product of interest (8).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.40-5.32 (1H, cs,  $\text{CHONO}_2$ ), 5.04-4.98 (1H, cs,  $\text{CHCHONO}_2$ ), 4.70-4.60 (3H, cs, 3CH), 4.36-4.26 (1H, cs,  $\text{CHOH}$ ), 4.22-4.12 (2H, cs, 2H-CH), 4.10-4.00 (3H, cs, 3H-CH), 3.94-3.86 (2H, cs, 2H-CH), 3.68-3.56 (3H, cs, 2CH-S, 1 H-CH), 2.55 (1H, d,  $J=6.9$  Hz, OH).

Infrared spectroscopy (in KBr pellet):  $3461\text{ cm}^{-1}$ ,  $2987\text{ cm}^{-1}$ ,  $1642\text{ cm}^{-1}$ ,  $1465\text{ cm}^{-1}$ ,  $1279\text{ cm}^{-1}$ ,  $1077\text{ cm}^{-1}$ ,  $846\text{ cm}^{-1}$ .

**Microanalysis:**

experimental (%): 39.53 C, 34.70 H, 4.77 O, 3.96 N, 17.04 S.

calculated(%): 39.23 C, 34.84 H, 4.66 O, 3.81 N, 17.45 S.

**Mass spectrometry:**

Electrospray: 368(M+1).

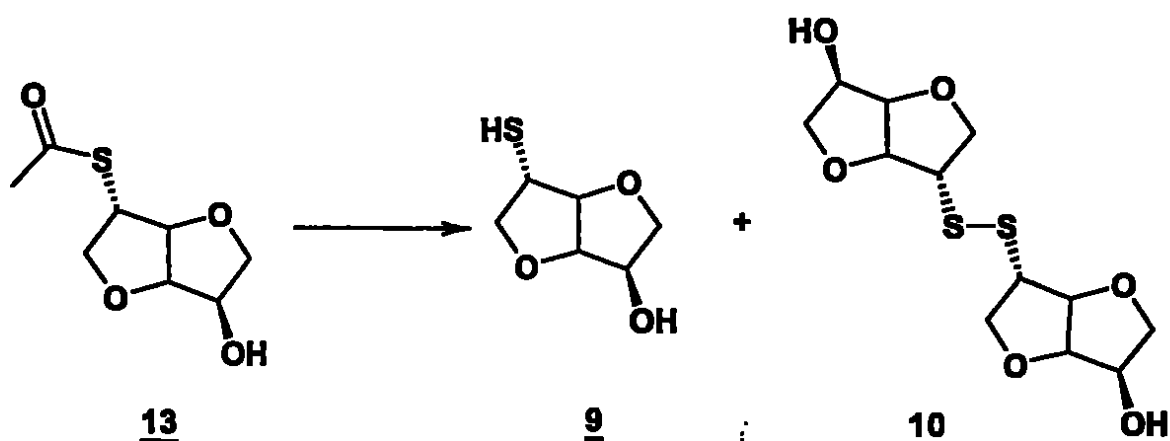
Electron impact ( $m/z$ , (% relative abundance)): 367 (7.4) (M+), 261 (3.8), 160 (8.6), 129 (15.5), 127(14.2), 85 (35.7), 69 (100).

**EXAMPLE 9**

**Step 1**

**Method to obtain 2-thioisosorbide (9) and 2,2'-dithiodiisosorbide (10)**

39



In a 500 mL flask, 15 g (74 mmol) of 2-acetylthioisosorbide (13) obtained according to WO 00/20420 are dissolved in 225 mL of EtOH. A 85% solution of 11.3 g of KOH in 150 mL of water is added. The resulting mixture is stirred at room temperature for 2 hours, neutralized with AcOH<sub>(c)</sub> and the EtOH eliminated at reduced pressure. The resulting solution is brought to basic pH by adding NaOH<sub>(s)</sub>, and stirred at room temperature while bubbling an air stream through the solution for 10 hours. The solution is acidified with HCl<sub>(c)</sub> and brought to pH=4. The water is eliminated at reduced pressure and the resulting residue redissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtered and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution is filtered, washed and the solvent eliminated from the filtrate at reduced pressure, obtaining 9.22 g of a reaction crude which is purified by flash chromatography using different mixtures of cyclohexane/ethyl acetate as eluent. The elution is started with 3 L of a 1:1 mixture, and after that, the percentage of the polar solvent increased, first with 2 L of a 3:5 mixture, later with 2 L of a 1:2 mixture and finally eluted only with AcOEt. A 2.64 g fraction of the thiol (9) and another 3.06 g of the disulfide (10) are isolated from the eluate.

#### 2-Thioisosorbide (9)

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.68-4.58 (1H, cs, CHCHOH), 4.48-4.40 (1H, cs, CHCHSH), 4.34-4.18 (1H, bs, s.a. D<sub>2</sub>O, CHOH),

4.16-4.06 (1H, m H-CHCHSH), 3.96-3.78 (2H, cs, H-CHCHOH, H-CHCHSH), 3.62-3.50 (1H, cs, 1 H-CHCHOH), 3.48-3.36 (1H, cs, s.a. D<sub>2</sub>O, CHS), 2.80-2.60 (1H, bs, d.a. D<sub>2</sub>O, OH), 1.75 (1H, d, J=8 Hz, d.a. D<sub>2</sub>O, SH).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 90.42 (CHCHSH), 81.47 (CHCHOH), 76.27 (CH<sub>2</sub>CHSH), 74.00 (CH<sub>2</sub>CHOH), 72.04 (CHOH), 43.81 (CHSH).

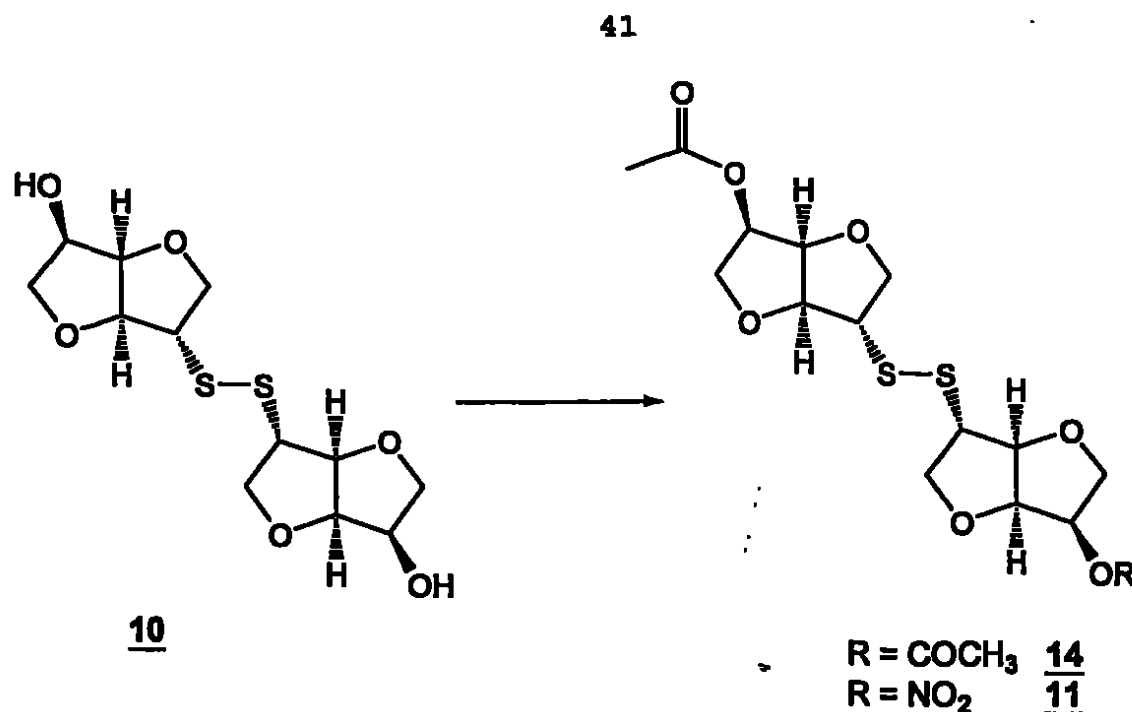
#### **2,2'-Dithiodiisosorbide (10)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.68-4.56 (4H, cs, 2CHCHS, 2CHCHOH), 4.34-4.19 (2H, cs, s.a. D<sub>2</sub>O, 2 CHOH), 4.19-3.97 (4H, cs, 2CH<sub>2</sub>CHS), 3.92-3.80 (2H, cs, 2H-CHCHOH), 3.66-3.52 (4H, cs, 2H-CHCHOH, 2CHS), 2.63 (2H, d, J=6.6 Hz, d.a. D<sub>2</sub>O, 2OH).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 87.42 (2CHCHS), 81.98 (2CHCHOH), 73.93 (2CH<sub>2</sub>CHOH), 72.89 (2CH<sub>2</sub>CHS), 72.07 (2CHOH), 54.74 (2CHS).

#### **Step 2**

**Method to obtain 5,5'-diacetyloxy-2,2'-dithiodiisosorbide (14) and 2-(5'-acetyloxyisosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate (11)**



A nitrating mixture is prepared by adding, slowly and with caution at 0 °C, 1.8 mL of 60% HNO<sub>3</sub> to a mixture of 7.5 mL of acetic anhydride and 12.5 mL of acetic acid. In a 100 mL flask fitted with reflux cooler, thermometer and magnetic stirrer, 2.77 g (8.6 mmol) of 2,2'-dithio-diisosorbide (10) obtained according to Example 8 are dissolved in 17 mL of acetic acid and 3.5 mL of acetic anhydride are added. The mixture is cooled at 0 °C in an ice/salt bath. 4 mL of the previously prepared nitrating mixture is added dropwise over 15 minutes. It is stirred at 0 °C for 2 hours, observing the solidification of the reaction crude. Then it is stirred for 2 hours and 30 minutes at room temperature. The reaction crude is poured over 100 mL of water, filtered and washed with plenty of water. The resulting solid is dried at reduced pressure in the presence of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. This results in 2.69 g of a reaction crude which is purified by preparative reversed phase chromatography. A 1:1- mixture of acetonitrile:water is used as an eluent for the chromatography. A 1.01 g fraction of the diacetate (14) (R=COCH<sub>3</sub>) and another 0.5 g fraction of acetate-nitrate (11) (R=NO<sub>2</sub>) is isolated.

**5,5'-diacetyloxy-2,2'-dithiodiisosorbide (R=COCH<sub>3</sub>) (14)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.16-5.02 (2H, cs, 2CHOCO), 4.85-4.76 (2H, cs, 2CH-O-C), 4.63-4.56 (2H, cs, 2CHOC), 4.17-4.05 (2H, cs, 2H-CH), 4.00-3.74 (6H, cs, 6 H-CH), 3.56-3.48 (2H, cs, 2CHS), 2.09 (6H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.27 (2CO), 87.73 (2CHCHS), 80.76 (2CHCHO), 73.79 (2CHO), 72.66 (2CH<sub>2</sub>CHS), 70.46 (2CH<sub>2</sub>CHO), 54.42 (2CHS), 20.63 (2CH<sub>3</sub>).

**2-(5'-Acetyloxyisosorbidyl-2'-dithio)-isosorbide 5-mononitrate (R=NO<sub>2</sub>) (11)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.37-5.28 (1H, cs, CHONO<sub>2</sub>), 5.18-5.06 (1H, cs, CHOCO), 5.02-4.94 (1H, cs, CHOC), 4.87-4.78 (1H, cs, CHOC), 4.64-4.56 (2H, cs, 2 CHOC), 4.18-3.75 (8H, cs, 4CH<sub>2</sub>), 3.59-3.50 (2H, cs, 2 CHS), 2.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.29 (CO), 88.25 (CH), 87.43 (CH), 81.58 (CH), 81.16 (CH), 80.79 (CH), 73.80 (CH), 72.78 (CH<sub>2</sub>), 72.66 (CH<sub>2</sub>), 70.51 (CH<sub>2</sub>), 69.32 (CH<sub>2</sub>), 54.42 (CHS), 53.72 (CHS), 20.65 (CH<sub>3</sub>).

**Mass spectrometry:**

Chemical ionization (NH<sub>3</sub>): 410 (M+1)<sup>+</sup>, 427 (M+18)<sup>+</sup>.

**Tests for vasorelaxation**

The method used in the assays is substantially the same as described in following references:

\* Furchgot, R.F., "Methods in nitric oxide research"; Feelisch & Stamler, eds., John Wiley & Sons, Chichester, England, pp 567-581.

\* Trongvanbichnam K., et al., Jpn. J. Pharmacol. 71 (1996); 167-173.

\* Salas, E., et al., Eur. J. Pharmacol. 258 (1994); 47-55.

The different compounds are tested at 5 different concentrations, at a concentration range from 0.0001 to 10 mM, using from 6 to 9 arterial rings for each compound. The obtained results are compared to those from the isosorbide 5-mononitrate, which is used as reference product.

The results are shown in table 1 below and are provided as  $EC_{50}$  (effective concentration 50), which is the concentration of each of the tested compounds yielding a vasodilatation equal to 50% of the maximum tone at which the artery ring has been contracted with 1  $\mu$ M of Phenylephrine.

| Table 1.- Test of vasorelaxation |                                |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Compound                         | $EC_{50}$ mM (mean $\pm$ s.d.) |
| Isosorbide 5-mononitrate         | 0.92 $\pm$ 0.2                 |
| (1)                              | 0.041 $\pm$ 0.006              |
| (2)                              | 0.0053 $\pm$ 0.001             |
| (3)                              | 0.043 $\pm$ 0.006              |
| (4)                              | 0.338 $\pm$ 0.01               |
| (6)                              | 0.0012 $\pm$ 0.0001            |
| (7)                              | 0.05 $\pm$ 0.009               |
| (9)                              | 0.024 $\pm$ 0.005              |
| (12)                             | 0.023 $\pm$ 0.010              |

As it can be seen from the table, all the compounds tested are more potent as vasorelaxants than the reference product.

**In vitro test of the inhibition of the platelet aggregation**

The method used in the assays is substantially the same as described in following reference:

\* Salas, E., et al., Br. J. Pharmacol. 112 (1994); 1071-1076.

The compounds are tested at four different concentrations, using platelet rich plasma from not less than 6 different healthy human donors. The results obtained are compared to those from 5-isosorbide mononitrate, which is used as reference product.

The results are shown in table 2 and are expressed as  $IC_{50}$  (inhibitory concentration 50), which is the concentration of each of the tested compounds yielding an inhibition equal to 50% of the aggregation obtained with a submaximal concentration (1-4  $\mu$ M) of ADP (a submaximal concentration of ADP is the minimal amount of ADP which produces the maximal aggregation).

| Table 2.- Test of inhibition of the aggregation of the platelets (Human Platelet Rich Plasma) |                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Compound                                                                                      | $IC_{50}$ mM (mean $\pm$ s.d.) |
| Isosorbide 5-mononitrate                                                                      | $2.68 \pm 0.33$                |
| (1)                                                                                           | $0.11 \pm 0.01$                |
| (2)                                                                                           | $0.01 \pm 0.007$               |
| (3)                                                                                           | $0.41 \pm 0.09$                |
| (4)                                                                                           | $1.00 \pm 0.01$                |
| (4bis)                                                                                        | $0.85 \pm 0.15$                |
| (6)                                                                                           | $0.0019 \pm 0.0005$            |
| (7)                                                                                           | $0.58 \pm 0.021$               |
| (12)                                                                                          | $0.089 \pm 0.01$               |

As can be seen from table 2, all the compound tested have a potent inhibitory activity on aggregation of the platelets, that is superior to that of the reference compound.

#### **Inhibition of human monocyte and platelet adhesion to human endothelial cells**

The methods used in the assays to determine the effect of the compounds on platelet and monocyte adhesion to human endothelial cells are substantially the same as described in the following references:

Del Maschio A. et al., J Cell Biol 1996 ; 135 : 497-510  
Bombeli T. et al., Blood 1999; 93 : 3831-3838  
Colomé C. et al; Atherosclerosis 2000; 149: 295-302; and  
Martin-Satue M. et al; British Journal of Cancer 1999; 80; 1169-1174

The adhesion of the U937-monocyte cells to confluent human microvasculature endothelial cells (HMEC-1) activated by means of TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) and the platelets to human umbilical endothelial cells (HUVEC) were the methods used to determine the inhibitory effect of compounds on cellular adhesion. The adhesion of monocytes previously labeled with calcein-AM (Molecular Probes) to HMEC-1 activated by TNF- $\alpha$ , was assessed by determination of the associated-cell fluorescence. The adhesion of washed human platelets previously labeled with MoAb against CD36-FITC to activated-HUVEC (50  $\mu$ g/ml of LDL minimally modified, LDLmm) was determined by Laser Scanning Cytometry (LSC, Olympus) determining the associated-cell fluorescence. Results are expressed as the percentage of inhibition respect to control (adhesion of the cells in the absence of compounds). Table 3 shows the effect of compounds on U937 adhesion to activated-HMEC-1. Table 4 shows the effect of compounds on platelet adhesion to activated HUVEC.

Table 3

| Inhibition of U937 monocyte adhesion to activated HMEC-1 human endothelial cells |                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Compound                                                                         | % of inhibition to control<br>(mean $\pm$ s.e.m.) |
| (1)                                                                              | 30 $\pm$ 8                                        |
| (12)                                                                             | 15 $\pm$ 2                                        |

Table 4

| Inhibition of platelet adhesion to HUVEC activated by LDLmm (50 $\mu$ g/ml) |                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Compound                                                                    | % of inhibition to control<br>(mean $\pm$ s.e.m.) |
| (12)                                                                        | 87.5% $\pm$ 5.1%                                  |

#### Inhibition of LDL transcytosis in human microvascular endothelial cells

The method used in the assays to determine the effect of the compounds on LDL transcytosis in human microvascular endothelial cells is substantially the same as described in Colomé C. et al; Atherosclerosis 2000; 149: 295-302. This test allows a prediction on the anti-atherosclerotic potential of the compounds, since the accumulation of LDL in the vascular wall as a consequence of a vascular endothelial cell active transport is one of the first steps in the development of atherosclerosis.

The method used in the assays to isolate LDL particles from fresh human plasma and the labelling with Dil is substantially the same as described in Pedreño J. et al.,

Atherosclerosis 2001; 155: 99-112, and Stephan Z.F. and Yuracheck E.C. J. Lipid Res. 1993; 34:325-330

Activated (100  $\mu$ M histamine) and non activated HMEC-1 were cultivated in the upper well of inserted of coculture until to reach confluence (Falcon HTS FluorBloK). Then, LDL-Dil (up to 200  $\mu$ g/ml) was added and cells were incubated for 2 h in the presence and absence of compounds. After these two hours, transcytosis of LDL-Dil particles through endothelial cells was assessed by determination of the presence of fluorescence in the lower well of insert of coculture. Results are expressed as percentage of inhibition respect to control (in the absence of compounds). Table 5 shows the effect of the compounds on the LDL-Dil transcytosis through HMEC-1.

Table 5

| Inhibition of LDL transcytosis in human microvascular endothelial cells (% of inhibition to control (mean $\pm$ s.e.m.)) |               |                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------|
| Compound                                                                                                                 | Resting cells | Stimulated cells |
| (1)                                                                                                                      | 58 $\pm$ 15   | 122 $\pm$ 8      |
| (12)                                                                                                                     | 51 $\pm$ 19   | 80 $\pm$ 12      |

#### Inhibition of LDL oxidation

The method used in the assays to determine the effect of the compounds on LDL oxidation is substantially the same as described in the following references:

Spranger T., et al., Chem. Phys. Lipids 1998 ; 91 :39-52

Lynch S.M., et al., Biochim. Biophys. Acta 2000; 1485:11-22

Pedreño J., et al., Thromb. Res. 2000; 99: 51-60.

The method used in the assays to isolate LDL particles from fresh human plasma is substantially the same as described in Pedreño J., et al., *Atherosclerosis* 2001; 155: 99-112.

Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) is currently believed to be a central event in the development of atherosclerotic cardiovascular disease. The exposition of LDL to globin-free haemin (the complex of ferric ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ) with protoporphyrin IX), derived from the haemoglobin in circulating erythrocytes, serves as a physiological source of pro-oxidant  $\text{Fe}^{3+}$  capable to promoting LDL oxidation. The compounds were added in vitro to determine their inhibitory activity on LDL oxidation induced by haemin and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . LDL at a final protein concentration of 0.2 mg/ml was incubated in the presence of 2.5  $\mu\text{M}$  haemin and 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Oxidative modification of LDL particles was assessed by measurement of conjugated dienes. Experimental samples were incubated at 37 °C and the increase in absorbance at 234 nm was automatically recorded every 5 min for at least 5 h. The effect of compounds on the LDL oxidation induced by haemin was tested at 7 different concentrations using LDL preparations from 7 different healthy donors. Table 6 shows the inhibitory activity of the compounds at 10  $\mu\text{M}$  expressed as the percentage of increase of lag phase (time that is required so that the reaction of formation of conjugate dienes begins) with respect to control.

Table 6

| Inhibition of LDL oxidation |                                                                         |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Compound                    | % of increment of lag phase with respect to control (mean $\pm$ s.e.m.) |
| Isosorbide 5-mononitrate    | 0                                                                       |
| (1)                         | 290 $\pm$ 8                                                             |
| (12)                        | 117 $\pm$ 56                                                            |

### **Inhibition of plasma oxidation**

The method used in the assays to determine the effect of compounds on the capacity of oxidation of the plasma is substantially the same as described in Spranger T. et al., Chem Phys Lipids 1998; 91: 39-52.

Lipoprotein oxidation induced in vitro in plasma is expected to represent a relevant model of the lipoprotein oxidation in the arterial wall. Oxidation of plasma lipoproteins was assessed as the capacity of oxidation of heparinized plasma and was measured by spectrophotometry as an increase in absorbance at 234 nm. The compounds were added in vitro to determine their inhibitory activity over the capacity of oxidation of plasma induced by  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ). Heparinized plasma was diluted with phosphate-buffered saline solution (PBS) containing 0.16 M NaCl and the oxidation was started by 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Experimental samples were incubated at 37 °C and the increase in absorbance at 234 nm was automatically recorded every 15 min for at least 12h. The effect of compounds over the capacity of oxidation of plasma induced by  $\text{Cu}^{2+}$  was tested at 7 different concentrations using heparinized plasma from 7 different healthy donors. Table 7 shows the inhibitory activity of the compounds at 10  $\mu\text{M}$  expressed as the percentage of increase of lag phase with respect to control.

Table 7

| Inhibition of plasma oxidation |                                                                         |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Compound                       | % of increment of lag phase with respect to control (mean $\pm$ s.e.m.) |
| (1)                            | 245 $\pm$ 26                                                            |
| (2)                            | 7 $\pm$ 1                                                               |
| (12)                           | 200 $\pm$ 10                                                            |
| Isosorbide 5-mononitrate       | 0                                                                       |

**Preventive and curative effect on atherogenesis in rabbits fed on high cholesterol diet**

The method used is substantially the same as described in Shore B, Shore V., In: Day CE (ed) Atherosclerosis Drug Discovery, Plenum Press, New York and London, pp 123-141, 1976.

Twenty-one male New Zealand White rabbits (10 weeks old at the beginning of the protocol) were maintained under standardized conditions (22 °C, 40% to 60% humidity) with regular day/night cycle and free access to water. The animals were randomly assigned to 1 of 3 groups. Group 1 (n=5) received standard maintenance diet for 75 days; group 2 (n=16) received the same diet but supplemented with 1% (wt/wt) cholesterol for 45 days. At the end of this period, group 2 was classified into two randomly groups. The treated-group (n=9) receiving for additional 30 days 1.9 mg/kg/day of compound 12 (maintaining the 1% cholesterol in its diet), and the non-treated group (n=7) receiving a diet with a 1% of cholesterol for additional 30 days.

Study variables included triglycerides and total cholesterol. Animals were euthanized on day 75 after the start of the protocol with pentobarbital i.v. The entire aorta was removed

1 or 2 cm into the iliac arteries and fixed in buffer phosphate 0.1 M (pH 7.4) with glutaraldehyde (4%). Macroscopic and microscopic analyses of the samples were performed in a blinded fashion. Aortas were dissected and stained with Red Oil. Adventitial fat was removed, and aortas were opened longitudinally, immersed in Red Oil solution for overnight, washed in propylenglycol and fixed onto a flat surface. Images of the aortas were taken with a standard camera. Subsequently, 3 sections were taken from the aortic arch area, the thoracic aorta, and at the abdominal aorta (renal orifices). Sections were paraffin-embedded, were cut with a microtome Ultracut (Spain) and stained conventionally with hematosiline eosin. Images of aortas stained with Red Oil and hematosiline eosin were taken with a standard camera. Images were imported into Photoshop (Adobe) with a AGFA slide scanner. By means of the procedure previously described by Lillie RD (Lillie, R.D., 1994, Stain Technology, vol. 19, pp 55) the surface of injury in all the aorta and the thickness of the intima in histological samples was determined. The surface or area of the atherosclerotic injury (evaluated from the stained aortas with the Red Oil) are determined by the number of pixels of the image turned to  $\text{mm}^2$ . The intima thickness of the arteria (evaluated from the stained histological samples with Haematosiline-Eosin) was quantified in mm in a similar way to that described the surface or area of the atherosclerotic injury. For it, the sections that contained injuries of fatty striae were selected and the thickness of the intima was determined (from the arterial media to endothelium). The mean thickness of the lesion area was assessed in representative sections per aortic quadrant, and the statistical mean was calculated. The fasting plasmatic total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides levels are shown in table 8. The statistical

examination (Student t) has revealed no significant difference between the medicated group and the control group (the group not medicated but with high cholesterol diet) in regard to plasma lipid.

Table 8

| Plasmatic lipid profile [mg/dl] (mean $\pm$ s.e.m.) |              |                  |                                        |                |
|-----------------------------------------------------|--------------|------------------|----------------------------------------|----------------|
|                                                     | Control      |                  | Treated with the compound example (12) |                |
|                                                     | Basal        | End              | Basal                                  | End            |
| Total cholesterol                                   | 42 $\pm$ 4.4 | 1073.9 $\pm$ 4.9 | 33.3 $\pm$ 4.1                         | 1461 $\pm$ 147 |
| Triglycerides                                       | 185 $\pm$ 50 | 312.7 $\pm$ 130  | 121 $\pm$ 34                           | 347 $\pm$ 82   |

The area rate covered by the atherosclerotic lesions are shown in table 9.

Table 9

| Atherosclerotic lesions                |                                                                 |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Group                                  | Area percent of atherosclerotic lesions (%) (mean $\pm$ s.e.m.) |
| Control                                | 62 $\pm$ 6                                                      |
| Treated with the compound example (12) | 15 $\pm$ 3                                                      |

The thickness of intimal layer of the aorta is shown in table 10.

Table 10

| Thickness of the intimal layer of the aorta |                                  |
|---------------------------------------------|----------------------------------|
| Group                                       | Thickness mm (mean $\pm$ s.e.m.) |
| Control                                     | 0.323 $\pm$ 0.013                |
| Treated with the compound example (12)      | 0.096 $\pm$ 0.009                |

In table 8 it is shown that there was no difference in plasma lipids between the control and the medicated group thereby demonstrating that the compound (12) did not influence upon lipid metabolism. As seen in table 9 and in table 10, both area percent of the atherosclerotic lesions as the intimal thickness were significantly reduced in the group treated with the compound (12) in comparison with the control group.

#### **Preventive and curative effect on atherogenesis in apo E-deficient mouse**

The preventive and therapeutic effect of the present compounds on atherosclerosis will be also illustrated by way of the following example.

Preventing and curative effect on atherogenesis of the compounds it is investigated in apo E-deficient mouse fed on standard diet model. Male and female apo E-deficient mouse (OLA129X C57/BL6J) of three months old were fed on standard diet. The control group included 8 males and 7 females mouse, while the treated group consist of 8 males and 7 females mouse. All the animals had similar cholesterol and body weight at the beginning of the experiment. Both the control and the treated groups were studied for 12 weeks. The treated group received 5 mg/Kg/day of the compound (12).

Plasma lipid parameters (total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides) and oxidative stress (measured as 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  levels) were measured at predetermined intervals. After completion of the administration period, the thoracic aorta was isolated and stained to determine the area of the atherosclerotic injuries deposited in the internal wall of the blood vessel in according with the Red Oil method (Lillie, R.D., 1994, Stain Technology, vol. 19, pp 55).

The fasting plasmatic levels of total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$  levels are shown in table 11.

Table 11

| Plasmatic lipids and oxidative stress parameters (mean $\pm$ s.d.) |                |                            |               |                                |
|--------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------|---------------|--------------------------------|
|                                                                    | Male           |                            | Female        |                                |
|                                                                    | Control        | Treated with compound (12) | Control       | Treated with the compound (12) |
| Total cholesterol (mmol.L-1)                                       | 14.3 $\pm$ 2   | 18 $\pm$ 3                 | 9.5 $\pm$ 2   | 11.3 $\pm$ 1.5                 |
| HDL-cholesterol (mmol.L-1)                                         | 0.5 $\pm$ 0.15 | 0.47 $\pm$ 0.15            | 0.4 $\pm$ 0.1 | 0.48 $\pm$ 0.13                |
| Triglycerides (mmol.L-1)                                           | 2.6 $\pm$ 0.6  | 1.5 $\pm$ 0.4              | 1.9 $\pm$ 0.6 | 1.3 $\pm$ 0.2                  |
| 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$ (pg.mL-1)                          | 273 $\pm$ 19   | 101 $\pm$ 13               | 182 $\pm$ 19  | 99 $\pm$ 7                     |

The area rate covered by the atherosclerotic lesions on the inner wall of the blood vessel and the area covered with macrophages are shown in table 12.

Table 12

| Group                                  | Area covered with macrophages [ $\mu\text{m}^2$ ] (mean $\pm$ s.e.m.) | Area of atherosclerotic lesions [ $\mu\text{m}^2$ ] (mean $\pm$ s.e.m.) |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Control                                | 80 $\pm$ 27                                                           | 60 $\pm$ 8                                                              |
| Treated with the compound example (12) | 55 $\pm$ 19                                                           | 45 $\pm$ 9                                                              |

In table 11 it is shown that compound (12) is able to decrease the levels of triglycerides in plasma as well as the oxidative stress of those animals. In table 12 it is shown how the compound (12) reduces both the area of the atherosclerotic lesions and the area covered with macrophages.

#### **In vivo antithrombotic effect**

The method used is substantially the same as described by Kurz (Kurz K.D., et al., Thromb. Res. 1990, 60:269-280) and modified by Feuerstein (Feuerstein G.Z., et al., Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 2554-25562).

Rats received a single oral dose of 100 mg/Kg of the compounds.

Forty-five minutes after dosing rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and they were placed later dorsally on a heated (37 °C) surgical board.

The left carotid artery was isolated and a Parafilm M sheet (7 x 20 mm, American National Can) was placed under it. An electromagnetic sounding of flow (Transonic Systems Inc.) was placed on the artery to measure blood flow.

Sixty minutes after product administration, a paper patch saturated with FeCl<sub>3</sub> solution (70%) was placed (and not removed for the whole duration of the experiment) on the left carotid artery downstream from the sounding of flow to initiate thrombosis. The blood flow was controlled during the 60 min later to the application of the patch in the artery.

The vessel was considered totally occluded by the thrombus formed when no blood flow was detected (0.0 ml/min). In this model, thrombus formation usually takes place within 15 to 20 minutes in non-treated animals. An animal was considered as fully protected by treatment if a thrombus did not occlude the vessel during the period of study (60 min after FeCl<sub>3</sub> continue patch application).

The results are shown in table 13 and are expressed as percentage of animals fully protected by the treatment.

Table 13

| In vivo anti-thrombotic activity |                              |
|----------------------------------|------------------------------|
| Compound                         | % of animals fully protected |
| 1                                | 100                          |
| 3                                | 100                          |
| 4                                | 80                           |
| 12                               | 71                           |

As it can be observed in table 13, all the compound tested have a potent in vivo anti-thrombotic activity.

#### **In vivo synergistic antithrombotic effect**

The method used is substantially the same as described by Kurz (Kurz K.D., et al., Thromb. Res. 1990, 60: 269-280) and modified by Feuerstein (Feuerstein G.Z., et al., Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 2554-25562)...

Rats received a single oral dose of one or the combination of two compounds as described in table 14. The doses of the compounds used did not modify the blood pressure nor the heart rate of the animals.

Forty-five minutes after dosing administration, rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and they were placed later dorsally on a heated (37 °C) surgical board.

The left carotid artery was isolated and a Parafilm M sheet (7 x 20 mm, American National Can) was placed under it. An electromagnetic sounding of flow (Transonic Systems Inc.) was placed on the artery to measure blood flow.

Sixty minutes after product administration, a paper patch saturated with FeCl<sub>3</sub> solution (70%) was placed (and not removed for the whole duration of the experiment) on the left carotid artery downstream from the sounding of flow to initiate thrombosis. The blood flow was controlled during the 60 min later to the application of the patch in the artery.

The vessel was considered totally occluded by the thrombus formed when no blood flow was detected (0.0 ml/min). In this model, occlusive thrombus formation usually takes place

within 15 to 20 minutes in non-treated animals. An animal was considered as fully protected by treatment if a thrombus did not occlude the vessel during the period of study (60 min after FeCl<sub>3</sub> continue patch application).

The fractional product concept was used to identify synergy between the compounds. In accordance with this concept, if we consider the full protection of the animal as:

$$\text{Fractional inhibition} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

where A is the rate of animals with thrombotic occlusion in treated group; and B is the rate of animals with thrombotic occlusion in the control group.

For two drugs that act of independent way:

$$\text{Fractional inhibition} = \left[1 - \left(\frac{A_1}{B} \times \frac{A_2}{B}\right)\right] \times 100$$

where A<sub>1</sub> is the rate of animals with thrombotic occlusion in the treatment group A<sub>1</sub>; A<sub>2</sub> is the rate of animals with thrombotic occlusion in the treatment group A<sub>2</sub>; and B is the rate of animals with thrombotic occlusion in the control group

If the protection obtained with the combination of the drugs is higher than the fractional inhibition for two compounds acting independently then synergism is considered to occur.

The results are shown in table 14 and are expressed as rate of animals with thrombotic occlusion in each group.

Table 14

| Group                                                                                                           | Rate of animals with thrombotic occlusion (% of animals protected) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Control                                                                                                         | 1 (0%)                                                             |
| Acetyl salicylic acid (100 mg/Kg/day, oral, for 3 days)                                                         | 0.50 (50%)                                                         |
| Compound 12 (22.3 mg/Kg, oral, acute the day of study)                                                          | 0.5 (50%)                                                          |
| Acetyl salicylic acid (100 mg/Kg/day, oral for 3 days) + compound 12 (22.3 mg/Kg, oral, acute the day of study) | 0 (100%)                                                           |
| Clopidogrel (1.5 mg/Kg/day, oral for 3 days)                                                                    | 0.50 (50%)                                                         |
| Clopidogrel (1.5 mg/Kg/day, oral for 3 days) + compound 12 (22.3 mg/Kg, oral, acute the day of study)           | 0.17 (83%)                                                         |

Fractional inhibition (acetyl salicylic acid + compound 12) =

$$\left[1 - \left(\frac{0.5}{1} \times \frac{0.5}{1}\right)\right] \times 100 = 75\%$$

As the percentage of animals protected with the combination of the two drugs (acetyl salicylic acid + compound 12) is higher than 75% (it is 100%) there is a synergism between the two products.

Fractional inhibition (clopidogrel + compound (12)) =

$$\left[1 - \left(\frac{0.5}{1} \times \frac{0.5}{1}\right)\right] \times 100 = 75\%$$

As the percentage of animals protected with the combination of the two drugs (clopidogrel + compound 12) is higher than 75% (it is 83%) there is a synergism between the two products.

**In vitro protection against the cytotoxicity induced by oxygen radicals using the XTT-based method in HUVEC cells.**

The method used is substantially the same as described by Caveda L., et al. (J. Clin. Invest. 1996; 98: 886-893).

For the determination of the capacity to inhibit the cytotoxicity induced by oxygen radicals Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were used. HUVEC were isolated and cultured in M199 and 20% FCS (Fetal Calf Serum).

Test XTT assay is based on hydrolysis by the metabolically active cells of the salt of tetrazolium XTT to form an orange product, the formazan dye formed is soluble and is directly quantified using a spectrophotometer.

HUVEC cells were cultivated until a sub-confluence status in a 96 well tissue culture plate and pre-treated with 50  $\mu$ M of the compound for one hour. After that, cells were treated with 800  $\mu$ M of peroxynitrite for an overnight.

After overnight incubation cells were incubated with the yellow XTT solution (final concentration 0.3 mg/ml) for 4 hours. After this incubation period, orange formazan solution was formed, which was spectrophotometrically quantified using an ELISA plate reader at 450 nm

The results are shown in table 15 and are expressed as percentage of death cells.

Table 15

| In vitro cytoprotective activity |                  |
|----------------------------------|------------------|
| Compound                         | % of death cells |
| 1                                | 80               |
| 2                                | 80               |
| 3                                | 80               |
| 12                               | 50               |

As it can be observed in table 15, all the compound tested have a cell protective activity ( $P < 0.05$ ) against the cell damage induced by oxygen radicals.

**In vivo protection against ischemia-reperfusion damage in the heart.**

Experiments were performed according to the model previously described by Hirata Y et al (Journal of Cardiovascular Pharmacology. 1998, 31: 322-326)

After a food fasting period of 6 hours, animals were divided into groups of at least 8 animals each. Doses of products were given by oral sounding 1 h before the ischemia induction. Animals were anaesthetized with pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and the standard limb lead II electrocardiogram was recorded to detect the S-wave depression. 0.3 U/kg arginine-vasopressin (AVP) (Sigma Chemicals, St Louis, Mo, USA) was injected into the carotid artery to induce vasoconstriction of small coronary arteries and increase in coronary resistance. In all the groups received AVP 60 min after the test drug. In all groups, after AVP injection of 10 minutes ECG recording was performed.

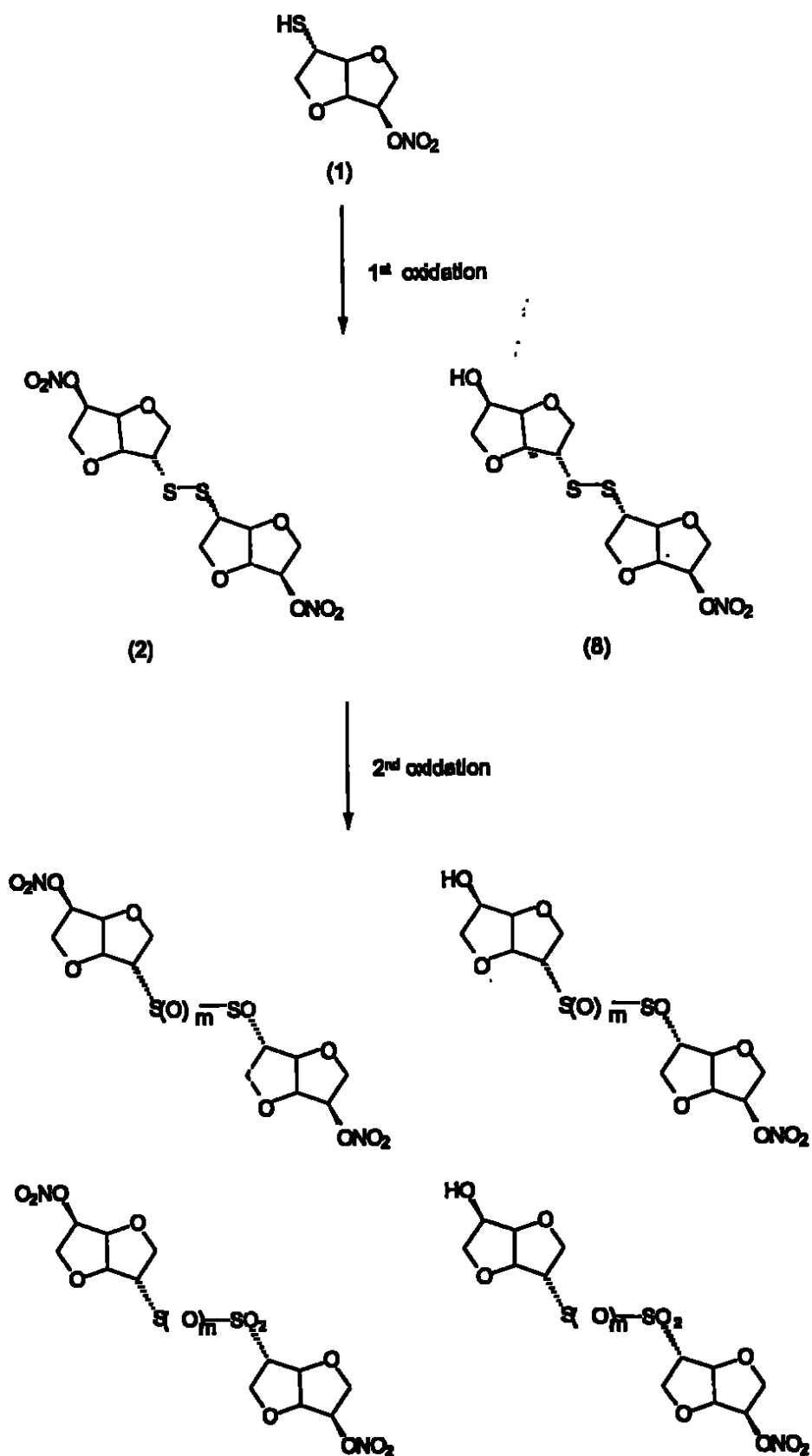
The results are shown in table 16 and are expressed as S-wave decrements ( $\mu$ volts).

Table 16

| Compound | dose (mg/kg, p.o.) | S-wave decrement ( $\mu$ V) | Protection of S-wave decrement (%) |
|----------|--------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Vehicle  | -                  | 46.2 $\pm$ 4.9              | -                                  |
| 12       | 20                 | 22.6 $\pm$ 5.9              | 52                                 |
| 12       | 100                | 8.6 $\pm$ 2.8               | 81                                 |
| 9        | 20                 | 16.5 $\pm$ 9.8              | 64                                 |
| 9        | 100                | 9.7 $\pm$ 4.6               | 79                                 |
| 4        | 20                 | 36.5 $\pm$ 11.6             | 21                                 |
| 4        | 100                | 5.9 $\pm$ 3.9               | 87                                 |

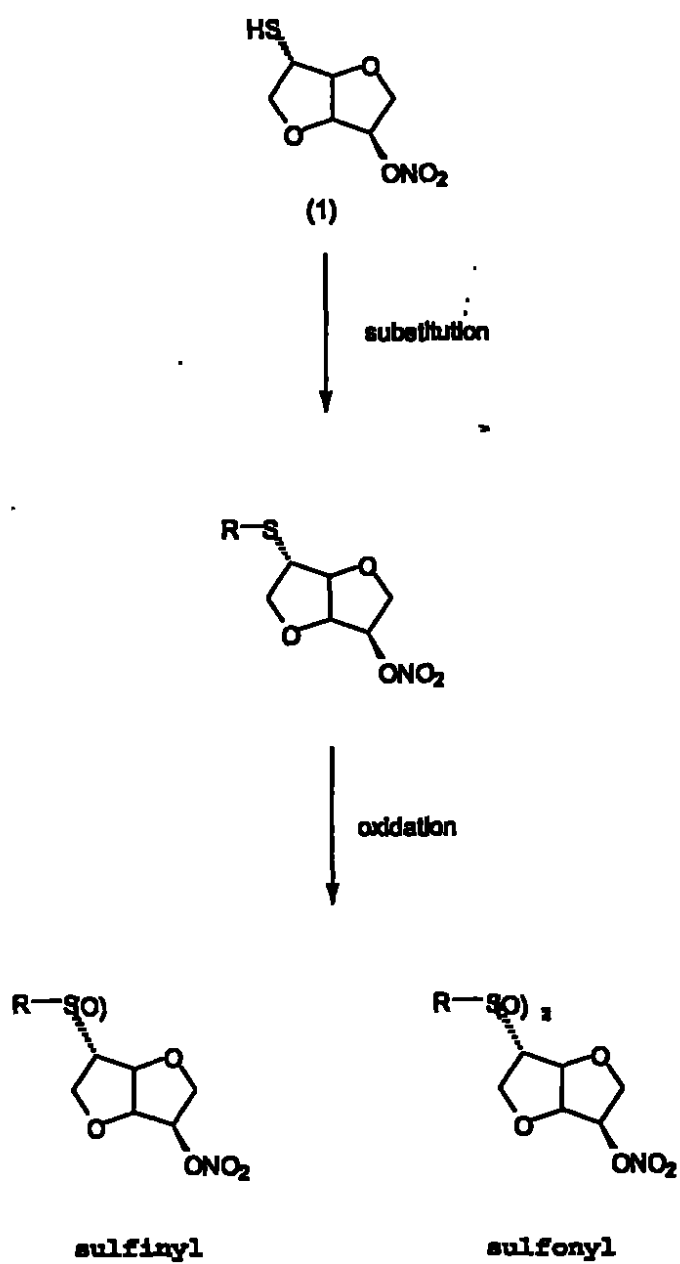
As it can be observed in table 16, all the compounds tested protect against ischemia-reperfusion damage in the heart.

Scheme 1:



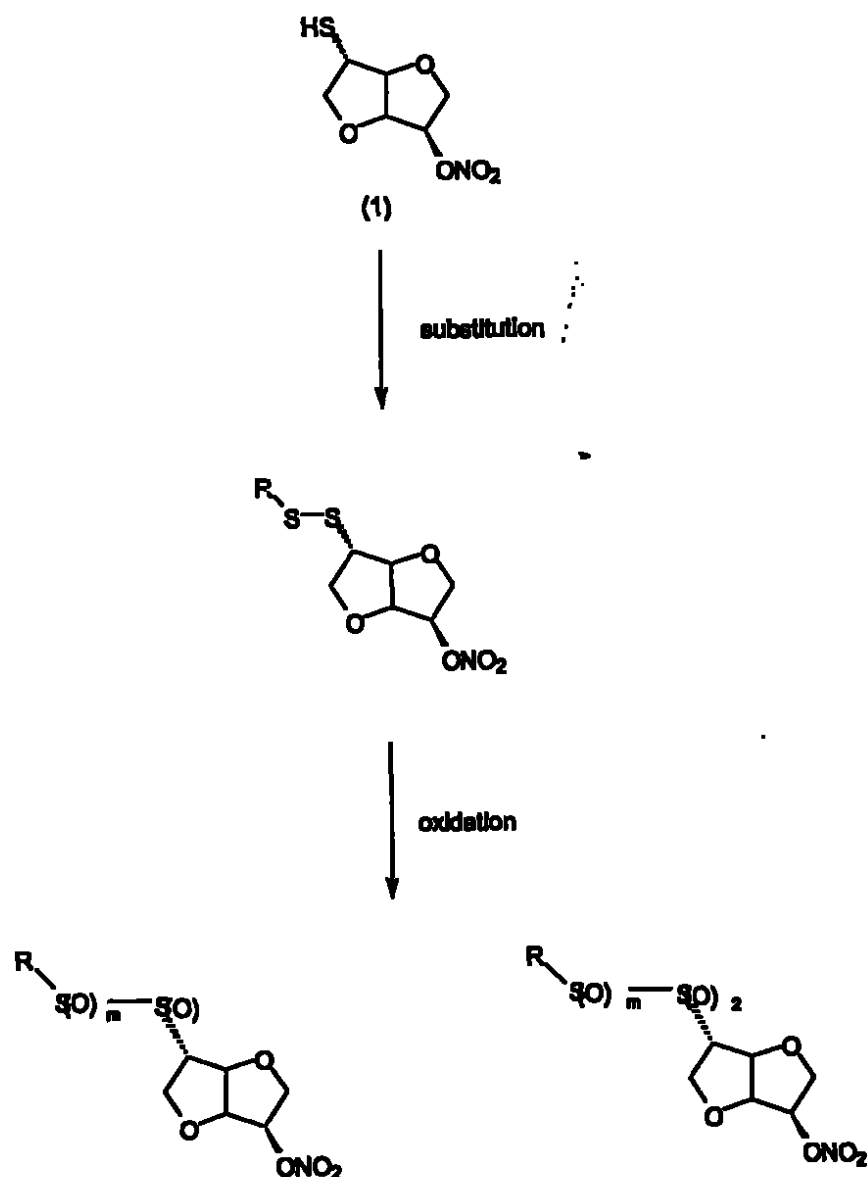
64

Scheme 2:



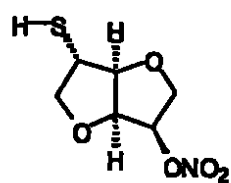
65

Scheme 3:



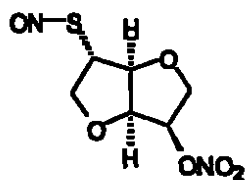
66

Scheme 4:



(1)

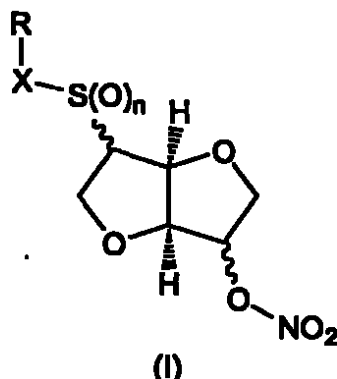
nitrosation



(5)

## CLAIMS

1. A compound according to formula (I) or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



wherein:

n is an integer of 0, 1, or 2,

X represents  $-\text{S(O)}_m-$ ,  $-(\text{C=O})-$  or a single bond, wherein m is an integer of 0, 1, or 2, with the proviso that when X represents  $-(\text{C=O})-$  then n is 0,

R represents hydrogen or is a residue  $\text{R}^a$ , which residue  $\text{R}^a$  is selected from the group consisting of:

$\text{C}_{1-6}$  alkyl;

$\text{C}_{2-6}$  alkenyl;

$\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl;

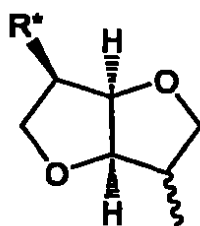
$\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by O, S, NH or  $\text{NCH}_3$ ;

$\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl;

$\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by O, S, NH or  $\text{NCH}_3$ ;

phenyl;

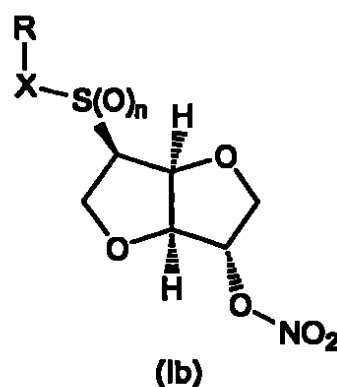
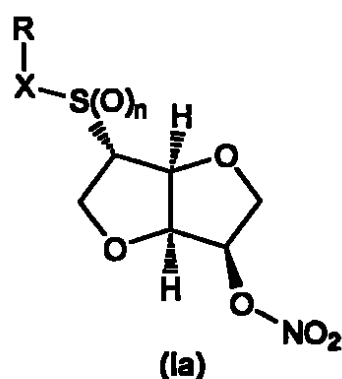
pyridyl;  
 thiophenyl;  
 nitrosyl;  
 S-cysteinylyl;  
 S-glutathionyl; and



wherein R\* is selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen;

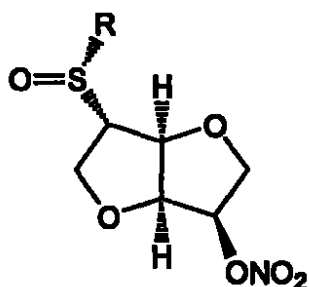
wherein R<sup>a</sup> optionally is substituted by one to three groups independently selected from C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

provided that when RXS(O)<sub>n</sub>- and -ONO<sub>2</sub> are trans to each other with respect to the ring plane as depicted in formulae (Ia) and (Ib):

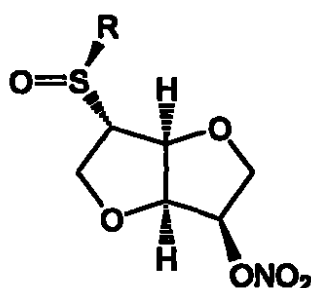


then  $\text{RXS(O)}_n-$  does not represent  $\text{Z}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-$ , wherein Z is an  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  alkyl group, aryl group, or an aralkyl group.

2. A compound according to claim 1, wherein either one or both of m and n is 0.
3. A compound according to any one of claims 1 to 2, wherein X represents a single bond or  $-\text{S}-$ .
4. A compound according to any one of claims 1 to 3, wherein R represents hydrogen,  $\text{C}_1$ -6 alkyl,  $\text{C}_2$ -6 alkenyl,  $\text{C}_3$ -8 cycloalkyl,  $\text{C}_4$ -8 cycloalkenyl,  $(\text{C}_1$ -6 alkyl) $\text{C}_3$ -8 cycloalkyl,  $(\text{C}_1$ -6 alkyl) $\text{C}_4$ -8 cycloalkenyl, phenyl,  $(\text{C}_1$ -6 alkyl)phenyl, 5-acetyloxyisosorbide-2-yl, 5-hydroxyisosorbide-2-yl or 5-nitratoisosorbide-2-yl.
5. A compound according to any one of claims 1 to 4, wherein R is  $\text{C}_1$ -6 alkyl.
6. A compound according to any one of claims 1 to 5, which is a compound according to formula (Ic) or (Id):



(Ic)



(Id)

7. A compound according to any one of claims 1 to 6, which is selected from:

2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
5,5'-dinitrate-2,2'-dithiodiisosorbide,

2-methylthioisosorbide 5-mononitrate,  
2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate,  
2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate  
2-methylsulfinylisosorbide 5-mononitrate,  
2-methylsulfonylisosorbide 5-mononitrate,  
S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
2-(tetrahydropyran-2-yl-thio)isosorbide 5-mononitrate,  
2-(isosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate,  
and  
2-(5'-acetyloxyisosorbidyl-2'-dithio)isosorbide  
5-mononitrate.

8. A pharmaceutical composition comprising as active ingredient(s) at least one compound according to any one of claims 1 to 7, optionally together with one or more physiologically acceptable excipient(s), activator(s), chelating agent(s) and/or stabilizer(s).

9. The pharmaceutical composition according to claim 8, which further comprises a thrombolytic agent, preferably a plasminogen activator, urokinase, streptokinase, alteplase or anistreplase.

10. The pharmaceutical composition according to claims 8 or 9, which further comprises an anticoagulant agent, preferably heparin, dicoumarol, acenocoumarol, enoxaparine or pentosan polysulfate.

11. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 10, which further comprises an antithrombotic agent, preferably acetylsalicylic acid, dipyridamole, ticlopidine, clopidogrel, triflusal, pentosan polysulfate or abciximab.

12. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 11, which further comprises an immunoglobulin or

---

a fragment thereof having a specificity for glycoprotein IIb/IIIa.

13. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 12, which further comprises an hypolipemiant agent, preferably simvastatin, lovastatin, atorvastatin, pravastatin, fluvastatin, eptastatin, lifibrol, acifran, acitemate, glunicate and rosuvastatin.

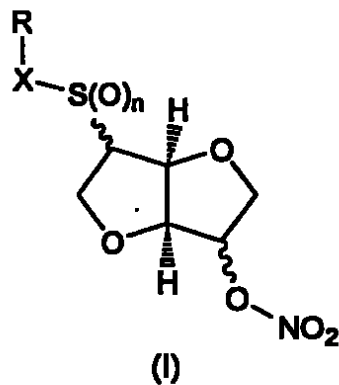
14. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 13, which further comprises an antioxidant/free radical scavenger agent, preferably nicaraven, ranolazine, emoxipin, glutathione, edaravone, raxofelast, lycopene, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-D-cysteine, a racemic mixture of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-D-cysteine, or carvedilol.

15. The pharmaceutical composition according to any one of the claims 8 to 14 for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, endothelial dysfunctions, vasospasm, cardiac allograft vasculopathy, dysfunctions of the circulatory system, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, pathological conditions where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion.

16. The pharmaceutical composition according to claim 15, wherein the pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis are selected from allergies, stroke, Alzheimer's disease, and ischemic cardiovascular diseases.

17. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 14 for the treatment and/or prevention of dysfunctions of the circulatory system, preferably cardiovascular and/or coronary dysfunctions.

18. Use of at least one compound of formula (I) or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



wherein:

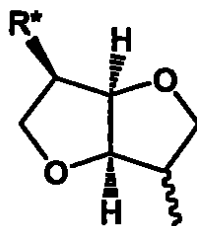
n is an integer of 0, 1, or 2,

X represents  $-S(O)_m-$ ,  $-(C=O)-$  or a single bond, wherein m is an integer of 0, 1, or 2, with the proviso that when X represents  $-(C=O)-$  then n is 0,

R represents hydrogen or is a residue  $R^a$ , which residue  $R^a$  is selected from the group consisting of:

- C<sub>1-6</sub> alkyl;
- C<sub>2-6</sub> alkenyl;
- C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;
- C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;
- C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;
- C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;
- phenyl;
- pyridyl;
- thiophenyl;
- nitrosyl;

S-cysteinylyl;  
S-glutathionyl; and

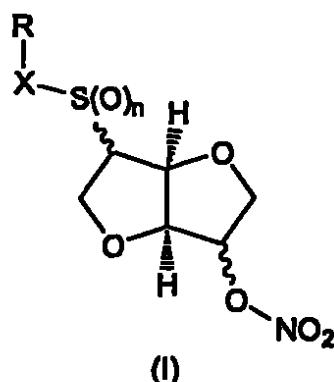


wherein R\* is selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen;

wherein R<sup>a</sup> optionally is substituted by one to three groups independently selected from C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

as active ingredient(s) for the manufacture of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, endothelial dysfunctions, vasospasm, cardiac allograft vasculopathy, dysfunctions of the circulatory system, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, pathological conditions where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion.

19. Use of at least one compound of formula (I):



or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof as active ingredient(s) for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, endothelial dysfunctions, vasospasm, cardiac allograft vasculopathy, dysfunctions of the circulatory system, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, pathological conditions where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion,

comprising administering said compound or a tautomer, pharmaceutically acceptable salt, prodrug or solvate thereof to a patient in need thereof,

wherein:

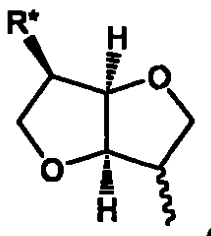
$n$  is an integer of 0, 1, or 2,

$X$  represents  $-\text{S(O)}_m-$ ,  $-(\text{C}=\text{O})-$  or a single bond, wherein  $m$  is an integer of 0, 1, or 2, with the proviso that when  $X$  represents  $-(\text{C}=\text{O})-$  then  $n$  is 0,

and  $R$  represents hydrogen or is a residue  $R^a$ , which residue  $R^a$  is selected from the group consisting of:

$\text{C}_{1-6}$  alkyl;

C<sub>2-6</sub> alkenyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O,  
S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by  
O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
phenyl;  
pyridyl;  
thiophenyl;  
nitrosyl;  
S-cysteinyll; and  
S-glutathionyl; and



wherein R\* is selected from the group consisting of  
hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl,  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and  
halogen;

wherein R<sup>a</sup> optionally is substituted by one to three  
groups independently selected from C<sub>1-6</sub> alkyl,  
C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl,  
acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen.

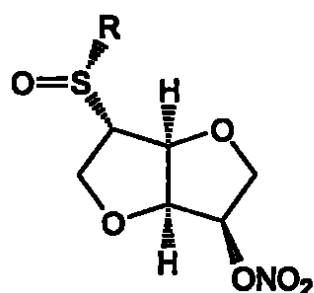
20. The use according to claims 18 or 19, wherein either one  
or both of m and n is 0.

21. The use according to any one of claims 18 to 20, wherein  
X represents a single bond or -S-.

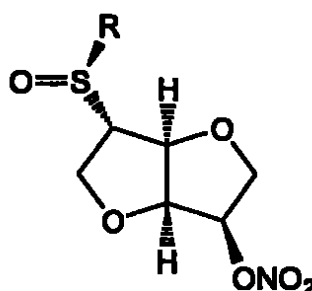
22. The use according to any one of claims 18 to 21, wherein R represents hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, (C<sub>1-6</sub> alkyl)C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, (C<sub>1-6</sub> alkyl)C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, phenyl or (C<sub>1-6</sub> alkyl)phenyl.

23. The use according to any one of claims 18 to 22, wherein R is C<sub>1-6</sub> alkyl.

24. The use according to any one of claims 18 to 23, wherein the compound according to formula (I) is a compound according to formula (Ic) or (Id):



(Ic)



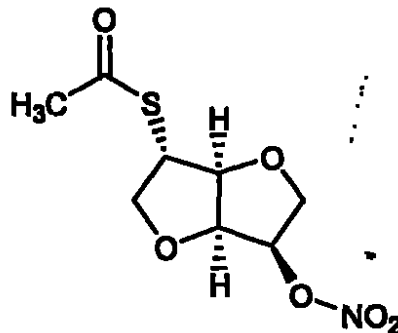
(Id)

25. The use according to any one of claims 18 to 24, wherein the compound of formula (I) is selected from:

2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
 5,5'-dinitrate-2,2'-dithiodiisosorbide,  
 2-methylthioisosorbide 5-mononitrate,  
 2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate,  
 2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate  
 2-methylsulfinylisosorbide 5-mononitrate,  
 2-methylsulfonylisosorbide 5-mononitrate,  
 S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
 2-(tetrahydropyran-2-yl-thio)isosorbide 5-mononitrate,  
 2-(isosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate,  
 and

2-(5'-acetyloxyisosorbidyl-2'-dithio)isosorbide  
5-mononitrate.

26. The use according to claim 18 or 19, wherein the compound is 2-acetylthioisosorbide 5-mononitrate, which is represented by the following formula:



27. The use according to any one of claims 18 to 26, wherein the pharmaceutical composition further comprises a thrombolytic agent, preferably a plasminogen activator, urokinase, streptokinase, alteplase or anistreplase.

28. The use according to any one of claims 18 to 27, wherein the pharmaceutical composition further comprises an anticoagulant agent, preferably heparin, dicoumarol, acenocoumarol, enoxaparine or pentosan polysulfate.

29. The use according to any one of claims 18 to 28, wherein the pharmaceutical composition further comprises an antithrombotic agent, preferably acetylsalicylic acid, dipyridamole, ticlopidine, clopidrogel, triflusal, pentosan polysulfate or abciximab.

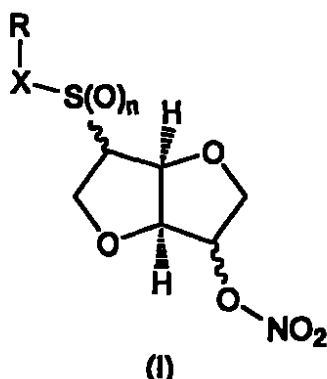
30. The use according to any one of claims 18 to 29, wherein the pharmaceutical composition further comprises an immunoglobulin or a fragment thereof having a specificity for glycoprotein IIb/IIIa.

31. The use according to any one of claims 18 to 30, wherein the pharmaceutical composition further comprises a hypolipemiant agent, preferably simvastatin, lovastatin, atorvastatin, pravastatin, fluvastatin, eptastatin, lifibrol, acifran, acitemate, glunicate or rosuvastatin.

32. The use according to any one of claims 18 to 31, wherein the pharmaceutical composition further comprises an antioxidant/free radical scavenger agent, preferably nicaraven, ranolazine, emoxipin, glutathione, edaravone, raxofelast, lycopene, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-D-cysteine, a racemic mixture of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-D-cysteine, or carvedilol.

33. The use according to any one of claims 18 to 32, wherein the pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis are selected from allergies, stroke, Alzheimer's disease, and ischemic cardiovascular diseases.

34. A process for preparing a compound of formula (I), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



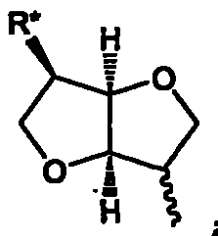
wherein:

n is an integer of 0, 1, or 2,

X represents  $-S(O)_m-$  or a single bond, wherein m is an integer of 0, 1, or 2,

and R represents hydrogen or is a residue  $R^a$ , which residue  $R^a$  is selected from the group consisting of:

C<sub>1-6</sub> alkyl;  
C<sub>2-6</sub> alkenyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
phenyl;  
pyridyl;  
thiophenyl;  
nitrosyl;  
S-cysteinyll;  
S-glutathionyl; and

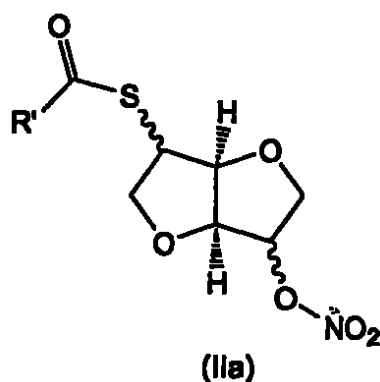


wherein  $R^*$  is selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

wherein  $R^a$  optionally is substituted by one to three groups independently selected from the group consisting of C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

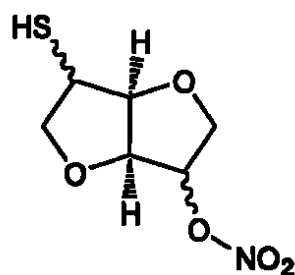
which process comprises conducting the following steps:

- a) effecting the hydrolysis of a compound of formula (IIa):



wherein R' is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, preferably methyl,

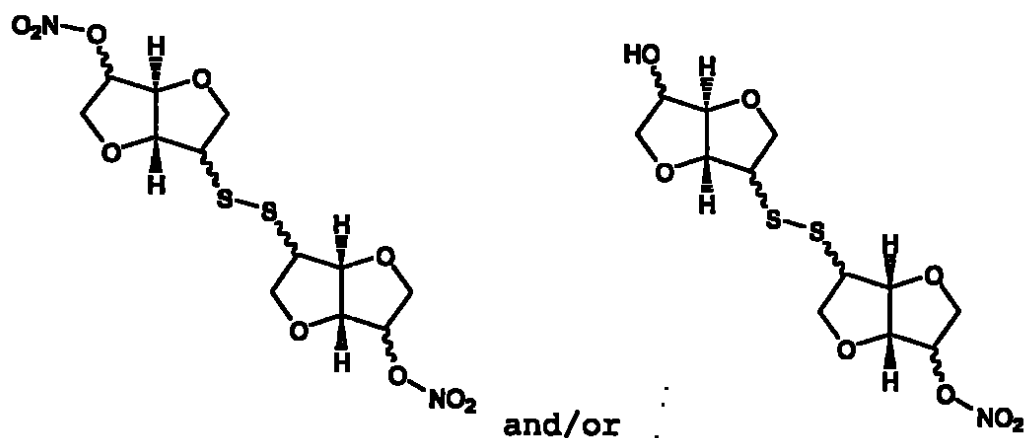
to obtain the following compound:



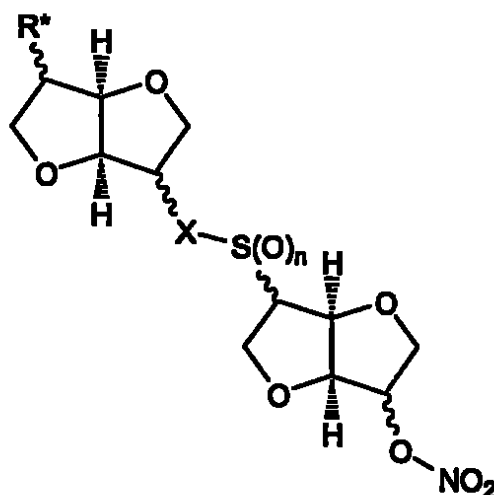
and

- (b) optionally, effecting on the compound prepared according to the step (a):

I. an oxidation reaction to obtain:



optionally followed by a second oxidation to obtain the following compound:



wherein:

$n$  is 1 or 2,

$X$  is  $-S(O)_m-$ , wherein  $m$  is 0, 1 or 2, and

$R^*$  represents hydroxyl or  $ONO_2$ ;

II. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (I), wherein:

$n$  is an integer of 0,

$X$  represents a bond,

and  $R$  does not represent nitrosyl,

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (I), wherein:

n is an integer of 0,

X represents  $-S(O)_m-$ , wherein m is an integer of 0 or 1,

and R does not represent nitrosyl;

III. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (I), wherein:

n is an integer of 0, and

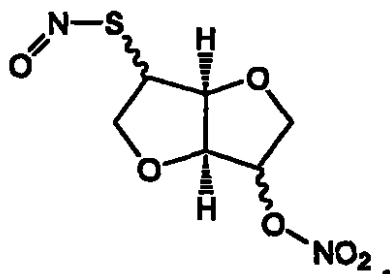
X represents  $-S-$ ;

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (I), wherein:

n is an integer of 1 or 2, and

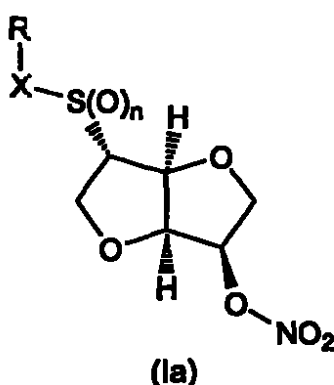
X represents  $-S(O)_m-$ , wherein m is 0, 1 or 2; or

IV. a nitrosation reaction to obtain:



35. A process according to claim 34 for preparing a compound of formula (Ia), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:

83



wherein:

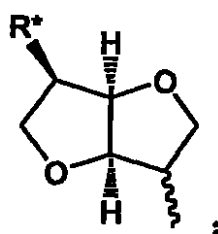
$n$  is an integer of 0, 1, or 2,

$\text{X}$  represents  $-\text{S}(\text{O})_m-$  or a single bond, wherein  $m$  is an integer of 0, 1, or 2,

and  $\text{R}$  represents hydrogen or is a residue  $\text{R}^a$ , which residue  $\text{R}^a$  is selected from the group consisting of:

- $\text{C}_{1-6}$  alkyl;
- $\text{C}_{2-6}$  alkenyl;
- $\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl;
- $\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  or  $\text{NCH}_3$ ;
- $\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl;
- $\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  or  $\text{NCH}_3$ ;
- phenyl;
- pyridyl;
- thiophenyl;
- nitrosyl;
- $\text{S}$ -cysteinyl;
- $\text{S}$ -glutathionyl; and

84

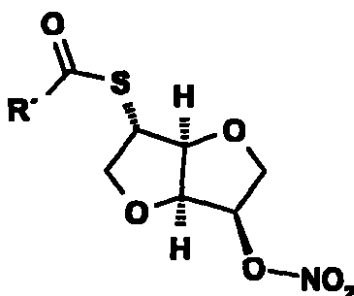


wherein  $R^*$  is selected from the group consisting of hydrogen,  $C_1-6$  alkyl,  $C_2-6$  alkenyl,  $C_3-8$  cycloalkyl,  $C_4-8$  cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl,  $ONO_2$  and halogen,

wherein  $R^a$  optionally is substituted by one to three groups independently selected from the group consisting of  $C_1-6$  alkyl,  $C_2-6$  alkenyl,  $C_3-8$  cycloalkyl,  $C_4-8$  cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl,  $ONO_2$  and halogen,

and wherein said process comprises the following steps:

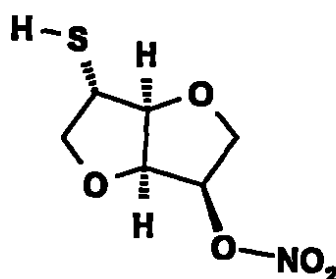
(a) effecting the hydrolysis of a compound of formula (II):



(II)

wherein  $R'$  is  $C_1-C_6$  alkyl, preferably methyl, to obtain 2-thioisosorbide 5-mononitrate (1),

85



(1)

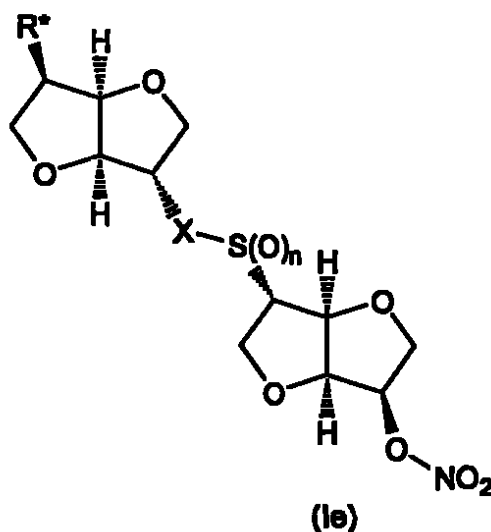
and

(b) optionally, effecting on the compound (1) prepared according to the step (a):

I. an oxidation reaction to obtain:

5,5'-dinitrato-2,2'-dithio-diisosorbide (2) or  
2-(isosorbidyl-2'-dithio)-isosorbide 5-  
mononitrate (8),

optionally followed by a second oxidation to  
obtain a compound according to formula (Ie):



(Ie)

wherein:

n is 1 or 2,

X is  $-S(O)_m-$ , wherein m is 0, 1 or 2, and

R\* represents hydroxyl or ONO<sub>2</sub>;

II. a substitution reaction to obtain a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 0,

X represents a bond,

and R does not represent nitrosyl,

optionally followed by an oxidation to obtain:

a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 0,

X represents -S(O)<sub>m</sub>-, wherein m is an integer of 0 or 1,

and R does not represent nitrosyl;

III. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 0, and

X represents -S-;

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 1 or 2, and

X represents -S(O)<sub>m</sub>-, wherein m is 0, 1 or 2; or

IV. a nitrosation reaction to obtain:

S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate (6)

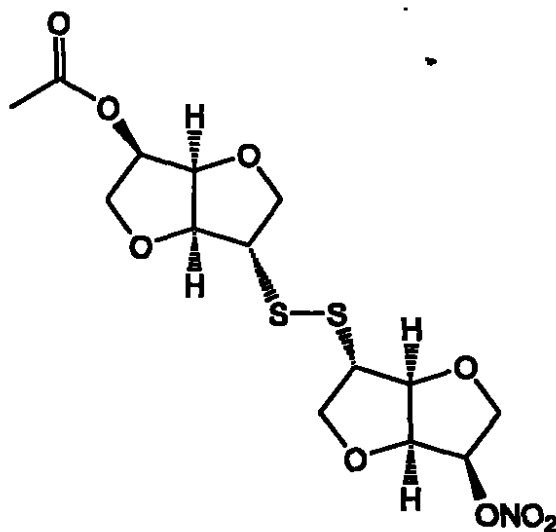
36. A process according to claim 34 or 35 that includes steps (a) and (b) II for the preparation of:

---

2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate, and/or  
2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate.

37. A process according to claim 35, that includes the separation of both diastereoisomers.

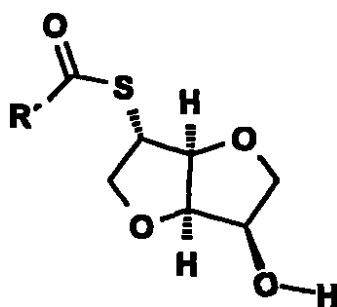
38. A process for preparing a compound of formula (11) or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



(11)

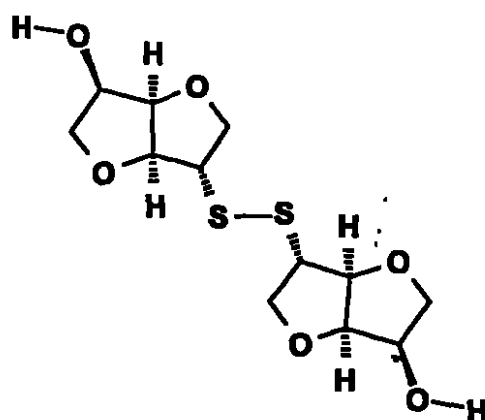
which process comprises the following steps:

a) effecting an oxidation of a compound of formula (III):



(III)

wherein R' is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, preferably methyl,  
to obtain 2,2'-dithiodiisosorbide (10),



(10)

and

(b) effecting a nitration of the compound prepared in  
step (a) with a nitrating agent in the presence of a  
carboxylic anhydride, preferably acetic anhydride.

39. 2,2'-dithiodiisosorbide.

## **Derivados de Disulfuro, Sulfuro, Sulfóxido y Sulfona de Azúcares Cíclicos y sus usos**

### **Ambito de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de disulfuro, sulfuro, sulfóxido y sulfona de mononitrato de 1,4:3,6 - dianhidrohexitol y su uso para la prevención y/o tratamiento de trastornos vasculares.

### **Fundamentos técnicos**

El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas activas biológicamente más pequeñas y simples que podemos encontrar en la naturaleza. Además, el NO parece ser una de las moléculas más ubicuas en los mamíferos. Al ser una de las moléculas de señalización de uso más generalizado, el NO tiene una gran importancia en el control de prácticamente todas las funciones orgánicas y celulares del cuerpo. El NO es la única molécula endógena capaz de funcionar como un neurotransmisor, autacoide, mediador constitutivo, mediador inducible, molécula citoprotectora y molécula citotóxica.

Dado que el NO desempeña múltiples acciones fisiológicas en la regulación de numerosas y diversas funciones orgánicas, los defectos en la ruta del NO conllevan el desarrollo de numerosas condiciones patológicas. Estos trastornos incluyen la hipertensión, aterosclerosis, enfermedades de las arterias coronarias, insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar, ictus, impotencia, complicaciones vasculares de la diabetes mellitus, úlceras gastrointestinales, asma y otros trastornos del sistema nervioso central y sistémico.

---

Todos los donadores de óxido nítrico (DNOs) comparten la propiedad común de producir actividad relacionada con el NO cuando se aplican en sistemas biológicos y, por tanto, mimetizan las respuestas al NO endógeno. No obstante, los procesos que llevan a la formación/liberación del NO difieren de manera significativa entre las clases de compuestos, al igual que lo hacen sus reactividades químicas. Mientras que algunos compuestos requieren catálisis enzimática, otros producen NO de manera no enzimática. En algunos compuestos, la liberación de NO es precedida por una reducción o por una oxidación. El proceso se complica aún más por la susceptibilidad específica de los compuestos a los cambios en el pH, oxígeno, luz y temperatura y por la formación de diferentes subproductos que se producen durante la descomposición o el metabolismo. Además, la cinética de la liberación de NO a partir de un compuesto determinado es, a menudo, más importante que la cantidad absoluta de NO liberado. Es más, la distribución tisular de los DNOs y el lugar en el que se genera el NO es también muy importante. Todas estas consideraciones son importantes, pues explican los muy diferentes perfiles farmacológicos obtenidos con los distintos DNOs descritos en la bibliografía y hace necesario caracterizar completamente el perfil farmacológico de los nuevos DNOs desarrollados en investigación y desarrollo.

DNOs basados en una estructura de mononitrato de isosorbida, que son útiles desde un punto de vista farmacéutico, aparecen descritos en WO 00/20420. Los compuestos descritos allí como tal no forman la parte de la actual invención. Esa solicitud de patente describe compuestos orgánicos nitrados capaces de proporcionar un potente efecto vasodilatador y que, al mismo tiempo, generan poca o nula tolerancia. Sin embargo, no existe indicación alguna sobre el posible uso de dichos compuestos para el tratamiento de la activación de plaquetas, trombosis, ictus, daño tisular debido a isquemia y/o isquemia/reperfusión; condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su

patogénesis y/o aterosclerosis. En consecuencia, el nuevo uso de esos compuestos sí forma la parte de la presente invención.

Uno de los principales problemas de los compuestos orgánicos nitrados descritos en la literatura y de aquellos utilizados clínicamente reside en el hecho de que su mecanismo de acción radica en la relajación del músculo liso vascular sin modificar otros procesos patológicos involucrados en las enfermedades cardiovasculares.

La isquemia tisular resulta en la depleción de las reservas intracelulares de adenosina-trifosfato (ATP), lo que consecuentemente compromete el funcionamiento de la bomba iónica dependiente del ATP asociada a la membrana en las células endoteliales. Esta disfunción de la membrana permite la entrada de calcio, sodio y agua en las células. La resultante acumulación de calcio y otros iones en la célula puede derivar en una tumefacción celular y en la inapropiada activación de las enzimas celulares. Una enzima que se activa por el aumento del calcio intracelular durante la isquemia es la xantina deshidrogenasa (XDH). En condiciones normales, la XDH oxida la hipoxantina (un producto de descomposición en el metabolismo del ATP) de una manera dependiente de NADPH para producir xantina y ácido úrico. Sin embargo, durante la condición hipóxica de la isquemia, los niveles de hipoxantina aumentan dentro de la célula debido a la hidrólisis de ATP y se produce una activación dependiente del calcio de las proteasas que convierte a la XDH reductora de NADPH en una forma de enzima reductora de oxígeno denominada xantina oxidasa (XO). Al producirse el restablecimiento del flujo de sangre (reperfusión) al tejido y con la reintroducción de oxígeno molecular, la XO convertirá la hipoxantina en xantina y ácido úrico y ello catalizará la reducción de oxígeno molecular para formar tanto radicales aniónicos superóxidos ( $O_2^-$ ) como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este mecanismo de producción de radicales de oxígeno dependiente de la XO ha

---

sido invocado para explicar la participación del  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  en las lesiones por reperfusión producidas en una variedad de órganos, incluyendo el intestino, el cerebro, el corazón y el músculo esquelético.

La generación de radicales de oxígenos en tejidos post-isquémicos parece sobrepasar la capacidad de los antioxidantes endógenos tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión para proteger las células endoteliales y parenquimatosas. Los antioxidantes exógenos tales como el SOD y la catalasa han demostrado atenuar la infiltración de leucocitos y las lesiones a tejidos producidas por la isquemia y la reperfusión.

La biodisponibilidad del óxido nítrico parece estar reducida en la reperfusión, lo que probablemente se deba a un deterioro de la producción endotelial de NO y a una inactivación aumentada de NO por el  $O_2^-$  derivado de células endoteliales. La biodisponibilidad limitada del NO contribuye a las interacciones anormales célula-célula y a la disfunción vascular durante la reperfusión. Los donadores de óxido nítrico han demostrado resultados prometedores como agentes protectores en modelos experimentales de isquemia-reperfusión. No obstante, considerando los procesos involucrados en los daños producidos por la isquemia-reperfusión, sería muy interesante disponer de una molécula con ambas propiedades: que fuera donador de NO y que, al mismo tiempo, tuviera propiedades antioxidantes.

La aterosclerosis es un proceso activo originado por un daño continuo del endotelio vascular. Se desarrolló la hipótesis de la aterosclerosis como respuesta al daño del endotelio cuando se estudió la asociación de aterosclerosis con factores de riesgo (niveles plasmáticos elevados de LDL, niveles plasmáticos bajos de HDL, hipertensión, estrés oxidativo, tabaquismo, diabetes mellitus, niveles plasmáticos elevados de Lp(a) o modificaciones de la LDL tales como

oxidación o glicosilación que evitan la eliminación de LDL por los receptores específicos). La LDL se acumula en la pared vascular como consecuencia de un transporte activo de células vasculares endoteliales. Durante este proceso, la LDL sufre la oxidación de una parte de la molécula. La presencia de LDL oxidada (ox-LDL) es de vital importancia para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. En el mismo sentido, la teoría de que la LDL oxidada es responsable de algunas de las características patológicas de las lesiones ateroscleróticas deriva de los hallazgos en sistemas de células en cultivo que revelan que la LDL oxidada causa cambios celulares que se correlacionan con aspectos conocidos de las lesiones arteriales, pero que no están inducidos por la LDL nativa. La lesión endotelial, la retención de LDL en el intersticio de la íntima, el reclutamiento de monocitos en la íntima, el enriquecimiento de los macrófagos con lípidos derivados de lipoproteínas, la migración y proliferación de células musculares lisas, la acumulación de detritus de células necróticas y las tendencias hacia la vasoconstricción y la actividad pro-coagulante son características de la aterosclerosis.

La vasculopatía del trasplante cardiaco alogénico es una forma inusualmente acelerada y difusa de aterosclerosis coronaria que limita el éxito a largo plazo del trasplante de corazón. La disfunción vasodilatadora del endotelio coronario es un marcador común y temprano para el desarrollo de vasculopatía del trasplante cardiaco alogénico.

Por tanto, nuevos compuestos orgánicos nitrados que, además de su actividad vasodilatadora, podrían combinar actividades que les permitieran modificar otros procesos patológicos que forman parte de las enfermedades cardiovasculares, tales como la aterosclerosis y el daño tisular debido a la isquemia y/o a la isquemia y a la reperfusión, supondrían un gran avance con respecto a los compuestos utilizados hoy en día.

## Resumen de la invención

Un objeto de la invención es un novedoso tipo de compuestos, derivados del mononitrato de dianhidrohexitol, que son capaces de proporcionar un potente efecto vasodilatador y que, al mismo tiempo, modifican otros procesos patológicos involucrados en las enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis, vasculopatía del trasplante alogénico y daño tisular debido a isquemia y/o isquemia-reperfusión.

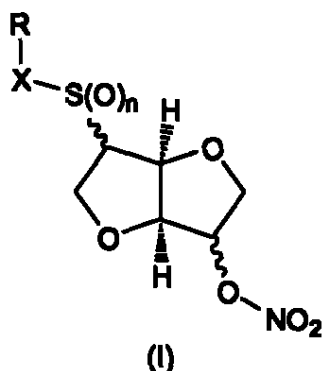
Otro objeto de la invención es un novedoso tipo de compuestos, derivados del mononitrato de dianhidrohexitol, que son capaces de proporcionar un potente efecto antitrombótico incluso a una dosis que no modifica la presión arterial.

Otro objeto de la invención es un novedoso tipo de compuestos, derivados del mononitrato de dianhidrohexitol, que son capaces de proporcionar una sinergia con fármacos trombolíticos, anticoagulantes, antitrombóticos, antioxidantes e hipolipemiantes.

Otro objeto más de la presente invención tiene que ver con el nuevo uso de los derivados del mononitrato de dianhidrohexitol para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de trastornos cardiovasculares relacionados con la aterosclerosis.

## Descripción detallada de la invención

Es un objeto de la presente invención la de proporcionar un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo:



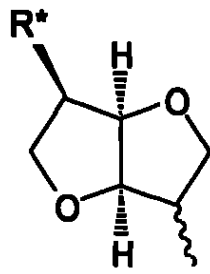
donde:

$n$  es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

$\text{X}$  representa  $-\text{S(O)}_m-$ ,  $-(\text{C=O})-$  o un enlace sencillo, donde  $m$  es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando  $\text{X}$  representa  $-(\text{C=O})-$  entonces  $n$  es 0,

$\text{R}$  representa hidrógeno o es un residuo  $\text{R}^a$ , siendo dicho residuo  $\text{R}^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

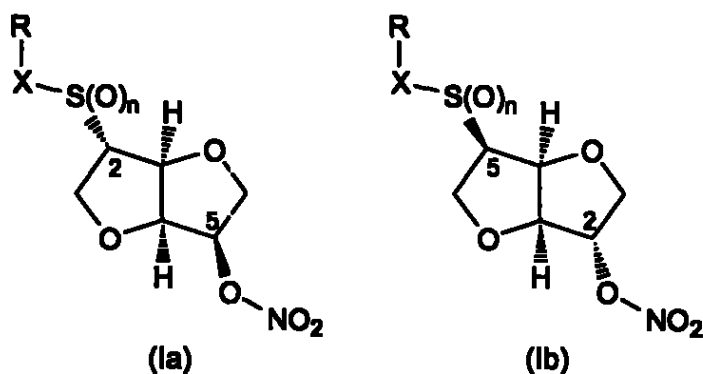
- $\text{C}_{1-6}$  alquilo;
- $\text{C}_{2-6}$  alquenilo;
- $\text{C}_{3-8}$  cicloalquilo;
- $\text{C}_{3-8}$  cicloalquilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  o  $\text{NCH}_3$ ;
- $\text{C}_{4-8}$  cicloalquenilo;
- $\text{C}_{4-8}$  cicloalquenilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  o  $\text{NCH}_3$ ;
- fenilo;
- piridilo;
- tiofenilo;
- nitrosilo;
- S-cisteinil;
- S-glutationil; y



donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

en el que  $R^a$  opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno.

Es preferido en los compuestos según la fórmula (I) que cuando  $RXS(O)_n-$  y  $-ONO_2$  estén en forma trans uno respecto al otro, en lo que respecta al plano de anillo, tal y como se representa en las fórmulas (Ia) y (Ib):



entonces  $RXS(O)_n-$  no representa  $Z-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-S-$ , donde Z es un grupo alquilo  $C_{1-4}$ , grupo arilo o grupo aralquilo.

Sorprendentemente, los compuestos de la fórmula I, además del potente efecto vasodilatador con tolerancia pequeña o nula, poseen propiedades anti-activación de las plaquetas, anti-

trombótica, anti-ictus, antioxidante, anti-lesión/daño tisular debido a isquemia y/o isquemia/reperfusión y propiedades anti-ateroscleróticas.

Otra incorporación de la presente invención tiene que ver con una composición farmacéutica que incluye como ingrediente activo por lo menos uno de los derivados de mononitrato de dianhidrohexitol de acuerdo con la fórmula (I), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo.

Otra incorporación de la presente invención tiene que ver con el uso de por lo menos un derivado de mononitrato de dianhidrohexitol de acuerdo con la fórmula (I), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo, como ingrediente activo para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante cardíaco alogénico, disfunciones del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en sus patogénesis, tales como, pero sin limitarse a ella, la enfermedad de Alzheimer, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis y/o daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión.

Las expresiones empleadas anteriormente serán explicadas a continuación con mayor detalle:

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables, solvato o prodroga del mismo" hace referencia a cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato o cualquier otro compuesto que, administrado a un paciente (directa o indirectamente), proporciona un compuesto como los aquí

---

descritos. Sin embargo, se considerará que las sales no farmacéuticamente aceptables también se engloban dentro del ámbito de esta invención, ya que dichos compuestos pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, prodrogas y derivados puede ser llevada a cabo por métodos conocidos en el estado de la técnica.

Por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos aquí descritos se sintetizan a partir del compuesto correspondiente, que contiene un grupo ácido o un grupo básico, por métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales son, por ejemplo, preparadas mediante la reacción de las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos en una cantidad estequiométrica del correspondiente ácido ó base en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. Generalmente se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales ácidas incluyen sales ácidas minerales tales como hidrocloruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, nitrato, fosfato y sales ácidas orgánicas tales como acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, mandelato, metilsulfonato y p-toluensulfonato. Ejemplos de sales básicas incluyen sales inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales orgánicas tales como etiléndiamina, etanolamina, N,N-dialquilénetanolamina, trietanolamina, glucamina y sales básicas de aminoácidos.

Los derivados o prodrogas particularmente preferidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención cuando tales compuestos son administrados a un paciente (por ejemplo, permitiendo que un

compuesto administrado de forma oral sea más rápidamente absorbido en sangre) o aquellos que incrementan la liberación del correspondiente compuesto a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático).

Cualquier compuesto que sea una prodroga de un compuesto de la fórmula (I) pertenece al ámbito de la invención. El término "prodroga" se emplea en el sentido más amplio y comprende a aquellos derivados que se convierten "in vivo" en los compuestos de la invención. Tales derivados incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados: ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, sales metálicas de ésteres sulfonados, carbamatos y ésteres de amidas.

Los compuestos de la presente invención pueden estar preferentemente en su forma cristalina, o como compuestos libres o como solvatos. Los métodos de solvatación que pueden ser utilizados son los generalmente conocidos en el estado de la técnica. Los solvatos adecuados son aquellos solvatos farmacéuticamente aceptables. Se prefiere que el solvato sea un hidrato.

Se prefiere que los compuestos de fórmula (I), o sus sales o solvatos se encuentren en su forma sustancialmente pura aceptable farmacéuticamente. Por forma farmacéuticamente aceptable se entiende, "inter alia", el tener un nivel farmacéuticamente aceptable de pureza excluyendo aditivos farmacéuticos habituales tales como diluyentes y excipientes e incluyendo material considerado no tóxico a niveles de dosis normales. Los niveles de pureza para el fármaco se encuentra por encima del 50%, preferiblemente por encima del 70% y aún más preferible por encima del 90%. En una situación

aún más preferible, los compuestos de fórmula (I) o de sus sales, solvatos o prodrogas del mismo tienen una pureza superior al 95%.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros, y/o dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E). Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros puros y sus mezclas se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

El término "halógeno" se refiere al flúor, cloro, bromo o yodo, de entre los que se prefiere el bromo.

El término "C<sub>1-6</sub> alquilo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que cuenta con entre 1 y 6 átomos de carbono, incluyendo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo y hexilo.

El término "C<sub>2-6</sub> alquenilo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que cuenta con entre 2 y 6 átomos de carbono y al menos un doble enlace de estereoquímica E o Z, según proceda. Este término incluiría, por ejemplo, vinilo, alilo, 1- y 2-butenilo y 2-metil-2-propenilo.

El término "C<sub>3-8</sub> cicloalquilo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo alicíclico que cuenta con entre 3 y 8 átomos de carbono. Algunos ejemplos ilustrativos de dichos grupos cicloalquilos son ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

De acuerdo con esto, el término "C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>", se refiere a un grupo alicíclico que cuenta con entre 3 y 8 átomos de carbono donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>. Algunos ejemplos ilustrativos de esos grupos son tetrahidropirano, tetrahidrofurano, pirrolidino, piperidino y tetrahidrotiofeno.

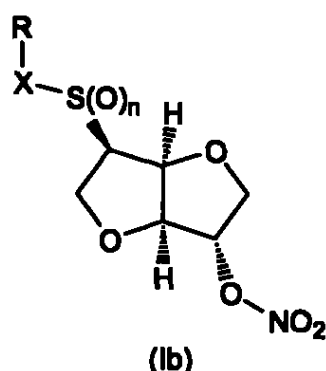
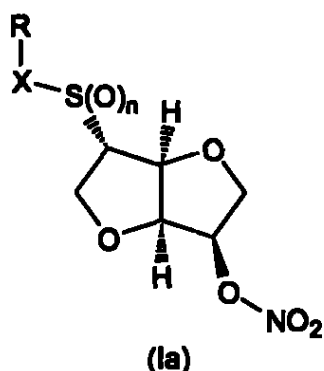
El término "C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo" se refiere a un grupo alicíclico que cuenta con entre 4 y 8 átomos de carbono. Algunos ejemplos ilustrativos de dichos grupos cicloalquenilos son ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo y ciclooctenilo.

Se prefiere que R represente hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, fenilo o (C<sub>1-6</sub> alquilo)fenilo, mientras que C<sub>1-6</sub> alquilo es especialmente preferido.

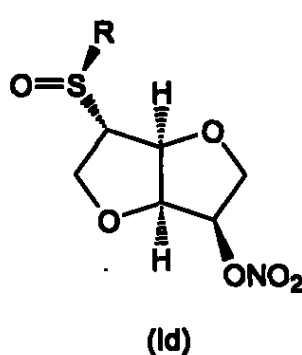
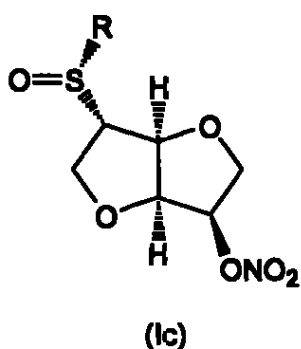
También se prefiere que en la fórmula (I) m, n, ó ambos sean 0.

También se prefiere que X represente un enlace sencillo o -S-

Sobre todo es preferido que los compuestos de fórmula (I) correspondan a los compuestos que son representados por la fórmula (Ia) y/o la fórmula (Ib):



Los compuestos de fórmula (I) incluyen asimismo sus diastereoisómeros (R) y (S) según las fórmulas (Ic) y (Id):

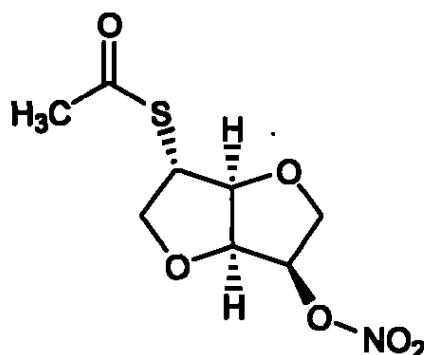


Los compuestos especialmente preferidos de la fórmula I son:

2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
 5,5'-dinitrato-2,2'-ditio-diisosorbida,  
 2-metiltioisosorbida 5-mononitrato,  
 2-[(R)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,  
 2-[(S)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,  
 2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato  
 2-metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato,  
 S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
 2-(tetrahidropiran-2-il-tio)isosorbida 5-mononitrato,  
 2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato, y  
 2-(5'-acetiloxisosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mono  
 nitrato.

Además, es preferido sobre todo usar 2-acetiltioisosorbida 5-mononitrato (compuesto (12)), un tautómero, una sal

farmacéuticamente aceptable, una prodroga y/o un solvato del mismo:



12

como ingrediente activo para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la trombosis, isquemia, daño celular/tisular inducido por isquemia y/o por isquemia y reperfusión, hipertensión, espasmo vascular, aterosclerosis y/o vasculopatía del trasplante cardíaco

Adicionalmente, los compuestos de la fórmula I, especialmente 2-acetilthioisorbida 5-mononitrato (12), sus tautómeros, sus sales farmacéuticamente aceptables, prodrogas o solvatos de los mismos, también pueden utilizarse en la terapia para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, vasculopatía del trasplante cardíaco, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o daño tisular debido a isquemia y/o isquemia-reperfusión. Estos compuestos pueden ser utilizados especialmente en la prevención y/o el tratamiento de condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su patogénesis, tales como alergia, ictus, enfermedad de Alzheimer y/o enfermedades cardiovasculares isquémicas. La composición farmacéutica puede ser administrada por diferentes vías. Por ejemplo, puede administrarse por vía oral en forma de preparados farmacéuticos tales como

comprimidos, cápsulas, jarabes y suspensiones. Parenteralmente en forma de soluciones o emulsiones, etc. Puede también administrarse por vía tópica en forma de cremas, pomadas, bálsamos, etc. y transdérmicamente, por ejemplo, mediante el uso de parches o bandas. También puede aplicarse directamente en el recto como supositorios. Los preparados pueden contener excipientes, activadores, agentes quelantes, estabilizadores, etc. fisiológicamente aceptables. En el caso de las inyecciones, se pueden incorporar tampones, agentes solubilizantes o isotónicos fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden incluir además un agente trombolítico, preferiblemente un activador del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa. También pueden contener un agente anticoagulante, preferiblemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosán. Además, pueden contener adicionalmente un agente antitrombótico, preferiblemente ácido acetil salicílico, dipiridamol, ticlopidina, clopidrogel, triflusal, polisulfato de pentosano o abciximab. También pueden contener inmunoglobulina o un fragmento de ésta que tenga especificidad por la glicoproteína IIb/IIIa.

De forma alternativa, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden contener además un agente hipolipemiente preferiblemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, eptastatina, lifibrol, acifrán, acitemato, glunicato o rosuvastatina. También pueden contener un agente antioxidante/secuestrador de radicales libres, preferentemente seleccionado de entre nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutatona, edaravona, raxofelast, licopeno, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-D-cisteína, una mezcla racémica de N-acetil-L-cisteína y N-acetil-D-cisteína o carvedilol.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento y/o prevención de la aterosclerosis, vasculopatía del trasplante cardiaco, activación de plaquetas, trombosis, ictus, daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión y/o condiciones patológicas donde el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su patogénesis (tales pero sin limitarse a la alergia, el ictus, la enfermedad de Alzheimer, las enfermedades isquémicas cardiovasculares); y/o condiciones patológicas donde un déficit de NO desempeña un papel importante en su patogénesis. También pueden utilizarse para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del sistema circulatorio, especialmente enfermedades cardiovasculares y coronarias.

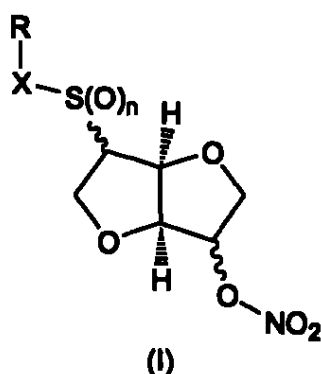
La dosis diaria puede variar en función de los síntomas específicos, la edad, el peso del paciente, el modo específico de administración, etc. y la dosis normal diaria para un adulto puede variar entre 0,1 y 500 mg y puede administrarse en una dosis única o dividida en diferentes dosis a lo largo del día.

Los compuestos de la invención presente pueden estar preparados por métodos de preparación conocidos por el estado de la técnica, por la adaptación de los procesos conocidos por la persona experta o por un nuevo proceso descrito a continuación.

Por ello, otra incorporación de la presente invención tiene que ver con los procesos para preparar los compuestos de la fórmula I, tautómeros, sales farmacéuticamente aceptables, prodrogas y solvatos de los mismos.

Según la invención es preferible preparar un compuesto de la fórmula (I), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo por el proceso definido debajo:

---



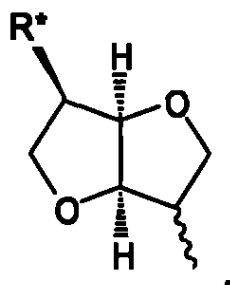
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $\text{-S(O)}_m\text{-}$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

Y R representa hidrógeno o es un residuo  $\text{R}^a$ , siendo dicho residuo  $\text{R}^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

C<sub>1-6</sub> alquilo;  
C<sub>2-6</sub> alquenilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por O, S, NH o  $\text{NCH}_3$ ;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por O, S, NH o  $\text{NCH}_3$ ;  
fenilo;  
piridilo;  
tiofenilo;  
nitrosilo;  
S-cisteinil;  
S-glutationil; y

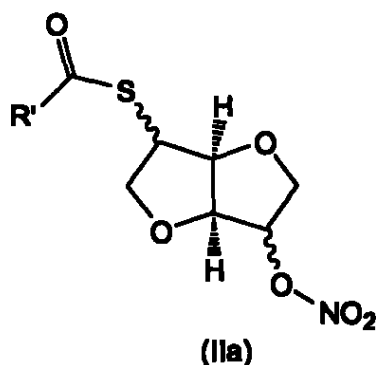


donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alqueno,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalqueno, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

en el que  $R^a$  opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alqueno,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalqueno, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

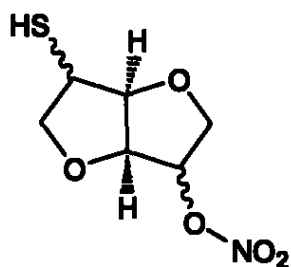
cuyo proceso comprende la realización de los pasos siguientes:

a) efectuar la hidrólisis de un compuesto de fórmula (IIa):



donde  $R'$  es  $C_{1-6}$  alquilo, preferentemente metilo, para obtener el siguiente compuesto

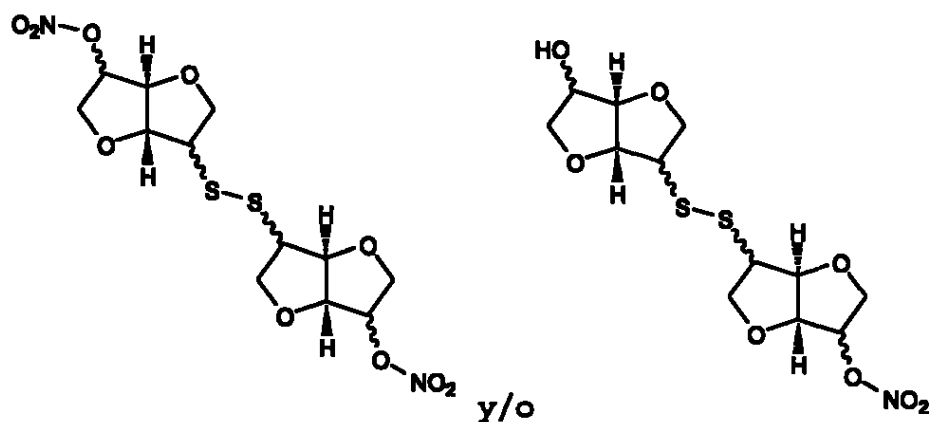
20



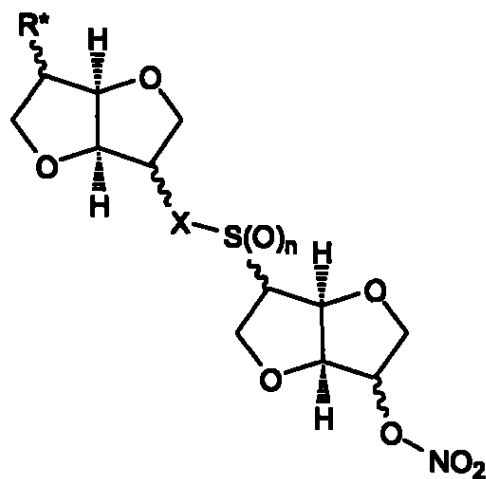
y

b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto preparado de acuerdo con la etapa (a):

I. una reacción de oxidación para obtener:



opcionalmente seguido por una segunda oxidación para obtener el siguiente compuesto:



donde:

n es 1 ó 2,

X es  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, y

R\* representa hidroxilo o  $ONO_2$ ;

II. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 0,

X representa un enlace,

Y R no representa nitrosilo

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 0,

X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es un número entero de 0 ó 1,

y R no representa nitrosilo;

III. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto según la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 0, y

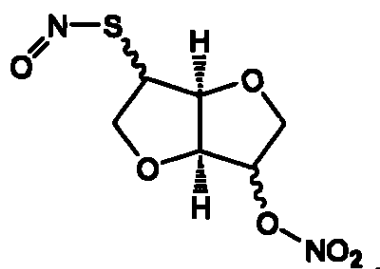
X representa  $-S-$ ;

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (I), donde:

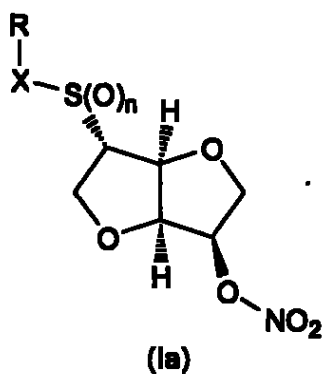
n es un número entero de 1 ó 2, y

X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, ó

IV. una reacción de nitrosación para obtener:



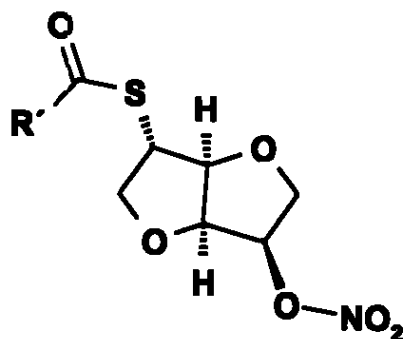
Según el anterior proceso de la invención es especialmente preferible preparar un compuesto de la fórmula (Ia), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo:



donde n, X, m y R tienen el significado anterior,

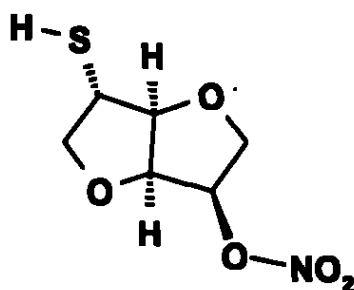
y dicho proceso comprende la realización de las siguientes etapas:

- a) efectuar la hidrólisis de un compuesto de la fórmula (II):



(II)

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo, para obtener 2-tioisosorbida 5-mononitrato (1),



(1)

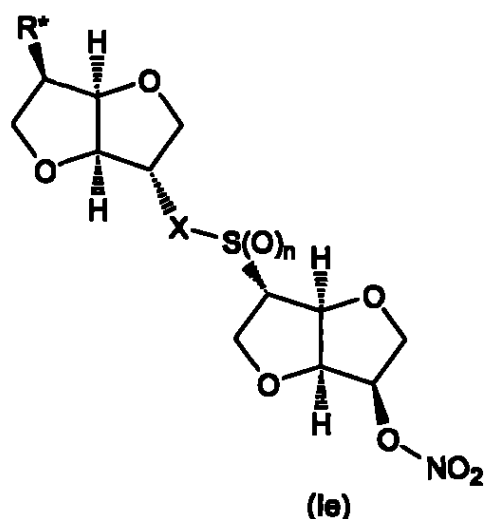
y

b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto (1) preparado de acuerdo con la etapa (a):

I. una reacción de oxidación para obtener:

5,5'-dinitrato-2,2'-ditioldiisosorbida (2) ó  
2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato  
(8),

opcionalmente seguido por una segunda oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (Ie):



donde

$n$  es 1 ó 2,

$X$  es  $-S(O)_m-$ , donde  $m$  es 0, 1 ó 2, y

$R^*$  representa hidroxilo ó  $ONO_2$ ;

II. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto de acuerdo con la fórmula (Ia), donde:

$n$  es un número entero de 0,

$X$  representa un enlace,

y  $R$  no representa nitrosilo

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener  
un compuesto de acuerdo con la fórmula (Ia), donde:

$n$  es un número entero de 0,

$X$  representa  $-S(O)_m-$ , donde  $m$  es un número entero de  
0 ó 1,

y  $R$  no representa nitrosilo;

III. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto según la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 0, y

X representa -S-;

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 1 ó 2, y

X representa -S(O)<sub>m</sub>-, donde m es 0, 1 ó 2, ó

IV. una reacción de nitrosación para obtener:

S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato (6).

El paso opcional (b) de este nuevo proceso de la invención se describe esquemáticamente en los Esquemas 1 á 4 para los compuestos específicos de la invención. Estos Esquemas 1 á 4 se relacionan con la reacción de oxidación I, la reacción de sustitución II, la reacción de sustitución III y la reacción de nitrosation IV, respectivamente.

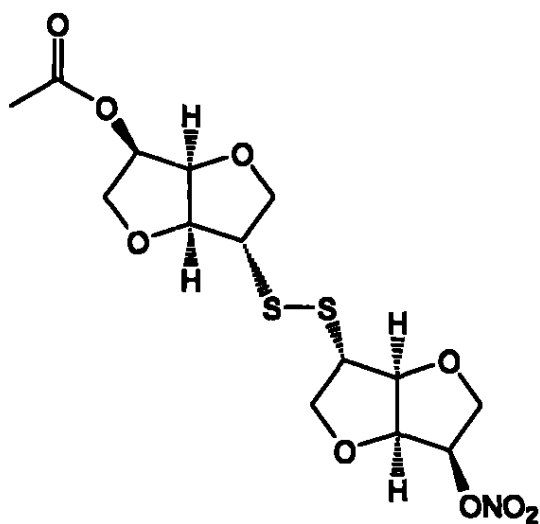
Un proceso expresamente preferido de la invención incluye los pasos (a) y (b) II para la preparación de:

2-[(R)-alquilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato y

2-[(S)-alquilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,

Además, es preferido que ambos diastereoisómeros sean separados posteriormente, y la separación pueda ser llevada a cabo por métodos convencionales conocidos en el estado del arte.

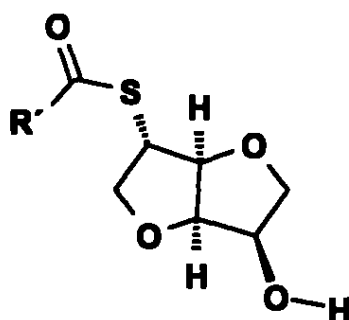
Un proceso de preparación preferido de la invención concierne la preparación de un compuesto de fórmula (11) ó un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo:



(11)

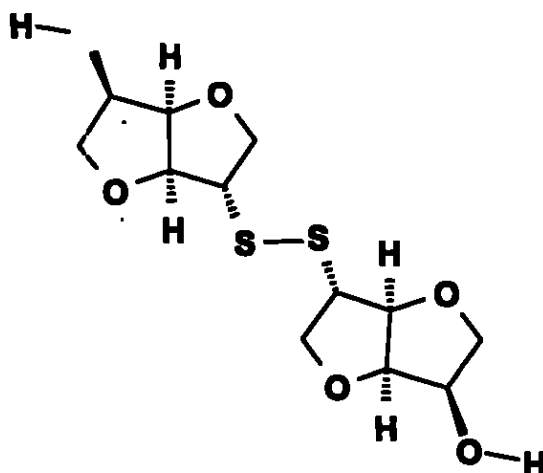
cuyo proceso comprende las siguientes etapas:

- a) efectuar una reacción de oxidación de un compuesto de la fórmula (III):



(III)

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo, para obtener 2,2'-ditioldiisoscorbida (10),



(10)

y

- (b) realización de una reacción de nitración del compuesto obtenido en la etapa (a) con un agente nitrante en presencia de un anhídrido carboxílico, preferentemente anhídrido acético.

Finalmente, otra incorporación de la presente invención tiene que ver con el compuesto 2,2'-ditiodiisorbida (10), que es un compuesto intermedio en la preparación del compuesto (11) de la invención.

En los ejemplos de trabajo incluidos en el presente documento (vide infra) se describen con detalle los procesos adecuados para obtener varios de los compuestos de acuerdo con la fórmula general (I). A la vista de estos ejemplos, es de conocimiento general entre las personas con formación obtener los compuestos no ejemplificados explícitamente a través de las modificaciones adecuadas de los ejemplos de trabajo. Resultará obvio para una persona con formación que estos ejemplos son meramente ilustrativos y no deben considerarse como una limitación de la invención.

## Ejemplos

Los compuestos obtenidos en los ejemplos que aparecen a continuación se identifican mediante los datos de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de su protón ( $^1\text{H}$ -NMR) y carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -NMR).

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados utilizando espectrómetros Varian Gemini-2000 o Varian Gemini-300.

La frecuencia de operación y el disolvente utilizado para registrar el espectro aparecen indicados en los espectros  $^1\text{H}$ -NMR. La posición de las señales se indican en  $\delta$  (ppm) y la señal de los protones del disolvente se toma como referencia. Los valores de referencia fueron 7,24 ppm para el cloroformo deuterizado y 2,49 ppm para dimetil sulfóxido deuterizado. La señal obtenida para los protones de tetrametilsilano (TMS) se toma ocasionalmente como referencia interna, con 0 ppm como valor de referencia. El número de protones de cada señal, medida mediante integración electrónica, y el tipo de señal se indica entre paréntesis utilizando las siguientes abreviaturas: s (simple), d (doblete), t (triplete), dd (doblete de dobletes), ddd (doblete de doblete de dobletes), bs (señal ancha), cs (señal compleja), s.a.  $\text{D}_2\text{O}$  (simplifica tras deuterar), d.a.  $\text{D}_2\text{O}$  (desaparece al deuterar).

La frecuencia de operación y el disolvente utilizados en cada espectro aparecen indicados en los espectros  $^{13}\text{C}$ -NMR. La posición de las señales se indican en  $\delta$  (ppm) y la señal de los carbonos del disolvente se toma como referencia. Los valores de referencia son 77,00 ppm para cloroformo deuterado y 39,50 ppm para dimetil sulfóxido hexadeuterizado.

En algunos casos, también se llevaron a cabo experimentos de resonancia magnética nuclear utilizando las secuencias de pulso APT (Attached Proton Test), HETCOR (Heteronuclear

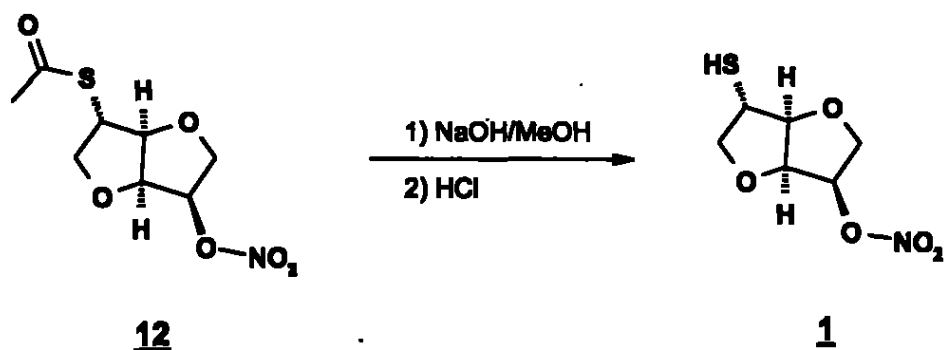
Chemical Shift Correlation) ó COSY (Correlated Spectroscopy) como ayuda para la asignación.

En la parte experimental, son utilizadas las siguientes abreviaturas:

|                     |                                                                                                             |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AcOEt               | acetato de etilo                                                                                            |
| AcOH                | ácido acético                                                                                               |
| DMSO-d <sub>6</sub> | dimetil sulfóxido<br>hexadeuterizado                                                                        |
| EtOH                | alcohol etílico                                                                                             |
| EtOEt               | éter etílico                                                                                                |
| HPLC                | cromatografía líquida de alta<br>resolución                                                                 |
| Hx                  | hexano                                                                                                      |
| MeI                 | yoduro de metilo                                                                                            |
| MeOH                | alcohol metílico                                                                                            |
| LC- (ApcI)MS        | cromatografía líquida -<br>espectrometría de masas<br>mediante ionización química a<br>presión atmosférica. |
| s.d.                | desviación estándar                                                                                         |
| s.e.m.              | error estándar de la media                                                                                  |
| THP                 | tetrahidropiranyl                                                                                           |

#### EJEMPLO 1

Método para la obtención de 2-tioisoborbidato 5-mononitrato  
(1).



En un matraz de 50 mL, se disolvieron 1,00 g (4,02 mmol) de 2-acetiltioisisorbida 5-mononitrato (12) obtenido de acuerdo con WO 00/20420 en 20,0 mL de alcohol metílico. Se añadieron de una vez 10,0 mL de una solución de metanol al 10% de hidróxido de sodio. Después de tapar el matraz rápidamente y agitar durante 1 minuto a temperatura ambiente (ca. 25 °C), se añadieron de una vez 2,23 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se agitó y concentró hasta sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida a una temperatura por debajo de los 30 °C.

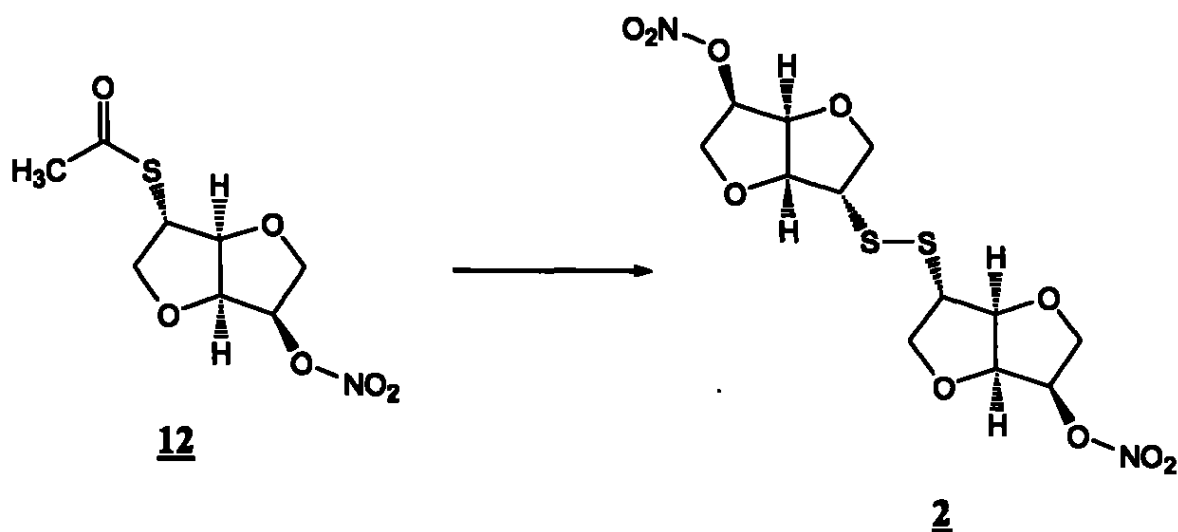
El residuo se suspendió en cloroformo. Esta solución de cloroformo se filtró y posteriormente se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Tras la filtración, se eliminó el disolvente a presión reducida. Se secó a presión reducida para obtener 0,83 g de un aceite anaranjado-amarillento correspondiente al producto de interés. Rendimiento: 100%.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,36-5,26 (1H, m,  $\text{CHONO}_2$ ), 4,95 (1H, t,  $J=5,0$  Hz,  $\text{CHCHONO}_2$ ), 4,42 (1H, d, 4,8 Hz,  $\text{CHCHS}$ ), 4,07 (1H, dd,  $J=4,6$  Hz,  $J=4,4$  Hz,  $\text{H-CHCHS}$ ), 3,97 (1H, dd,  $J=5,64$  Hz,  $J=2,5$  Hz,  $\text{H-CHCHONO}_2$ ), 3,87-3,76 (2H, cs,  $\text{H-CHCHS}$ ,  $\text{H-CHCHONO}_2$ ), 3,45-3,35 (1H, m,  $\text{CHS}$ ), 1,77 (1H, d,  $J=8,6$  Hz,  $\text{SH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 91,21 ( $\text{CHCHS}$ ), 81,22 ( $\text{CHONO}_2$ ), 81,07 ( $\text{CHCHONO}_2$ ), 76,15 ( $\text{CH}_2\text{CHS}$ ), 69,26 ( $\text{CH}_2\text{CHONO}_2$ ), 42,82 ( $\text{CHS}$ ).

**EJEMPLO 2**

**Método para la obtención de 5,5'-dinitrato-2,2'-ditiodiisosorbida (2)**

**Procedimiento 1:**

Se disolvieron 0,50 g de 2-acetiltioisosorbida 5-mononitrato (12) obtenidos de acuerdo con WO 00/20420 en 10,0 mL de alcohol metílico. Esta solución se añadió lentamente, gota a gota, a 200 mL de plasma humano en un matraz de 250 mL con agitación magnética intensa. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. El crudo de reacción se vertió sobre 500 mL de acetonitrilo mientras se agitaba vigorosamente, observando la precipitación instantánea de un sólido blanco floculante correspondiente a las proteínas del plasma. Se centrifugó a 3000 rpm y a 20 °C durante 30 min, se separó el líquido y el sólido (masa proteica) se suspendió en 250 mL de acetonitrilo. Se agitó y centrifugó bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente (3000 rpm/20 °C/30 min).

El licor sobrenadante fue decantado y mezclado con el anterior. El disolvente se evaporó a presión reducida a una

temperatura por debajo de los 30 °C. El residuo acuoso resultante (alrededor de 200 mL), se extrajo con cloroformo 4 x 500 mL. Las fases orgánicas se combinaron y secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Tras la filtración se concentró el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 350 mg de un sólido blanco que se purificó mediante cromatografía: (CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 6:1), aislándose 250 mg de un sólido blanco correspondiente al producto disulfuro 2-tioisosorbida 5-mononitrato (2). Rendimiento: 60%.

#### Procedimiento 2:

En un matraz de 50 mL, se disolvieron 1,00 g (4,02 mmol) de 2-acetiltioisosorbida 5-mononitrato (12) obtenido de acuerdo con WO 00/20420 en 20 mL de alcohol metílico y se añadieron 10 mL de una solución de metanol al 10% de hidróxido de potasio. Se tapó el matraz y se agitó la mezcla de reacción durante 5 horas a temperatura ambiente. Durante la reacción se observó la precipitación de un sólido blanco correspondiente al disulfuro (2). El sólido se filtró y lavó varias veces con alcohol metílico. Mediante el secado a presión reducida, se obtuvieron 0,58 g de un sólido blanco correspondiente al producto de interés disulfuro 2-tioisosorbida 5-mononitrato (2). Rendimiento: 70%.

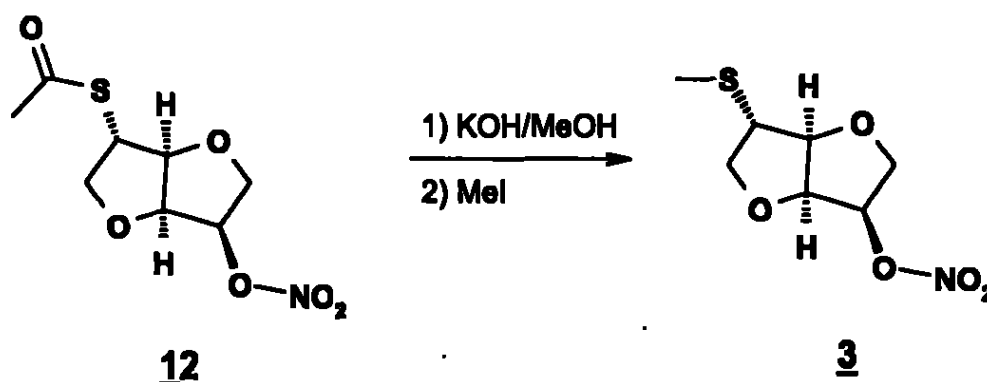
<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 5,51-5,43 (2H, m, 2CHONO<sub>2</sub>), 4,96 (2H, t, J=5,4 Hz, 2CHCHONO<sub>2</sub>), 4,51 (2H, d, J=4,8 Hz, 2CHCHS), 4,04-3,73 (10H, cs, 2CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>, 2CH<sub>2</sub>CHS, 2CHS).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 88,46 (2CHCHS), 83,31 (2CHONO<sub>2</sub>), 81,50 (2CHCHONO<sub>2</sub>), 73,24 (2 CH<sub>2</sub>CHS), 69,95 (2CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 54,01 (2CHS).

#### EJEMPLO 3

82

Método para la obtención de 2-metiltioisisorbida 5-mononitrato (3).



En un matraz de 50 mL, se disolvieron 1,00 g (4,02 mmol) de 2-acetiltioisisorbida 5-mononitrato (12) obtenido de acuerdo con WO 00/20420 en 20,0 mL de alcohol metílico y se añadieron de una vez 5,0 mL de una solución de metanol al 10% de hidróxido de potasio. La mezcla de reacción se tapó y agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron de una vez 2,0 mL de yoduro de metilo (32,00 mmol), la mezcla de reacción se tapó y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se concentró hasta sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en 250 mL de cloroformo y se lavó con 50 mL de agua. La fase orgánica se separó y se lavó con 3 x 50 mL de agua.

Después de secar sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Tras el secado a presión reducida, se obtuvieron 0,68 g de un sólido blanco correspondiente al producto de interés. Rendimiento: 76%.

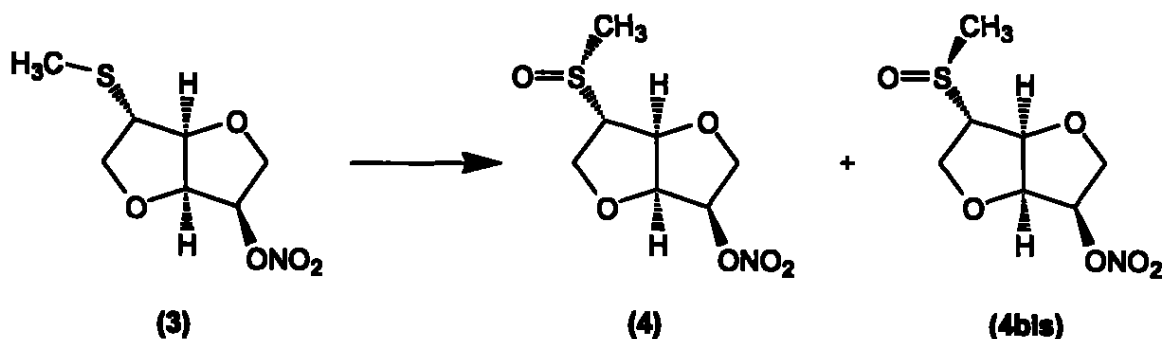
$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,34-5,26 (1H, m,  $\text{CHONO}_2$ ), 4,93 (1H, t,  $J=5,2$  Hz,  $\text{CHCHONO}_2$ ), 4,48 (1H, d,  $J=4,8$  Hz,  $\text{CHCHS}$ ), 4,14 (1H, dd,  $J=9,7$  Hz,  $J=4,8$  Hz,  $\text{H-CHCHS}$ ), 4,01 (1H, dd,  $J=11,2$

Hz,  $J=3,0$  Hz, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 4,01-3,81 (2H, cs, H-CHCHS, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 3,30-3,24 (1H, m, CHS), 2,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 88,65 (CHCHS), 81,55 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81,26 (CHONO<sub>2</sub>), 73,87 (CH<sub>2</sub>CHS), 69,10 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 50,74 (CHS), 14,74 (CH<sub>3</sub>).

#### EJEMPLO 4

Método para la obtención de 2-[(R)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato (4) y 2-[(S)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato (4bis)



En un matraz de 500 mL, se disolvieron 7,3 g (32,9 mmol) de 2-metiltioisosorbida 5-mononitrato (3), obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 3, en 75 mL de dioxano. Se añadió muy lentamente, gota a gota, una solución de 7,04 g (32,9 mmol) de NaIO<sub>4</sub> en 110 mL de agua y después se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla y entonces se eliminó el dioxano del filtrado a presión reducida. Se añadieron 150 mL de agua. La mezcla se extrajo con 2 x 300 mL porciones de cloroformo, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 6,6 g de un crudo de reacción que contiene una mezcla de diastereómeros en una proporción de un 65% de (4) y un 35% de (4bis). El crudo de reacción resultante se recrystalizó dos veces con dioxano para obtener

2,9 g del producto de interés (4) con una pureza del 95% mediante HPLC. Usando los licores madre de la primera recristalización, se eliminó el disolvente a presión reducida y se recristalizó el residuo resultante con dioxano para obtener 1 g del producto de interés (4bis) con una pureza del 95% mediante HPLC.

**2-[(R)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato (4):**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,39-5,28 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 5,02 (1H, dd, J=5,6 Hz, J=1,6 Hz, CHCHS), 4,89 (1H, t, J=5,5 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,29 (1H, dd, J=10,4 Hz, J=6,4 Hz, H-CHCHS), 4,20-3,91 (3H, cs, H-CHCHS, CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 3,38-3,31 (1H, m, CHSO), 2,61 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 82,11 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81,51 (CHCHS), 80,55 (CHONO<sub>2</sub>), 69,65 (CH<sub>2</sub>CHS), 69,28 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 66,24 (CHSO), 37,28 (CH<sub>3</sub>).

**Microanálisis**

calculado (%): 35,44 C; 4,67 H; 5,90 N; 13,51 S; 40,47 O  
experimental (%): 35,31 C; 4,67 H; 5,98 N; 13,5 S; 40,60 O

**Espectrometría de masas (LC-(ApcI)MS a 20V): 238 (M+1)<sup>+</sup>**

**Punto de fusión:** 153 °C por DSC

**Difracción de rayos X en monocristal:** Se establece que la configuración del diasterómero (4) es: (R)-S, (S)-C2, (S)-C3, (S)-C4, (R)-C5

**2-[(S)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato (4bis) :**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,39-5,28 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 4,89 (1H, t, J=5,6 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,68 (1H, d, 5,4 Hz, CHCHS), 4,40-

3,88 (4H, cs, CH<sub>2</sub>CHS, CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 3,48-3,40 (1H, m, CHSO), 2,58 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 82,89 (CHCHS), 82,26 (CHCHONO<sub>2</sub>), 80,55 (CHONO<sub>2</sub>), 69,19 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>) 67,88 (CH<sub>2</sub>CHS), 66,94 (CHSO), 36,64 (CH<sub>3</sub>).

#### Microanálisis

calculado (%): 35,44 C ; 4,67 H; 5,90 N; 13,51 S; 40,47 O

experimental (%): 35,65 C; 4,66 H; 5,87 N; 13,56 S; 40,57 O

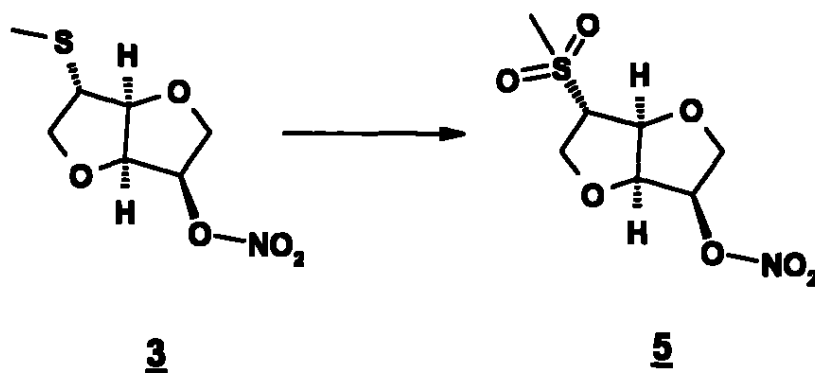
Espectrometría de masas (LC-(ApcI)MS a 20V): 238 (M+H)<sup>+</sup>

Punto de fusión: 115 °C por DSC

Difracción de rayos X en monocristal: Se establece que la configuración del diastereómero (4bis) es: (S)-S, (S)-C2, (S)-C3, (S)-C4, (R)-C5

#### EJEMPLO 5

Método para la obtención de 2-Metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato (5)



En un matraz se disolvieron 1,0 g (4,5 mmol) de 2-metiltioisisorbida 5-mononitrato (3), obtenidos de acuerdo con el ejemplo 3, en 20 ml de acetonitrilo. Se añadieron, de

una sola vez, 4,11 g (18,1 mmol) de ácido periódico ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ) y se agitó durante 48h a temperatura ambiente. Se añadieron 50 mL de una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Se extrajo con 2 x 30 mL de cloruro de metileno. Se unieron las fases orgánicas y se lavaron con 2 x 30 mL de una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 662 mg del producto de interés (5). Se suspendieron 640 mg del crudo en 25 mL de hexano, se filtró, se lavó con 7,5 mL de cloroformo, obteniéndose 450 mg del producto (5) con una pureza del 99,7% por HPLC.

$^1\text{H}$ -NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 5,53-5,47 (1H, m,  $\text{CHONO}_2$ ), 5,00-4,88 (2H, cs,  $\text{CHCHONO}_2$ ,  $\text{CHCHS}$ ), 4,38 (1H, dd,  $J=9,8$  Hz,  $J=1,8$  Hz, H- $\text{CHCHS}$ ), 4,12-3,86 (4H, cs, H- $\text{CHCHS}$ ,  $\text{CH}_2\text{CHONO}_2$ ,  $\text{CHSO}_2$ ), 3,07 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 82,77 ( $\text{CHCHS}$ ), 82,36 ( $\text{CHCHONO}_2$ ), 81,81 ( $\text{CHONO}_2$ ), 68,95 ( $\text{CH}_2\text{CHONO}_2$ ), 68,46 ( $\text{CH}_2\text{CHS}$ ), 67,48 ( $\text{CHSO}_2$ ), 39,31 ( $\text{CH}_3$ ).

#### Microanálisis

calculado (%): 33,20 C; 4,38 H; 5,53 N; 12,66 S; 44,23 O  
experimental (%): 33,45 C; 4,34 H; 5,52 N; 12,69 S; 44,43 O

Espectrometría de masas (LC-(ApcI)MS a 20V): 254 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

Punto de fusión: 173 °C por DSC

#### EJEMPLO 6

Método para la obtención de S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato (6)

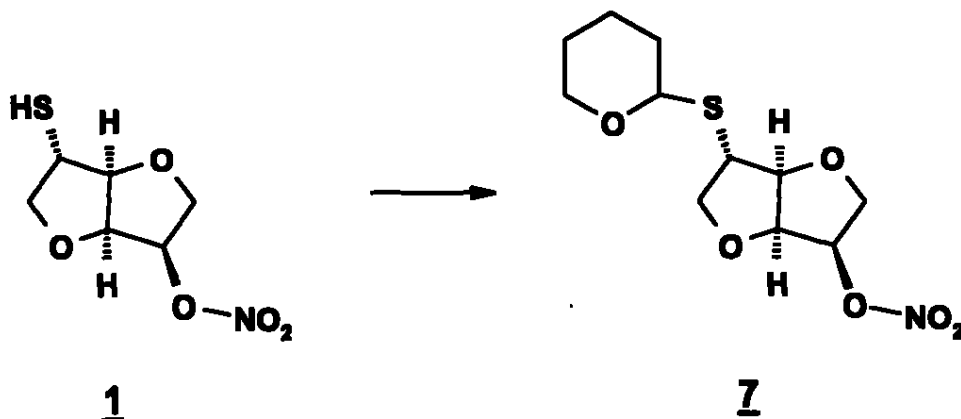


<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 5,40-5,25 (sc, 1H, CHONO<sub>2</sub>), 4,84-4,64 (sc, 2H, CHSNO, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,40-4,30 (m, 2H, H-CHCHSNO, CHCHSNO), 4,12 (dd, 1H, J=11,4 Hz, J=2,6 Hz, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 4,00-3,80 (sc, 2H, H-CHCHSNO, H-CHCHONO<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz): 88,2 ( $\text{CHCHSNO}$ ), 81,9+81,1 ( $\text{CHCHONO}_2$ ,  $\text{CHONO}_2$ ), 73,4 ( $\text{CH}_2\text{CHSNO}$ ), 69,5 ( $\text{CH}_2\text{CHONO}_2$ ), 51,6 ( $\text{CHSNO}$ ).

## EJEMPL 7

Método para la obtención de 2-(tetrahidropiran-2-il-tio)isossorbida 5-mononitrato (7)



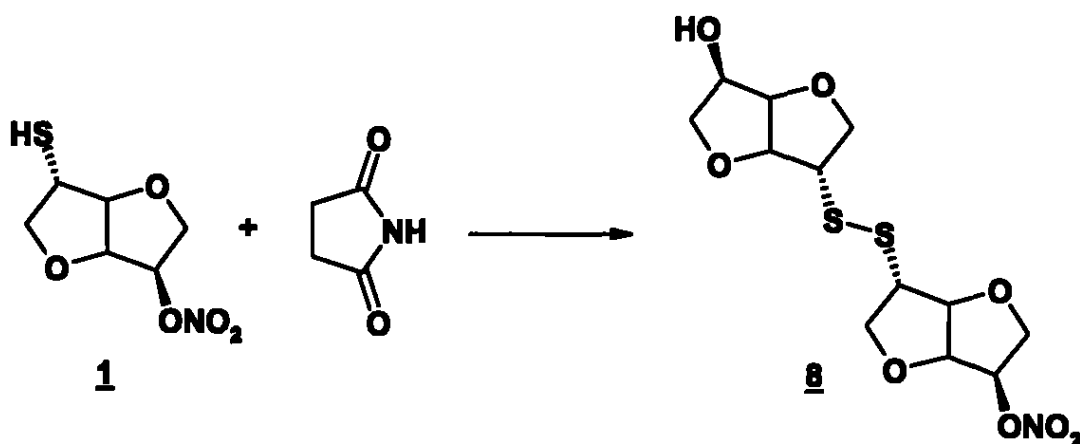
Se suspendieron 0,5 g (2,41 mmol) de 2-tioisossorbida 5-mononitrato (1), obtenidos de acuerdo con el ejemplo 1, en 6 mL de 3,4-dihidro-2H-pirano y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. Se añadieron 0,10 g (0,40 mmol) de p-toluenesulfonato de piridinio y se agitó a temperatura ambiente durante una noche bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 50 mL de EtOEt y se lavó la mezcla con 2 x 40 mL de una solución saturada de NaCl. Se obtuvieron 1,15 g de un crudo de reacción que se purificó por cromatografía (Hx:AcOEt = 3:2) rindiendo 0,65 g del producto de interés con una pureza del 83%. La recristalización con hexano rindió 0,45 g del producto con una pureza del 95%, identificado por sus datos espectroscópicos como 2-(tetrahidropiran-2-il)-2-tioisossorbida 5-mononitrato (7).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz): 5,28 (ddd, 1H,  $J=11,0\text{Hz}$ , 5,4Hz, 2,8Hz,  $\text{CHONO}_2$ ), 5,0-4,85 (sc, 2H,  $\text{CHSTHP}$ ,  $\text{CHCHONO}_2$ ), 4,59 (dd, 1H,  $J=11,2\text{Hz}$ , 4,6Hz,  $\text{CHCHSTHP}$ ), 4,20-3,80 (sc, 5H,  $\text{CH}_2\text{CHSTHP}$ ,  $\text{H-CHCHONO}_2$ ,  $\text{CH}_2_{\text{THP}}$ ), 3,60-3,40 (sc, 2H,  $\text{H-CHCHONO}_2$ ,  $\text{CH}_{\text{THP}}$ ), 2,00-1,45 (sc, 6H,  $3\text{CH}_2_{\text{THP}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz): 89,5 and 89,1 (CHCHS), 83,0 and 81,6 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81,4 and 81,3 (CHSTHP, CHONO<sub>2</sub>), 74,9 and 74,1 (CH<sub>2</sub> THP), 69,0 and 68,9 (CH<sub>2</sub>CHSTHP), 64,8 and 64,7 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 49,1 and 47,6 (CH<sub>2</sub> THP), 31,3 and 31,2 (CH<sub>2</sub> THP), 25,4 (CH<sub>2</sub> THP), 21,7 and 21,6 (CH<sub>2</sub> THP).

### EJEMPLO 8

Método para la obtención de 2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato (8)



Se añadió una solución de 0,170 g (1,72 mmol) de succinimida en EtOH a 0,323 g (1,56 mmol) de 2-tioisosorbida 5-mononitrato (1). Tras la aparición de un precipitado blanco, se añadieron 0,168 mg (2 mmol) de NaHCO<sub>3</sub>. Tras agitación a temperatura ambiente durante 3 horas y 45 minutos, se añadieron otros 100 mg (1,19 mmol) de NaHCO<sub>3</sub> y 10 gotas de agua. Tras otra hora y 30 minutos de agitación, se llevó la mezcla a reflujo. Tras dos horas a reflujo, se eliminó el EtOH a presión reducida, se añadieron 150 mL de agua y 150 mL de AcOEt. Se formó una emulsión y se añadió NaCl<sub>(s)</sub> hasta que decantaron las dos fases. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se lavó con 2 x 150 mL porciones de AcOEt. Cada una de las tres fases orgánicas se lavó por separado con 100 mL de agua y las fases orgánicas se combinaron y secaron

sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Se filtró, se lavó con  $\text{AcOEt}$  y se eliminó el disolvente de la filtración a presión reducida, obteniéndose así 336 mg de un crudo de reacción que se purificó por cromatografía "flash". Para la separación cromatográfica se usó una mezcla de 1:1  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$  como eluyente y se obtuvo una fracción de 98 mg del producto de interés (8).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,40-5,32 (1H, cs,  $\text{CHONO}_2$ ), 5,04-4,98 (1H, cs,  $\text{CHCHONO}_2$ ), 4,70-4,60 (3H, cs, 3CH), 4,36-4,26 (1H, cs,  $\text{CHOH}$ ), 4,22-4,12 (2H, cs, 2H-CH), 4,10-4,00 (3H, cs, 3H-CH), 3,94-3,86 (2H, cs, 2H-CH), 3,68-3,56 (3H, cs, 2CH-S, 1 H-CH), 2,55 (1H, d,  $J=6,9$  Hz, OH).

**Espectroscopia infrarroja (en pastilla KBr):** 3461  $\text{cm}^{-1}$ , 2987  $\text{cm}^{-1}$ , 1642  $\text{cm}^{-1}$ , 1465  $\text{cm}^{-1}$ , 1279  $\text{cm}^{-1}$ , 1077  $\text{cm}^{-1}$ , 846  $\text{cm}^{-1}$ .

**Microanálisis:**

experimental (%): 39,53 C, 34,70 H, 4,77 O, 3,96 N, 17,04 S.

calculado(%): 39,23 C, 34,84 H, 4,66 O, 3,81 N, 17,45 S.

**Espectrometría en masa:**

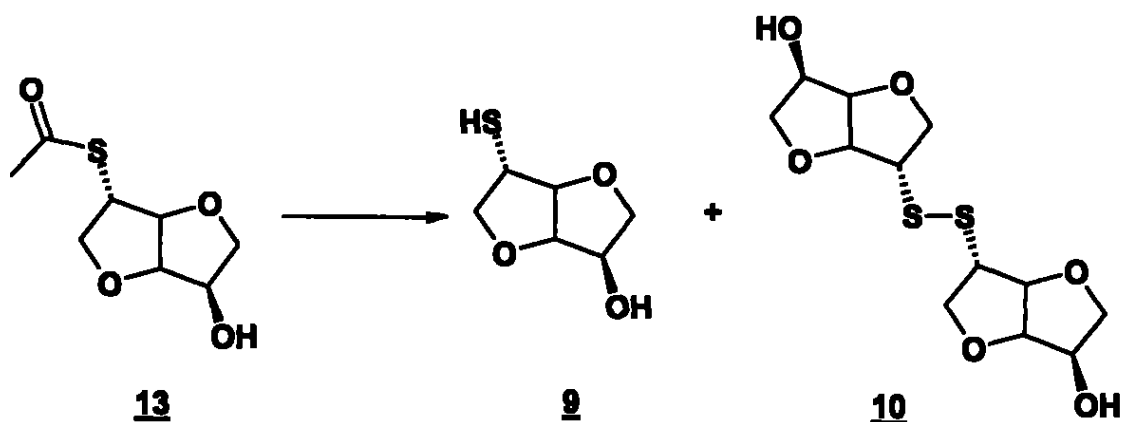
Electrospray: 368(M+1).

Impacto electrónico(m/z, (% abundancia relativa)): 367 (7,4)(M+), 261 (3,8), 160 (8,6), 129 (15,5), 127(14,2), 85 (35,7), 69 (100).

**EJEMPLO 9**

**Paso 1**

**Método para la obtención de 2-tioisossorbida (9) y 2,2'-ditiodiisossorbida (10)**



En un matraz de 500 mL, se disolvieron 15 g (74 mmol) de 2-acetiltioisisorbida (13) obtenidos de acuerdo con WO 00/20420 en 225 mL de EtOH. Se añadió una disolución de 11,3 g de KOH del 85 % en 150 mL de agua. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se neutralizó con  $\text{AcOH}_{(c)}$  y se eliminó el EtOH a presión reducida. La solución resultante se llevó a pH básico mediante la adición de  $\text{NaOH}_{(s)}$  y se agitó a temperatura ambiente mientras que se burbujeara una corriente de aire a través de la solución durante 10 horas. Se acidificó la solución con  $\text{HCl}_{(c)}$  y se llevó a pH=4. Se eliminó el agua a presión reducida y el residuo resultante se volvió a disolver en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , filtrado y secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La solución se filtró, lavó y se eliminó el disolvente de la filtración a presión reducida, obteniéndose así 9,22 g de un crudo de reacción que se purificó mediante cromatografía "flash" utilizando como eluyente diferentes mezclas de ciclohexano/acetato de etilo. La elución se inició con 3 L de mezcla 1:1 y, después de ello, el porcentaje del disolvente polar aumentó, primero con 2 L de mezcla 3:5, posteriormente con 2 L de mezcla 1:2 y finalmente se eluyó únicamente con AcOEt. Del eluato se aislaron 2,64 g del tiol (9) y otros 3,06 g del disulfuro (10).

**2-Thioisisorbida (9)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,68-4,58 (1H, cs, CHCHOH), 4,48-4,40 (1H, cs, CHCHSH), 4,34-4,18 (1H, bs, s.a. D<sub>2</sub>O, CHOH), 4,16-4,06 (1H, m H-CHCHSH), 3,96-3,78 (2H, cs, H-CHCHOH, H-CHCHSH), 3,62-3,50 (1H, cs, 1 H-CHCHOH), 3,48-3,36 (1H, cs, s.a. D<sub>2</sub>O, CHS), 2,80-2,60 (1H, bs, d.a. D<sub>2</sub>O, OH), 1,75 (1H, d, J=8 Hz, d.a. D<sub>2</sub>O, SH).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 90,42 (CHCHSH), 81,47 (CHCHOH), 76,27 (CH<sub>2</sub>CHSH), 74,00 (CH<sub>2</sub>CHOH), 72,04 (CHOH), 43,81 (CHSH).

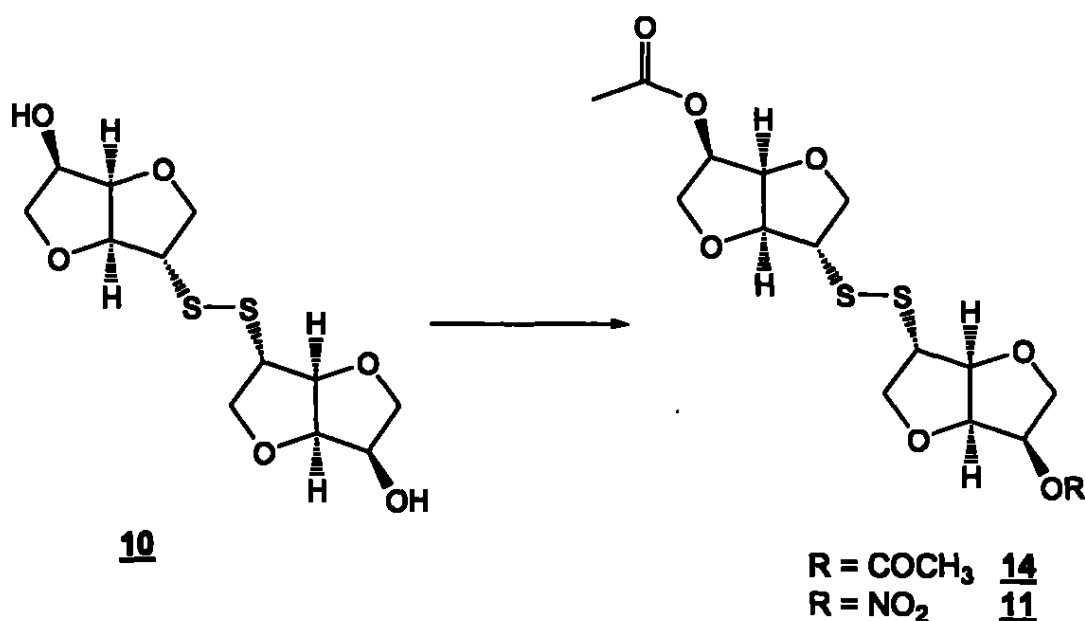
**2,2'-Ditiodiisisorbida (10)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,68-4,56 (4H, cs, 2CHCHS, 2CHCHOH), 4,34-4,19 (2H, cs, s.a. D<sub>2</sub>O, 2 CHOH), 4,19-3,97 (4H, cs, 2CH<sub>2</sub>CHS), 3,92-3,80 (2H, cs, 2H-CHCHOH), 3,66-3,52 (4H, cs, 2H-CHCHOH, 2CHS), 2,63 (2H, d, J=6,6 Hz, d.a. D<sub>2</sub>O, 2OH).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 87,42 (2CHCHS), 81,98 (2CHCHOH), 73,93 (2CH<sub>2</sub>CHOH), 72,89 (2CH<sub>2</sub>CHS), 72,07 (2CHOH), 54,74 (2CHS).

**Paso 2**

**Método para la obtención de 5,5'-diacetiloxi-2,2'-ditiodiisisorbida (14) y 2-(5'-acetiloxiisisorbidil-2'-ditio)isisorbida 5-mononitrato (11)**



Se preparó una mezcla de nitración mediante la adición, lenta y cuidadosa, a 0 °C de 1,8 mL de HNO<sub>3</sub> al 60% a una mezcla de 7,5 mL de anhídrido acético y 12,5 mL de ácido acético. En un matraz de 100 mL acondicionado con un refrigerante en reflujo, termómetro y un agitador magnético, se disolvieron 2,77 g (8,6 mmol) de 2,2'-ditio-disosorbida (10), obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 8, en 17 mL de ácido acético y se añadieron 3,5 mL de anhídrido acético. La mezcla se enfrió a una temperatura de 0 °C en un baño de hielo y sal. Se añadieron durante 15 minutos, gota a gota, 4 mL de la mezcla de nitración previamente preparada. Se agitó a 0 °C durante 2 horas, observando la solidificación del crudo de reacción. Posteriormente, se agitó durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente. El crudo de reacción se vertió sobre 100 mL de agua, se filtró y se lavó con suficiente cantidad de agua. El sólido resultante se secó a presión reducida en presencia de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Se obtuvieron 2,69 g de un crudo de reacción que se purificó mediante cromatografía preparativa de fase reversa. Se utilizó como eluyente una mezcla 1:1 acetonitrilo:agua. Se aisló una fracción de 1,01 g del diacetato (14) (R=COCH<sub>3</sub>) y otra fracción de 0,5 g de acetato-nitrato (11) (R=NO<sub>2</sub>).

**5,5'-diacetiloxi-2,2'-ditiodiisossorbida (R=COCH<sub>3</sub>) (14)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,16-5,02 (2H, cs, 2CHOCO), 4,85-4,76 (2H, cs, 2CH-O-C), 4,63-4,56 (2H, cs, 2CHOC), 4,17-4,05 (2H, cs, 2H-CH), 4,00-3,74 (6H, cs, 6 H-CH), 3,56-3,48 (2H, cs, 2CHS), 2,09 (6H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,27 (2CO), 87,73 (2CHCHS), 80,76 (2CHCHO), 73,79 (2CHO), 72,66 (2CH<sub>2</sub>CHS), 70,46 (2CH<sub>2</sub>CHO), 54,42 (2CHS), 20,63 (2CH<sub>3</sub>).

**2-(5'-Acetiloxiisossorbidil-2'-ditio)isossorbida 5-mononitrato (R=NO<sub>2</sub>) (11)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,37-5,28 (1H, cs, CHONO<sub>2</sub>), 5,18-5,06 (1H, cs, CHOCO), 5,02-4,94 (1H, cs, CHOC), 4,87-4,78 (1H, cs, CHOC), 4,64-4,56 (2H, cs, 2 CHOC), 4,18-3,75 (8H, cs, 4CH<sub>2</sub>), 3,59-3,50 (2H, cs, 2 CHS), 2,10 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,29 (CO), 88,25 (CH), 87,43 (CH), 81,58 (CH), 81,16 (CH), 80,79 (CH), 73,80 (CH), 72,78 (CH<sub>2</sub>), 72,66 (CH<sub>2</sub>), 70,51 (CH<sub>2</sub>), 69,32 (CH<sub>2</sub>), 54,42 (CHS), 53,72 (CHS), 20,65 (CH<sub>3</sub>).

**Espectrometría de masas:**

Ionización química (NH<sub>3</sub>): 410 (M+1)<sup>+</sup>, 427 (M+18)<sup>+</sup>.

**Ensayos para vasorelajación**

El método utilizado en los ensayos es sustancialmente el mismo que el descrito en las siguientes referencias:

\* Furchgot, R.F., "Methods in nitric oxide research"; Feelisch & Stamler, eds., John Wiley & Sons, Chichester, England, pp 567-581.

\* Trongvanbichnam K., et al., Jpn. J. Pharmacol. 71 (1996); 167-173.

\* Salas, E., et al., Eur. J. Pharmacol. 258 (1994); 47-55.

Los diferentes compuestos se someten a ensayo a 5 concentraciones diferentes, con un rango de concentración que oscila entre 0,0001 y 10 mM, utilizando entre 6 y 9 anillos arteriales para cada compuesto. Los resultados obtenidos se comparan con los de 5-mononitrato de isosorbida, que se utiliza como producto de referencia.

Los resultados se muestran en la tabla 1 a continuación y se expresan como EC<sub>50</sub> (concentración efectiva 50), que es la concentración de cada uno de los compuestos sometidos a ensayo que producen una vasodilatación igual al 50% del tono máximo al que el anillo arterial se ha contraído con 1 µM de Fenilefrina .

| Tabla 1.- Ensayo de vasorelajación |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Compuesto                          | EC <sub>50</sub> mM (media ± d.e.) |
| 5-mononitrato de isosorbida        | 0,92 ± 0,2                         |
| (1)                                | 0,041 ± 0,006                      |
| (2)                                | 0,0053 ± 0,001                     |
| (3)                                | 0,043 ± 0,006                      |
| (4)                                | 0,338 ± 0,01                       |
| (6)                                | 0,0012 ± 0,0001                    |
| (7)                                | 0,05 ± 0,009                       |
| (9)                                | 0,024 ± 0,005                      |
| (12)                               | 0,023 ± 0,010                      |

Como puede observarse en la tabla, todos los compuestos ensayados son más potentes como vasorelajantes que el producto de referencia.

#### **Ensayo in vitro de la inhibición de la agregación de plaquetas**

El método empleado en los ensayos es sustancialmente el mismo que el descrito en la siguiente referencia:

\* Salas, E., et al., Br. J. Pharmacol. 112 (1994); 1071-1076.

Los compuestos se someten a ensayo a cuatro concentraciones diferentes, utilizando plasma rico en plaquetas obtenido de por lo menos 6 donantes sanos diferentes. Los resultados obtenidos se comparan con los de 5-mononitrato de isosorbida, que se utiliza como producto de referencia.

Los resultados se muestran en la tabla 2 y se expresan como  $IC_{50}$  (concentración inhibidora 50), que es la concentración de cada compuesto sometido a ensayo que produce una inhibición igual al 50% de la agregación obtenida mediante una concentración submáxima (1-4  $\mu M$ ) de ADP (una concentración submáxima de ADP es la cantidad mínima de ADP que produce la agregación máxima).

---

| Tabla 2.- Ensayo de inhibición de la agregación de las plaquetas (Plasma humano rico en plaquetas) |                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Compuesto                                                                                          | IC <sub>50</sub> mM (media ± d.e.) |
| 5-mononitrato de isosorbida                                                                        | 2,68 ± 0,33                        |
| (1)                                                                                                | 0,11 ± 0,01                        |
| (2)                                                                                                | 0,01 ± 0,007                       |
| (3)                                                                                                | 0,41 ± 0,09                        |
| (4)                                                                                                | 1,00 ± 0,01                        |
| (4bis)                                                                                             | 0,85 ± 0,15                        |
| (6)                                                                                                | 0,0019 ± 0,0005                    |
| (7)                                                                                                | 0,58 ± 0,021                       |
| (12)                                                                                               | 0,089 ± 0,01                       |

Como puede observarse en la tabla 2, todos los compuestos ensayados tienen una potente actividad inhibidora de la agregación de plaquetas, actividad que resulta superior a la del compuesto de referencia.

**Inhibición de adhesión de monocito humano y plaquetas a células endoteliales humanas**

Los métodos utilizados en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos sobre la adhesión de plaquetas y monocito a células endoteliales humanas son sustancialmente iguales a los descritos en las siguientes referencias:

Del Maschio A. et al., J Cell Biol 1996; 135: 497-510  
 Bombeli T. et al., Blood 1999; 93: 3831-3838  
 Colomé C. et al; Atherosclerosis 2000; 149: 295-302; and  
 Martin-Satue M. et al; British Journal of Cancer 1999; 80; 1169-1174

La adhesión de las células monocíticas U937 a células endoteliales confluentes de la microvasculatura humana (HMEC-

1) activadas mediante TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) y de las plaquetas a células endoteliales humanas umbilicales (HUVEC) fueron los métodos utilizados para determinar el efecto inhibitor de los compuestos sobre la adhesión celular. La adhesión de los monocitos previamente marcados con calcein-AM (Molecular Probes) a HMEC-1 activado mediante TNF- $\alpha$ , fue evaluada mediante la determinación de la fluorescencia celular asociada. La adhesión de plaquetas humanas lavadas previamente marcadas con MoAb contra CD36-FITC a HUVEC activado (50  $\mu$ g/ml de LDL mínimamente modificado, LDLmm) fue determinada mediante Citometría de Escaneado Láser (LSC, Olympus), determinando la fluorescencia celular asociada. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición con respecto del control (adhesión de las células en ausencia de compuestos). La tabla 3 muestra el efecto de los compuestos sobre la adhesión de U937 a HMEC-1 activado. La tabla 4 muestra el efecto de los compuestos sobre la adhesión de plaquetas a HUVEC activado.

Tabla 3

| Inhibición de adhesión de monocito U937 a células endoteliales humanas activadas HMEC-1 |                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Compuesto                                                                               | % de inhibición a control<br>(media $\pm$ e.e.m.) |
| (1)                                                                                     | 30 $\pm$ 8                                        |
| (12)                                                                                    | 15 $\pm$ 2                                        |

Tabla 4

| Inhibición de adhesión de plaquetas a HUVEC activado mediante LDLmm (50 $\mu$ g/ml) |                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Compuesto                                                                           | % de inhibición a control<br>(media $\pm$ e.e.m.) |
| (12)                                                                                | 87,5% $\pm$ 5,1%                                  |

# **Inhibición de transcitosiis de LDL en células endoteliales microvasculares humanas**

El método utilizado en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos en la transcitosiis de LDL en células endoteliales microvasculares humanas es sustancialmente el mismo que el descrito en Colomé C. et al; Atherosclerosis 2000; 149: 295-302. Este ensayo permite predecir el potencial anti-aterosclerótico de los compuestos, ya que la acumulación de LDL en la pared vascular como consecuencia del transporte activo de una célula endotelial vascular es uno de los primeros pasos en el desarrollo de la aterosclerosis.

El método empleado en los ensayos para aislar las partículas de LDL a partir de plasma humano fresco y el marcado con Dil es sustancialmente igual al descrito en Pedreño J. et al., Atherosclerosis 2001; 155: 99-112, y Stephan Z.F. y Yuracheck E.C. J. Lipid Res. 1993; 34:325-330

HMEC-1 activadas (100  $\mu$ M histamina) y no activadas fueron cultivadas hasta alcanzar confluencia en el pozo superior de insertos de cocultivo (Falcon HTS FluorBloK). Posteriormente, se añadió LDL-Dil (hasta 200  $\mu$ g/ml) y se incubaron las células durante 2 h en presencia y ausencia de los compuestos. Tras esas dos horas, se evaluó la transcitosiis de partículas LDL-Dil a través de células endoteliales mediante la determinación de la presencia de fluorescencia en el pozo inferior del inserto de cocultivo. Los resultados se expresan en forma de porcentaje de inhibición con respecto del control (en ausencia de compuestos). La tabla 5 muestra el efecto de los compuestos en la transcitosiis LDL-Dil a través de HMEC-1.

Tabla 5

| Inhibición de transcitosis LDL en células endoteliales microvasculares humanas (% de inhibición a control (media $\pm$ e.e.m.)) |                   |                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| Compuesto                                                                                                                       | Células en reposo | Células estimuladas |
| (1)                                                                                                                             | 58 $\pm$ 15       | 122 $\pm$ 8         |
| (12)                                                                                                                            | 51 $\pm$ 19       | 80 $\pm$ 12         |

#### Inhibición de oxidación LDL

El método utilizado en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos sobre la oxidación LDL es sustancialmente el mismo que el descrito en las siguientes referencias:

Spranger T., et al., Chem. Phys. Lipids 1998 ; 91 :39-52

Lynch S.M., et al., Biochim. Biophys. Acta 2000; 1485:11-22

Pedreño J., et al., Thromb. Res. 2000; 99: 51-60.

El método utilizado en los ensayos para aislar las partículas LDL del plasma humano fresco es sustancialmente igual al descrito en Pedreño J., et al., Atherosclerosis 2001; 155: 99-112.

La modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es considerada actualmente como el acontecimiento central del desarrollo de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. La exposición de LDL a hemina libre de globina (el complejo de ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) con protoporfirina IX), derivada de la hemoglobina de los eritrocitos circulantes sirve de fuente fisiológica del pro-oxidante  $\text{Fe}^{3+}$  capaz de promover la oxidación de LDL. Los compuestos se añaden in vitro para determinar su actividad inhibidora en la oxidación LDL inducida por la hemina y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se incubó LDL a una concentración final de proteína de 0,2 mg/ml en presencia de 2,5  $\mu\text{M}$  de hemina y 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . La

modificación oxidativa de las partículas LDL fue evaluada mediante la medición de los dienos conjugados. Las muestras experimentales fueron incubadas a 37 °C y el aumento de la absorbancia a 234 nm fue registrado automáticamente cada 5 min durante al menos 5 h. El efecto de los compuestos sobre la oxidación LDL inducida por la hemina fue sometido a ensayo a 7 concentraciones diferentes utilizando preparados de LDL de 7 donantes sanos diferentes. La tabla 6 muestra la actividad inhibidora de los compuestos a 10  $\mu$ M expresada como el porcentaje de aumento del lag phase (tiempo que se requiere para que se inicie la reacción de formación de dienos conjugados) con respecto al control.

Tabla 6

| Inhibición de oxidación LDL |                                                                                  |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Compuesto                   | % de incremento del lag phase<br>con respecto al control<br>(media $\pm$ e.e.m.) |
| 5-mononitrato de isosorbida | 0                                                                                |
| (1)                         | 290 $\pm$ 8                                                                      |
| (12)                        | 117 $\pm$ 56                                                                     |

#### Inhibición de oxidación de plasma

El método utilizado en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos sobre la capacidad de oxidación del plasma es sustancialmente igual al descrito en Spranger T. et al., Chem Phys Lipids 1998; 91: 39-52.

La oxidación de lipoproteínas inducida in vitro en plasma pretende representar un modelo relevante de la oxidación de lipoproteínas en la pared arterial. La oxidación de las lipoproteínas plasmáticas fue evaluada como la capacidad de

oxidación del plasma heparinizado y se midió mediante espectrofotometría como un aumento en la absorbancia a 234 nm. Se añadieron los compuestos in vitro para determinar su actividad inhibidora sobre la capacidad de oxidación del plasma inducido por  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ). El plasma heparinizado fue diluido con solución salina tampón fosfato (PBS) que contenía 0,16 M de NaCl y la oxidación se inició con 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Se incubaron las muestras experimentales a 37 °C y el aumento en la absorbancia a 234 nm fue registrado automáticamente cada 15 minutos durante al menos 12 h. El efecto de los compuestos sobre la capacidad de oxidación del plasma inducido por  $\text{Cu}^{2+}$  fue sometido a ensayo a 7 concentraciones diferentes utilizando plasma heparinizado de 7 donantes sanos diferentes. La tabla 7 muestra la actividad inhibidora de los compuestos a 10  $\mu\text{M}$  expresada como el porcentaje de aumento del lag phase con respecto al control.

Tabla 7

| Inhibición de oxidación de plasma |                                                                            |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Compuesto                         | % de incremento del lag phase con respecto al control (media $\pm$ e.e.m.) |
| (1)                               | 245 $\pm$ 26                                                               |
| (2)                               | 7 $\pm$ 1                                                                  |
| (12)                              | 200 $\pm$ 10                                                               |
| 5-mononitrato de isosorbida       | 0                                                                          |

#### Efecto preventivo y curativo sobre la aterogénesis en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Shore B, Shore V. en: Day CE (ed) Atherosclerosis Drug Discovery, Plenum Press, New York and London, pp 123-141, 1976.

Se mantuvieron veintiún machos de conejo blanco de Nueva Zelanda (de 10 semanas de edad al principio del protocolo) bajo condiciones estándar (22 °C, 40% a 60% de humedad) con ciclos día / noche regulares y acceso libre a agua. Los animales fueron asignados a 1 de los 3 grupos de manera aleatoria. El grupo 1 (n=5) recibió una dieta de mantenimiento estándar durante 75 días; el grupo 2 (n=16) recibió la misma dieta pero con un suplemento del 1% (peso/peso) de colesterol durante 45 días. Al final de este periodo, se dividió el grupo 2 en dos grupos aleatorios. El grupo tratado (n=9) recibió durante otros 30 días 1,9 mg/kg/día del compuesto 12 (manteniendo el 1% de colesterol en su dieta) y el grupo no tratado (n=7) recibió una dieta con un 1% de colesterol durante otros 30 días.

Las variables del estudio incluían triglicéridos y colesterol total. Los animales fueron sacrificados al día 75 tras el inicio del protocolo con pentobarbital i.v. Se extrajo la aorta completa hasta 1 o 2 cm de las arterias ilíacas y se fijó en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) con glutaraldehído (4%). Los análisis macroscópico y microscópico de las muestras se llevaron a cabo de manera ciega. Se diseccionaron las aortas y se tiñeron con Red Oil. Se eliminó la grasa adventicia y se abrieron las aortas longitudinalmente, se sumergieron en una solución de Red oil durante la noche, se lavaron con propilenglicol y se fijaron sobre una superficie plana. Se tomaron imágenes de las aortas con una cámara estándar. Posteriormente, se tomaron tres secciones de la zona del arco aórtico, la aorta torácica y la aorta abdominal (orificios renales). Se fijaron las secciones con parafina, se cortaron con un microtomo Ultracut (España) y se tiñeron de forma convencional con hematosilina eosina. Se tomaron imágenes de las aortas teñidas con Red Oil y hematosilina eosina con una cámara estándar. Se importaron dichas imágenes a la aplicación Photoshop (Adobe) mediante un escáner de diapositivas AGFA. Mediante el procedimiento previamente

descrito por Lillie RD (Lillie, R.D., 1994, Stain Technology, vol. 19, pp 55) se determinó la superficie de lesión en toda la aorta y el grosor de la íntima en cortes histológicos. La superficie o área de la lesión arteriosclerótica (evaluada a partir de las aortas teñidas con el Red Oil) se determinó por el número de píxeles de la imagen convertidos a  $\text{mm}^2$ . El grosor de la íntima arterial (evaluado a partir de las muestras histológicas teñidas con Hematosilina-Eosina) se cuantificó en mm de forma similar a como se describe para la superficie o área de la lesión aterosclerótica. Para ello, se seleccionaron las secciones que contenían lesiones de estrías grasas y se determinó el grosor de la íntima (desde la media arterial hasta el endotelio). El grosor medio de la zona de lesión fue evaluado en secciones representativas por cuadrante aórtico y se calculó la media estadística. La tabla 8 muestra los niveles plasmáticos en ayunas del colesterol total, del colesterol HDL y de los triglicéridos. El examen estadístico (t de Student) no reveló diferencia significativa alguna entre el grupo medicado y el grupo control (el grupo no medicado pero con dieta alta en colesterol) en lo que respecta a los lípidos plasmáticos.

Tabla 8

| Perfil de lípidos plasmáticos [mg/dl] (media $\pm$ e.e.m.) |              |                  |                                       |                |
|------------------------------------------------------------|--------------|------------------|---------------------------------------|----------------|
|                                                            | Control      |                  | Tratado con el compuesto ejemplo (12) |                |
|                                                            | Basal        | Final            | Basal                                 | Final          |
| Colesterol total                                           | 42 $\pm$ 4,4 | 1073,9 $\pm$ 4,9 | 33,3 $\pm$ 4,1                        | 1461 $\pm$ 147 |
| Triglicéridos                                              | 185 $\pm$ 50 | 312,7 $\pm$ 130  | 121 $\pm$ 34                          | 347 $\pm$ 82   |

El porcentaje de superficie cubierta por la lesión aterosclerótica se muestra en la tabla 9.

Tabla 9

| Lesiones ateroscleróticas             |                                                                             |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Grupo                                 | Porcentaje de área de lesiones ateroscleróticas (%)<br>(media $\pm$ e.e.m.) |
| Control                               | 62 $\pm$ 6                                                                  |
| Tratado con el compuesto ejemplo (12) | 15 $\pm$ 3                                                                  |

El grosor de la capa de íntima de la aorta se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

| Grosor de la capa de la íntima de la aorta |                                |
|--------------------------------------------|--------------------------------|
| Grupo                                      | Grosor mm (media $\pm$ e.e.m.) |
| Control                                    | 0,323 $\pm$ 0,013              |
| Tratado con el compuesto ejemplo (12)      | 0,096 $\pm$ 0,009              |

En la tabla 8 se muestra que no existía diferencia alguna en los lípidos plasmáticos entre el grupo de control y el medicado, por lo que se demuestra que el compuesto (12) no tuvo influencia sobre el metabolismo de lípidos. Tal y como se puede ver en la tabla 9 y en la tabla 10, tanto el porcentaje de área de las lesiones ateroscleróticas como el grosor de íntima fueron reducidos significativamente en el grupo tratado con el compuesto (12) en comparación con el grupo de control.

**Efecto preventivo y curativo en aterogénesis en ratón deficiente de apo E.**

El efecto preventivo y terapéutico de los presentes compuestos sobre la aterosclerosis se ilustrará también a través del siguiente ejemplo.

El efecto preventivo y curativo de la aterogénesis de los compuestos se investigó en el modelo de ratón deficiente de apo E alimentado con dieta estándar. Se alimentaron ratones hembras y machos con deficiencia de apo E (OLA129X C57/BL6J) de tres meses de edad con dieta estándar. El grupo control incluía 8 ratones machos y 7 ratones hembras, mientras que el grupo tratado consistía en 8 ratones machos y 7 ratones hembras. Todos los animales tenían niveles de colesterol y peso corporal similares al comienzo del experimento. Tanto el grupo de control como el tratado fueron estudiados durante 12 semanas. El grupo de control recibió 5 mg/Kg/día del compuesto (12).

Los parámetros de lípidos plasmáticos (colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos) y el estrés oxidativo (medido como niveles de 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$ ) fueron medidos a intervalos predeterminados. Tras la finalización del periodo de administración, la aorta torácica fue aislada y teñida para determinar el área de las lesiones ateroscleróticas depositadas en la pared interna del vaso sanguíneo de acuerdo con el método de Red Oil (Lillie, R.D., 1994, Stain Technology, vol. 19, pp 55).

Los niveles plasmáticos en ayunas del colesterol total, el colesterol HDL, los triglicéridos y los niveles de 8-iso-prostaglandina F2 $\alpha$  se muestran en la tabla 11.

---

Tabla 11

| Parámetros de lípidos plasmáticos y de estrés oxidativo<br>(media $\pm$ d.e.) |                |                                     |               |                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|
|                                                                               | Macho          |                                     | Hembra        |                                     |
|                                                                               | Control        | Tratado<br>con<br>compuesto<br>(12) | Control       | Tratado<br>con<br>compuesto<br>(12) |
| Colesterol total<br>(mmol.L-1)                                                | 14,3 $\pm$ 2   | 18 $\pm$ 3                          | 9,5 $\pm$ 2   | 11,3 $\pm$ 1,5                      |
| Colesterol HDL<br>(mmol.L-1)                                                  | 0,5 $\pm$ 0,15 | 0,47 $\pm$ 0,15                     | 0,4 $\pm$ 0,1 | 0,48 $\pm$ 0,13                     |
| Triglicéridos<br>(mmol.L-1)                                                   | 2,6 $\pm$ 0,6  | 1,5 $\pm$ 0,4                       | 1,9 $\pm$ 0,6 | 1,3 $\pm$ 0,2                       |
| 8-iso-<br>prostaglandina<br>F2 $\alpha$<br>(pg.mL-1)                          | 273 $\pm$ 19   | 101 $\pm$ 13                        | 182 $\pm$ 19  | 99 $\pm$ 7                          |

El porcentaje de área cubierta por las lesiones ateroscleróticas depositadas en la pared interna del vaso sanguíneo y el área cubierta con macrófagos se muestra en la tabla 12.

Tabla 12

| Grupo                                       | Area cubierta con<br>macrófagos [ $\mu\text{m}^2$ ]<br>(media $\pm$ e.e.m.) | Area de lesiones<br>ateroscleróticas [ $\mu\text{m}^2$ ]<br>(media $\pm$ e.e.m.) |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Control                                     | 80 $\pm$ 27                                                                 | 60 $\pm$ 8                                                                       |
| Tratado con el<br>compuesto<br>ejemplo (12) | 55 $\pm$ 19                                                                 | 45 $\pm$ 9                                                                       |

En la tabla 11 se muestra que el compuesto (12) es capaz de descender los niveles de triglicéridos en el plasma, así como el estrés oxidativo de estos animales. En la tabla 12 se muestra cómo el compuesto (12) reduce tanto el área de lesiones arterioscleróticas como el área cubierta con macrófagos.

#### Efecto antitrombótico in vivo

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Kurz (Kurz K.D., et al., Thromb. Res. 1990, 60:269-280) y modificado por Feuerstein (Feuerstein G.Z., et al., Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 2554-25562).

Las ratas recibieron una única dosis oral de 100 mg/Kg de los compuestos.

Cuarenta y cinco minutos después de administrarse la dosis, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y fueron colocadas posteriormente de manera dorsal sobre una mesa quirúrgica calentada (37 °C).

Se aisló la arteria carótida izquierda y se colocó bajo ésta una lámina de Parafilm M (7 x 20 mm, American National Can). Se colocó una sonda electromagnética de flujo (Transonic Systems Inc.) en la arteria para medir el flujo de sangre.

Sesenta minutos tras la administración del producto, se colocó (y no se retiró durante todo el experimento) un parche de papel de filtro saturado con una solución de  $\text{FeCl}_3$  (70%) sobre la arteria carótida izquierda y distal a de la sonda de flujo para iniciar la trombosis. Se controló el flujo de sangre durante los 60 min posteriores a la aplicación del parche en la arteria.

Se consideró que el vaso se había ocluido totalmente por el trombo formado cuando se detectó ausencia del flujo sanguíneo (0,0 ml/min). En este modelo, la formación de trombos oclusivos normalmente tiene lugar en un plazo de 15 ó 20 minutos en animales no tratados. Se consideró que un animal estaba totalmente protegido por el tratamiento si un trombo no ocluía el vaso durante el periodo de estudio (60 min tras la aplicación continua del parche de  $\text{FeCl}_3$ ).

Los resultados se muestran en la tabla 13 y se expresan como el porcentaje de animales totalmente protegidos por el tratamiento.

Tabla 13

| Actividad antitrombótica en vivo |                                     |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Compuesto                        | % de animales totalmente protegidos |
| 1                                | 100                                 |
| 3                                | 100                                 |
| 4                                | 80                                  |
| 12                               | 71                                  |

Como puede observarse en la tabla 13, todos los compuestos sometidos a ensayo tienen una potente actividad antitrombótica in vivo.

#### **Efecto antitrombótico sinérgico in vivo**

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Kurz (Kurz K.D., et al., Thromb. Res. 1990, 60: 269-280) y modificado por Feuerstein (Feuerstein G.Z., et al., Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 2554-25562).

Ratas recibieron una única dosis oral de un compuesto ó la combinación de dos compuestos, tal y como se describe en la tabla 14. Las dosis de los compuestos utilizados no modificaron la presión arterial o la frecuencia cardiaca de los animales.

Cuarenta y cinco minutos después de administrarse la dosis, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y fueron colocadas posteriormente de manera dorsal sobre una mesa quirúrgica calentada (37 °C).

Se aisló la arteria carótida izquierda y se colocó bajo ésta una lámina de Parafilm M (7 x 20 mm, American National Can). Se colocó una sonda electromagnética de flujo (Transonic Systems Inc.) en la arteria para medir el flujo de sangre.

Sesenta minutos tras la administración del producto, se colocó (y no se retiró durante todo el experimento) un parche de papel de filtro saturado con una solución de FeCl<sub>3</sub> (70%) sobre la arteria carótida izquierda y distal a la sonda de flujo para iniciar la trombosis. Se controló el flujo de

---

sangre durante los 60 min posteriores a la aplicación del parche en la arteria.

Se consideró que el vaso se había ocluido totalmente por el trombo formado cuando se detectó ausencia de flujo sanguíneo (0,0 ml/min). En este modelo, la formación de trombos oclusivos normalmente tiene lugar en un plazo de 15 o 20 minutos en animales no tratados. Se consideró que un animal estaba totalmente protegido por el tratamiento si un trombo no ocluía el vaso durante el periodo de estudio (60 min tras la aplicación del parche de  $\text{FeCl}_3$ ).

El concepto de producto fraccional fue utilizado para identificar la sinergia entre los compuestos. De acuerdo con este concepto, si consideramos la protección completa de un animal como:

$$\text{Inhibición fraccional} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

donde A es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo tratado; y B es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo de control.

Para dos fármacos que actúan de manera independiente:

$$\text{Inhibición fraccional} = \left[1 - \left(\frac{A_1}{B} \times \frac{A_2}{B}\right)\right] \times 100$$

donde  $A_1$  es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo de tratamiento  $A_1$ ;  $A_2$  es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo de tratamiento  $A_2$ ; y B es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo control.

Si la protección obtenida con la combinación de los fármacos es superior a la inhibición fraccional para dos compuestos

actuando de manera independiente, entonces se considera que tiene lugar el sinergismo.

Los resultados se muestran en la tabla 14 y se expresan como la tasa de animales con oclusión trombótica en cada grupo.

Tabla 14

| Grupo                                                                                                                   | Tasa de animales con oclusión trombótica (% de animales protegidos) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Control                                                                                                                 | 1 (0%)                                                              |
| Acido acetil salicílico (100 mg/Kg/día, oral, durante 3 días)                                                           | 0,50 (50%)                                                          |
| Compuesto 12 (22,3 mg/Kg, oral, agudo el día de estudio)                                                                | 0,5 (50%)                                                           |
| Acido acetil salicílico (100 mg/Kg/día, oral durante 3 días) + compuesto 12 (22,3 mg/Kg, oral, agudo el día de estudio) | 0 (100%)                                                            |
| Clopidogrel (1,5 mg/Kg/día, oral durante 3 días)                                                                        | 0,0 (50%)                                                           |
| Clopidogrel (1,5 mg/Kg/día, oral durante 3 días) + compuesto 12 (22,3 mg/Kg, oral, agudo el día de estudio)             | 0,7 (83%)                                                           |

Inhibición fraccional (ácido acetil salicílico + compuesto 12) =

$$\left[ 1 - \left( \frac{0.5}{1} \times \frac{0.5}{1} \right) \right] \times 100 = 75\%$$

Dado que el porcentaje de animales protegido con la combinación de los dos fármacos (ácido acetil salicílico + compuesto 12) es superior al 75% (es de un 100%) existe un sinergismo entre los dos productos.

Inhibición fraccional (clopidogrel + compuesto (12)) =

$$\left[1 - \left(\frac{0.5}{1} \times \frac{0.5}{1}\right)\right] \times 100 = 75\%$$

Dado que el porcentaje de animales protegido con la combinación de los dos fármacos (clopidogrel + compuesto 12) es superior al 75% (es de un 83%) existe un sinergismo entre los dos productos.

**Protección in vitro contra la citotoxicidad inducida por radicales de oxígeno utilizando el método basado en XTT en células HUVEC.**

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Caveda L., et al. (J. Clin. Invest. 1996; 98: 886-893).

Para la determinación de la capacidad de inhibir la citotoxicidad inducida por radicales de oxígeno, se utilizaron células endoteliales de las venas umbilicales humanas (HUVEC). Se aislaron las HUVEC y se cultivaron en M199 y 20% FCS (Fetal Calf Serum).

El ensayo XTT se basa en la hidrólisis por las células metabólicamente activas de la sal de tetrazolio XTT para formar un producto anaranjado, el pigmento formazán formado es soluble y se cuantifica directamente mediante espectrofotometría.

Las células HUVEC fueron cultivadas hasta un estado de sub-confluencia en una placa de cultivo de 96 pozos y fueron

7/4

pretratadas con 50  $\mu$ M del compuesto durante una hora. Tras ello, las células fueron tratadas con 800  $\mu$ M de peroxinitrito durante toda la noche.

Tras la incubación nocturna, las células fueron incubadas con la solución amarilla XTT (concentración final 0.3 mg/ml) durante 4 horas. Tras este periodo de incubación, se formó la solución de formazán, la cual fue cuantificada espectrofotométricamente a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

Los resultados se muestran en la tabla 15 y se expresan como el porcentaje de células muertas.

Tabla 15

| Actividad citoprotectora in vitro |                      |
|-----------------------------------|----------------------|
| Compuesto                         | % de células muertas |
| 1                                 | 80                   |
| 2                                 | 80                   |
| 3                                 | 80                   |
| 12                                | 50                   |

Como puede observarse en la tabla 15, todos los compuestos sometidos a ensayo tienen una actividad protectora ( $p < 0,05$ ) de la célula contra daños celulares inducidos por radicales de oxígeno.

#### **Protección in vivo contra daños coronarios por isquemia-reperfusión.**

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el modelo de rata descrito previamente por Hirata Y et al (Journal of Cardiovascular Pharmacology. 1998, 31: 322-326)

Tras un periodo de ayuno alimenticio de 6 horas, los animales fueron divididos en grupos de al menos 8 animales cada uno. Las dosis de productos se administraron mediante sonda oral 1 hora antes de la inducción de la isquemia. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) y se registró el electrocardiograma de la derivación estándar II para detectar la depresión de la onda S. Se inyectaron 0.3 U/kg de arginina-vasopresina (AVP) (Sigma Chemicals, St Louis, Mo, USA) en la arteria carótida para inducir la vasoconstricción de arterias coronarias pequeñas y el aumento de la resistencia coronaria. Los grupos tratados recibieron AVP 60 min después del fármaco de ensayo. En todos los grupos, tras la inyección de AVP, se efectuó un registro de ECG de 10 minutos.

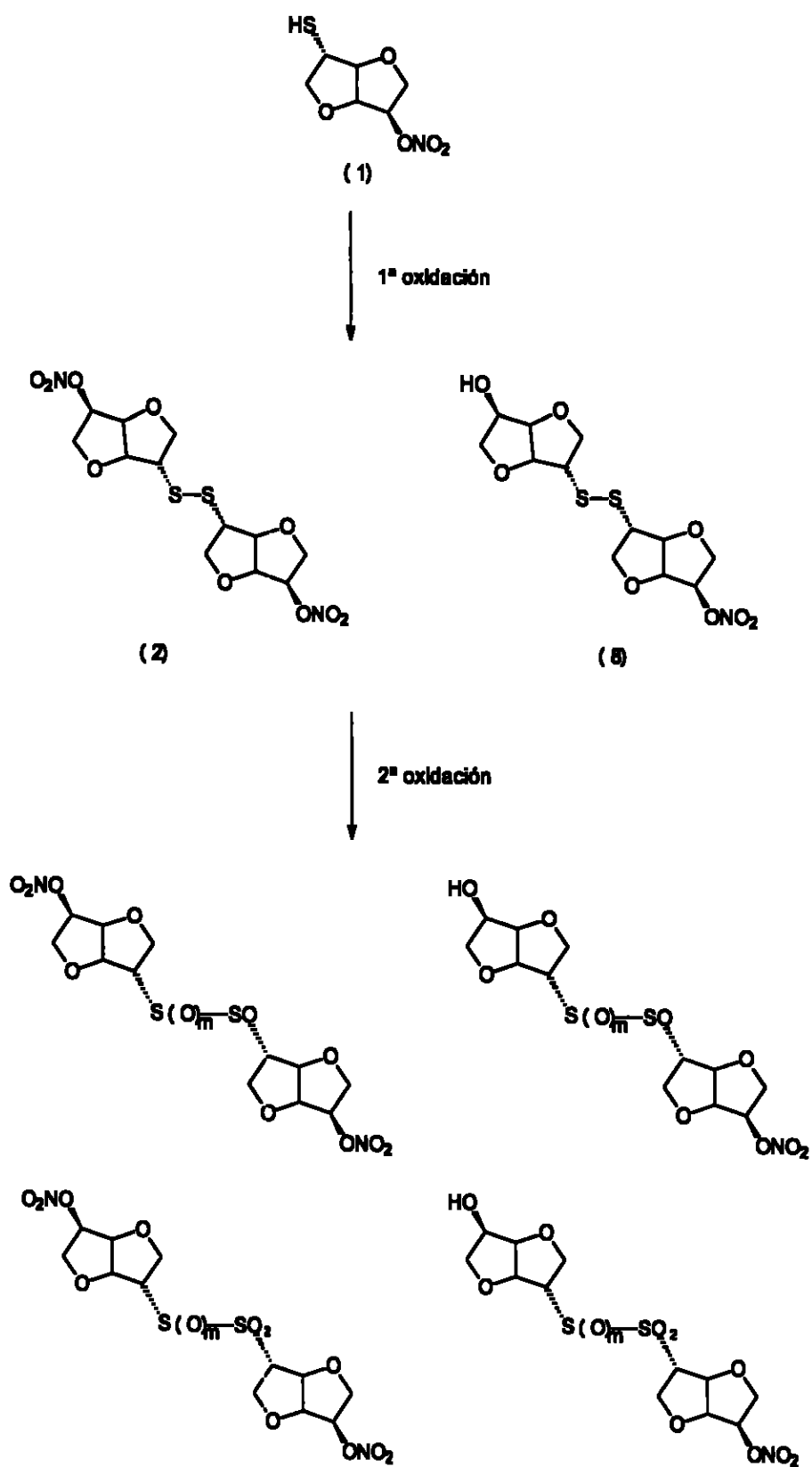
Los resultados se muestran en la tabla 16 y se expresan como decrementos de la onda S ( $\mu$ volts).

Tabla 16

| Compuesto | Dosis (mg/kg, p.o.) | Decremento de onda S ( $\mu$ V) | Protección del decremento de onda S (%) |
|-----------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| Vehículo  | -                   | 46,2 $\pm$ 4,9                  | -                                       |
| 12        | 20                  | 22,6 $\pm$ 5,9                  | 52                                      |
| 12        | 100                 | 8,6 $\pm$ 2,8                   | 81                                      |
| 9         | 20                  | 16,5 $\pm$ 9,8                  | 64                                      |
| 9         | 100                 | 9,7 $\pm$ 4,6                   | 79                                      |
| 4         | 20                  | 36,5 $\pm$ 11,6                 | 21                                      |
| 4         | 100                 | 5,9 $\pm$ 3,9                   | 87                                      |

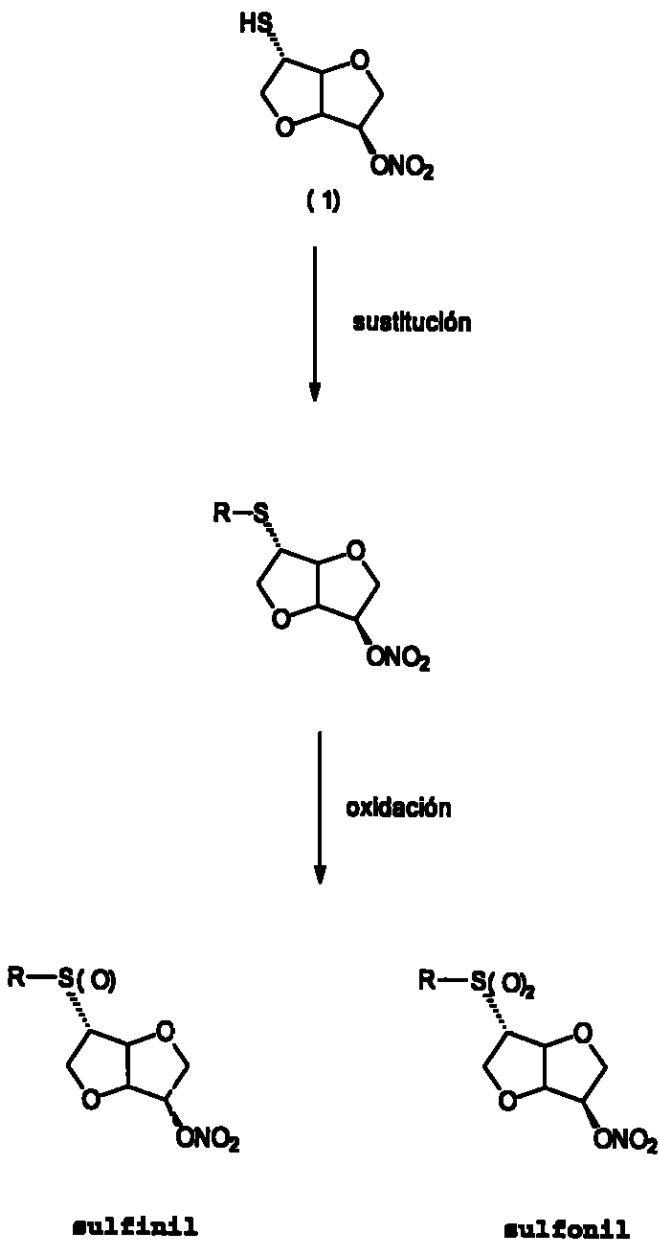
Como puede observarse en la tabla 16, todos los compuestos sometidos a ensayo protegen contra el daño cardiaco por isquemia-reperusión.

Esquema 1:

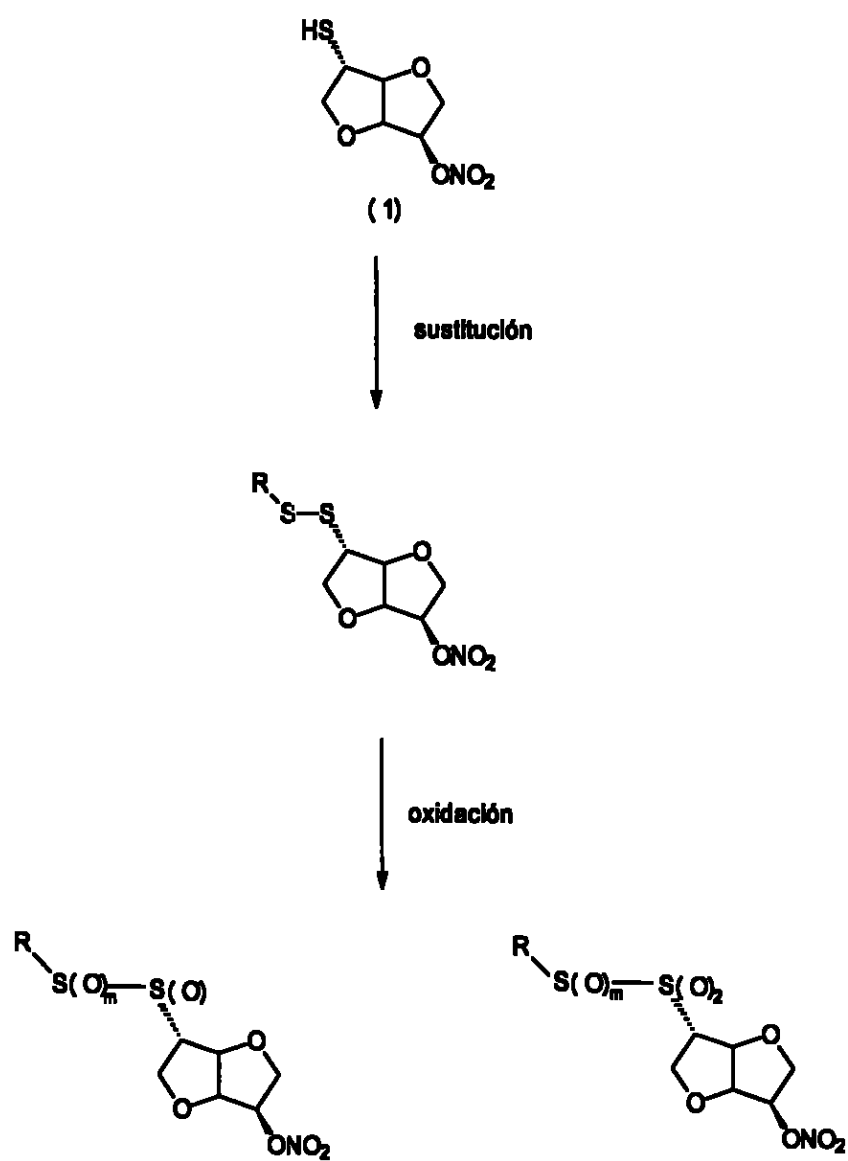


161  
177

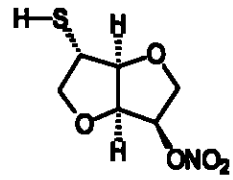
**Esquema 2:**



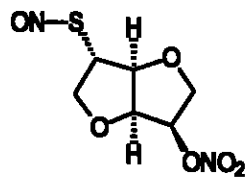
Esquema 3:



**Esquema 4:**



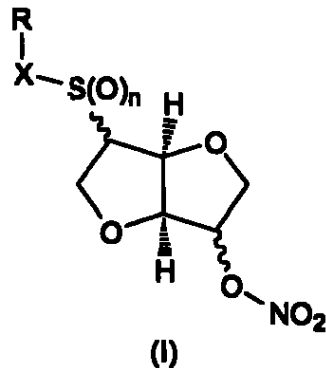
(1)



(6)

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) ó un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo:



donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

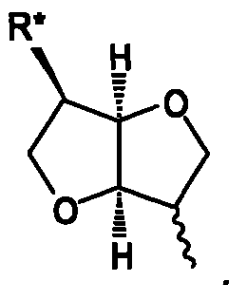
X representa  $-S(O)_m-$ ,  $-(C=O)-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando X representa  $-(C=O)-$  entonces n es 0,

R representa hidrógeno o es un residuo  $R^a$ , siendo dicho residuo  $R^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

- C<sub>1-6</sub> alquilo;
- C<sub>2-6</sub> alquenilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;
- fenilo;
- piridilo;

165  
721

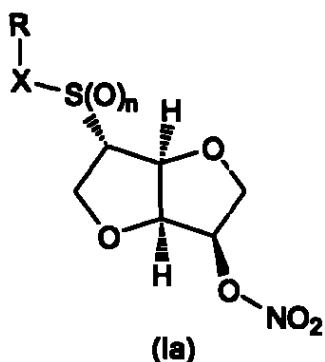
tiofenilo;  
nitrosilo;  
S-cisteinil;  
S-glutationil; y



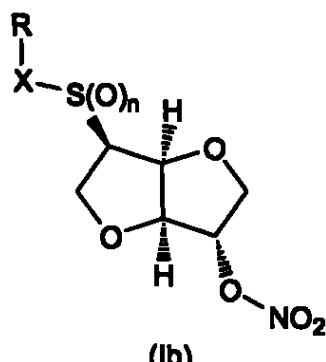
donde R\* es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alqueno, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalqueno, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

en el que R<sup>a</sup> opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alqueno, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalqueno, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

con la condición que cuando RXS(O)<sub>n</sub>- y -ONO<sub>2</sub> estén en forma trans uno respecto al otro, en lo que respecta al plano de anillo, tal y como se describe en las fórmulas (Ia) y (Ib):



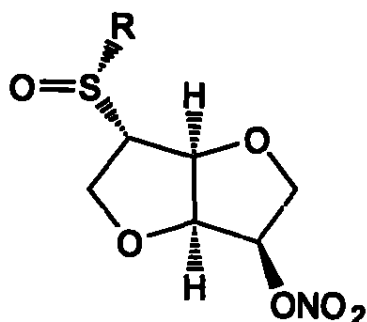
(Ia)



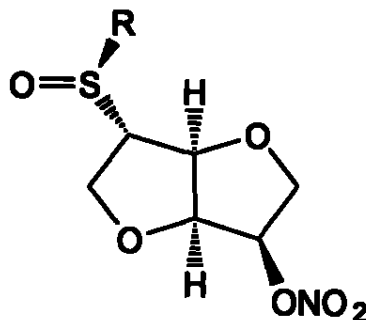
(Ib)

entonces RXS(O)<sub>n</sub>- no representa  $Z-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-S-$ , donde Z es un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>, un grupo arilo o un grupo aralquilo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde m, n, ó ambos es 0.
3. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde X representa un enlace sencillo o -S-.
4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R representa hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo) C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, fenilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)fenilo, 5-acetiloxiisosorbid-2-il, 5-hidroxiisosorbid-2-yl o 5-nitratoisosorbid-2-il.
5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R es C<sub>1-6</sub> alquilo.
6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un compuesto según la fórmula (Ic) ó (Id):



(Ic)



(Id)

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, seleccionado de entre:

2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
5,5'-dinitrato-2,2'-ditiodiisosorbida,  
2-metiltioisosorbida 5-mononitrato,  
2-[(R)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,  
2-[(S)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato  
2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato,  
2-metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato,  
8-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
2-(tetrahidropiran-2-il-tio)isosorbida 5-mononitrato,  
2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato, y  
2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mono  
nitrato.

8. Una composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como ingrediente(s) activo(s), opcionalmente junto con uno o más excipiente(s), activador(es), agente(s) quelante(s) y/o estabilizador(es) fisiológicamente aceptables.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 que además contiene un agente trombolítico, preferentemente un activador del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, que además contiene un agente anticoagulante, preferentemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosano.

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que además contiene un agente antitrombótico, preferentemente ácido acetil salicílico, dipiridamol, ticlopidina, clopidrogel, triflusal, polisulfato de pentosano o abciximab.

12. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que además contiene una

inmunoglobulina o un fragmento de ésta con especificidad para la glicoproteína IIb/IIIa.

13. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que además contiene un agente hipolipemiante, preferentemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, eptastatina, lifibrol, acifrán, acitemato, glunicato y rosuvastatina.

14. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que además contiene un agente antioxidante/secuestrador de radicales libres, preferentemente nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutatona, edaravona, raxofelast, licopeno, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-D-cisteína, una mezcla racémica de N-acetil-L-cisteína y N-acetil-D-cisteína o carvedilol.

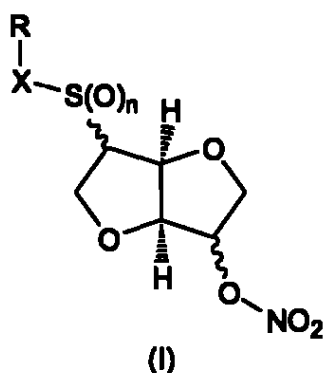
15. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, enfermedades del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, donde las condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su patogénesis se seleccionan de entre las alergias, el ictus, la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades isquémicas cardiovasculares.

---

17. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del sistema circulatorio, preferentemente enfermedades cardiovascular y/o coronaria.

18. El uso de al menos un compuesto de la fórmula (I) ó de un tautómero, de una sal farmacéuticamente aceptable, de una prodroga o de un solvato del mismo:



donde:

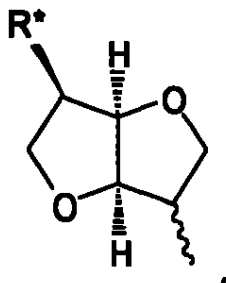
$n$  es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

$X$  representa  $-\text{S(O)}_m-$ ,  $-(\text{C=O})-$  o un enlace sencillo, donde  $m$  es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando  $X$  representa  $-(\text{C=O})-$  entonces  $n$  es 0,

$R$  representa hidrógeno o es un residuo  $R^a$ , siendo dicho residuo  $R^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

- $\text{C}_{1-6}$  alquilo;
- $\text{C}_{2-6}$  alquenilo;
- $\text{C}_{3-8}$  cicloalquilo;
- $\text{C}_{3-8}$  cicloalquilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  o  $\text{NCH}_3$ ;
- $\text{C}_{4-8}$  cicloalquenilo;
- $\text{C}_{4-8}$  cicloalquenilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  o  $\text{NCH}_3$ ;

fenilo;  
piridilo;  
tiofenilo;  
nitrosilo;  
S-cisteinil;  
S-glutationil; y

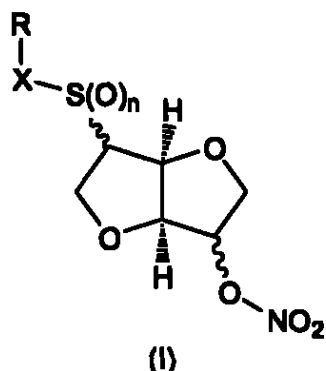


donde R\* es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

en el que R\* opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

como ingrediente(s) activo(s) para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, enfermedades del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o el daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión.

19. El uso de al menos un compuesto de la fórmula (I):



o de un tautómero, de una sal farmacéuticamente aceptable, de una prodroga o de un solvato del mismo como un ingrediente(s) activo(s) para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, enfermedades del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o el daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión,

que incluya la administración de dicho compuesto o de un tautómero, de una sal farmacéuticamente aceptable, de una prodroga o de un solvato del mismo a un paciente que lo necesite,

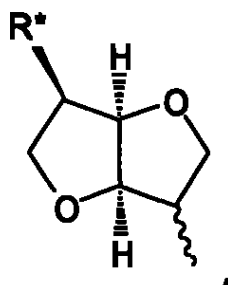
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-S(O)_m-$ ,  $-(C=O)-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando X representa  $-(C=O)-$  entonces n es 0,

y R representa hidrógeno o es un residuo  $R^a$ , siendo dicho residuo  $R^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

C<sub>1-6</sub> alquilo;  
 C<sub>2-6</sub> alquenilo;  
 C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;  
 C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por  
 O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
 C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;  
 C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido  
 por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
 fenilo;  
 piridilo;  
 tiofenilo;  
 nitrosilo;  
 S-cisteinil;  
 S-glutationil; y



donde R\* es seleccionado de entre el grupo que comprende  
 hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo,  
 C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

en el que R<sup>a</sup> opcionalmente es sustituido por uno a tres  
 grupos seleccionados por separado de entre C<sub>1-6</sub> alquilo,  
 C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo,  
 acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno.

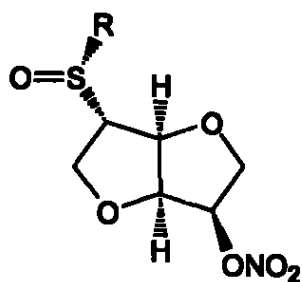
20. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 18 ó 19,  
 donde m, n, o ambas, es 0.

21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones  
 18 a 20, donde X represente un enlace sencillo o -S-.

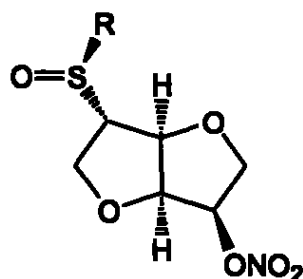
22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde R representa hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo) C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, fenil o (C<sub>1-6</sub> alquilo)fenilo.

23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, donde R es C<sub>1-6</sub> alquilo.

24. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en el que el compuesto según la fórmula (I) es un compuesto según la fórmula (Ic) o (Id):



(Ic)



(Id)

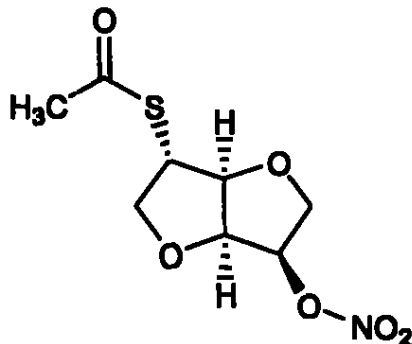
25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre:

2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
 5,5'-dinitrato-2,2'-ditiodiisosorbida,  
 2-metiltioisosorbida 5-mononitrato,  
 2-[(R)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,  
 2-[(S)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato  
 2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato,  
 2-metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato,  
 S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
 2-(tetrahidropiran-2-il-tio)isosorbida 5-mononitrato,  
 2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato, y  
 2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mono

730

nitrato.

26. El uso de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, donde el compuesto es 2-acetiltioisosorbida 5-mononitrato, que se representa mediante la siguiente fórmula:



27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, donde la composición farmacéutica también incluye un agente trombolítico, preferentemente un activador del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa.

28. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 27, donde la composición farmacéutica también incluye un agente anticoagulante, preferentemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosano.

29. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 28, donde la composición farmacéutica además contenga un agente antitrombótico, preferentemente ácido acetil salicílico, dipiridamol, ticlopidina, clopidrogel, triflusal, polisulfato de pentosano o abciximab.

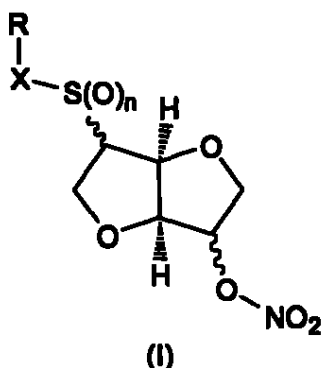
30. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 29, donde la composición farmacéutica además contiene inmunoglobulina o un fragmento de ésta con especificidad por la glicoproteína IIb/IIIa.

31. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 30, donde la composición farmacéutica además contiene un agente hipolipemiente, preferentemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, eptastatina, lifibrol, acifrán, acitemato, glunicato o rosuvastatina.

32. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 31, donde la composición farmacéutica también contiene un agente antioxidante/secuestrador de radicales libres, preferentemente nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutatona, edaravona, raxofelast, licopeno, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-D-cisteína, una mezcla racémica de N-acetil-L-cisteína y N-acetil-D-cisteína o carvedilol.

33. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 32, en el que las condiciones patológicas donde el estrés oxidativo juega un papel importante en su patogénesis es seleccionado de entre las alergias, el ictus, la enfermedad de Alzheimer, y las enfermedades isquémicas cardiovasculares

34. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la formula (I), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga ó un solvato del mismo:



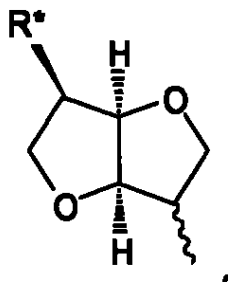
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-S(O)_m-$ , o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

y R representa hidrógeno o es un residuo  $R^a$ , siendo dicho residuo  $R^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

C<sub>1-6</sub> alquilo;  
C<sub>2-6</sub> alquenilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
fenilo;  
piridilo;  
tiofenilo;  
nitrosilo;  
S-cisteinil;  
S-glutationil; y



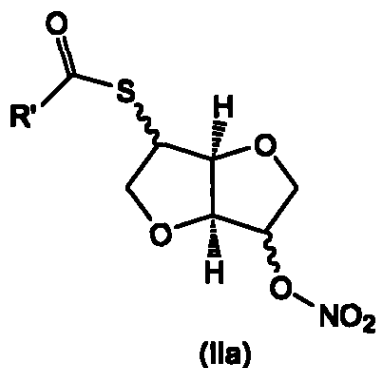
donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

en el que  $R^*$  opcionalmente es sustituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre C<sub>1-6</sub> alquilo,

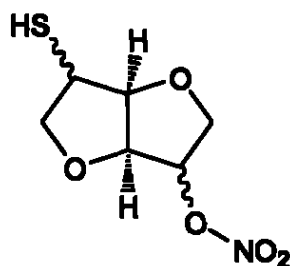
C<sub>2</sub>-6 alquenilo, C<sub>3</sub>-8 cicloalquilo, C<sub>4</sub>-8 cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

cuyo proceso comprende la realización de los pasos siguientes:

- a) efectuar la hidrólisis de un compuesto de fórmula (IIa):



donde R' es C<sub>1</sub>-6 alquilo, preferentemente metilo, para obtener el siguiente compuesto

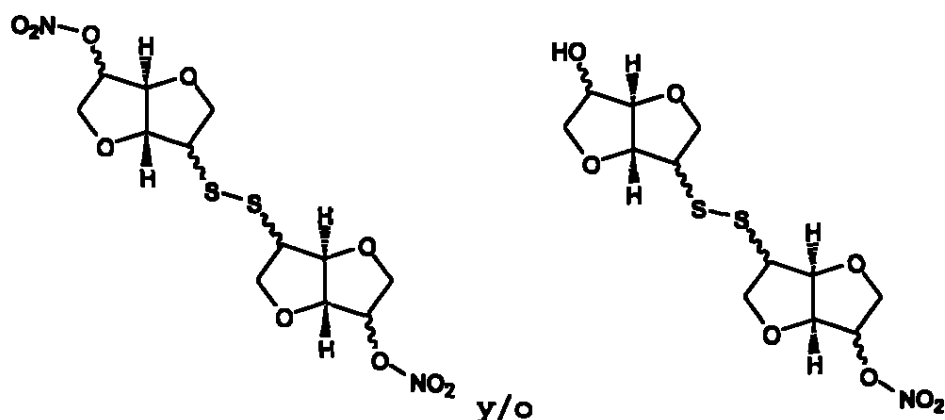


y

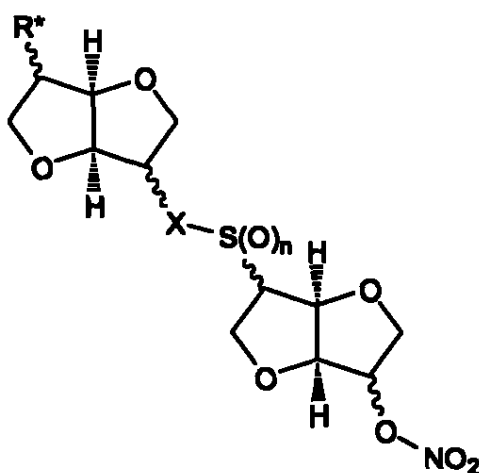
- b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto preparado de acuerdo con la etapa (a):

I. una reacción de oxidación para obtener:

134



opcionalmente seguido por una segunda oxidación para obtener:



donde:

$n$  es 1 ó 2,

$X$  es  $-S(O)_m-$ , donde  $m$  es 0, 1 ó 2, y

$R^*$  representa hidroxilo o  $ONO_2$ ;

II. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), donde:

$n$  es un número entero de 0,

$X$  representa un enlace,

y  $R$  no representa nitrosilo,

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 0,  
X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es un número entero de 0 ó 1,  
Y R no representa nitrosilo;

III. una reacción de sustitución para obtener:

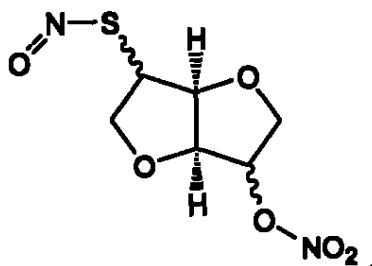
un compuesto según la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 0,  
X representa  $-S-$ ;

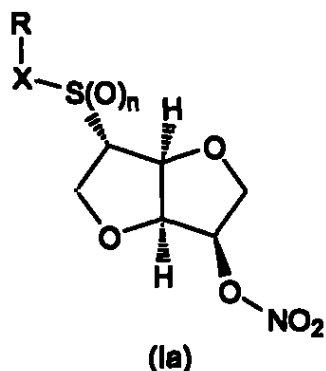
opcionalmente seguido por una oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 1 ó 2, y  
X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, ó

IV. una reacción de nitrosación para obtener:



35. Un proceso según la reivindicación 34 para preparar un compuesto de fórmula (Ia), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga ó un solvato del mismo:



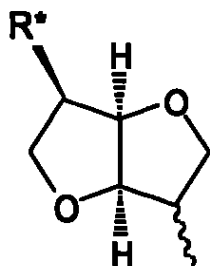
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-\text{S}(\text{O})_m-$ , o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

y R representa hidrógeno o es un residuo  $\text{R}^a$ , siendo dicho residuo  $\text{R}^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

- C<sub>1-6</sub> alquilo;
- C<sub>2-6</sub> alquenilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por O, S, NH o  $\text{NCH}_3$ ;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por O, S, NH o  $\text{NCH}_3$ ;
- fenilo;
- piridilo;
- tiofenilo;
- nitrosilo;
- S-cisteinil;
- S-glutationil; y

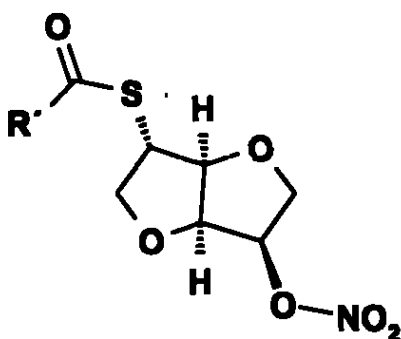


donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

en el que  $R^a$  opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

y donde el mencionado proceso comprende la realización de los pasos siguientes:

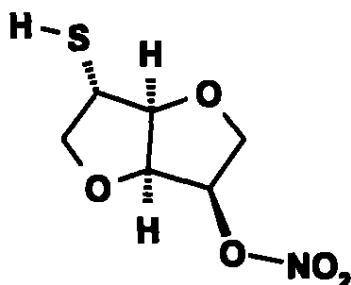
- a) efectuar una hidrólisis de un compuesto de la fórmula (II):



(II)

donde  $R'$  es  $C_{1-6}$  alquilo, preferentemente metilo, para obtener 2-tioisoborbidato 5-mononitrato (1),

138



(1)

y

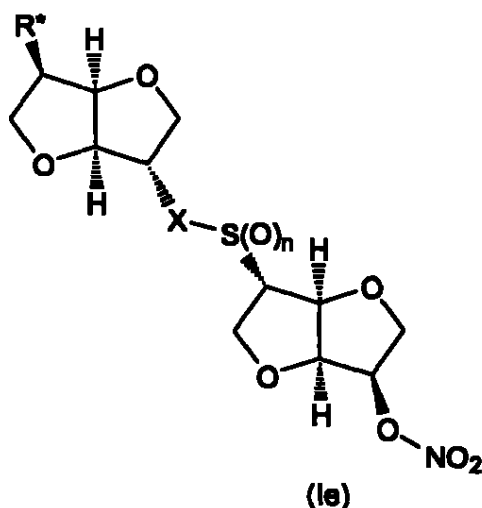
b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto (1) preparado de acuerdo con la etapa (a):

I. una reacción de oxidación para obtener:

5,5'-dinitrato-2,2'-ditiodiisosorbida (2) ó

2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato  
(8),

opcionalmente seguido por una segunda oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (Ie):



(Ie)

donde

n es 1 ó 2,

X es  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, y  
R\* representa hidroxilo ó  $ONO_2$ ;

II. una reacción de sustitución para obtener un compuesto de acuerdo con la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 0,  
X representa un enlace,  
Y R no representa nitrosilo,

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener:

un compuesto de acuerdo con la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 0,  
X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es un número entero de 0 ó 1,  
y R no representa nitrosilo;

III. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto según la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 0, y  
X representa  $-S-$ ;

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 1 ó 2, y  
X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, ó

IV. una reacción de nitrosación para obtener:

S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato (6)

36. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 34 ó 35 que incluye las etapas (a) y (b) II para la preparación de:

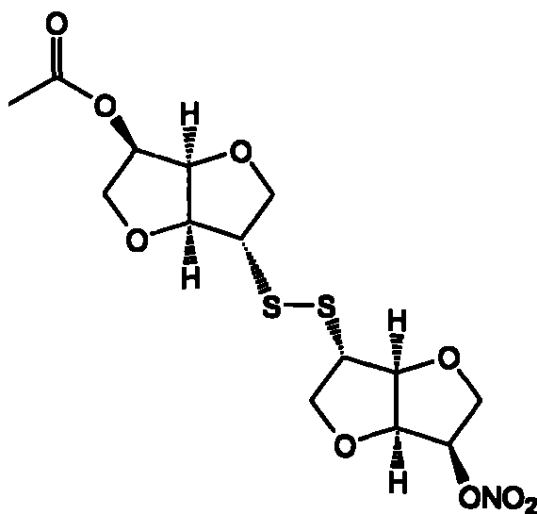
140

2-[(R)-metilsufinil]isosorbida 5-mononitrato y/o

2-[(S)-metilsufinil]isosorbida 5-mononitrato.

37. Un proceso según la reivindicación 35, que comprende la separación de ambos diastereoisómeros.

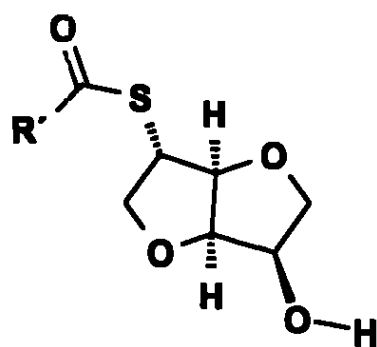
38. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (11), ó un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga ó un solvato del mismo:



(11)

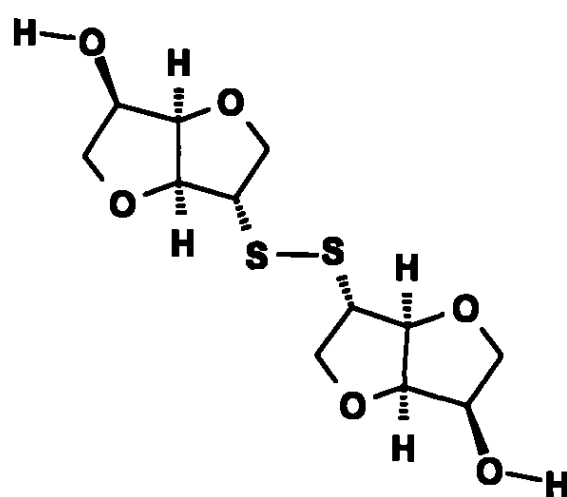
que comprende las siguientes etapas:

a) efectuar una oxidación de un compuesto de la fórmula (III):



(III)

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo,  
para obtener 2,2'-ditiodiisorbida(10),



(10)

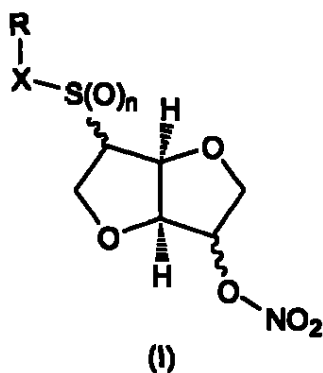
y

b) efectuar una nitración del compuesto preparado en  
la etapa a) con un agente nitrante en presencia de  
un anhídrido carboxílico, preferentemente anhídrido  
acético.

39. 2,2'-ditio-diisorbida.

**RESUMEN**

En la invención presente se revelan nuevos derivados de mononitrato de dianhydrohexitol correspondientes a la fórmula (I), tautómeros, sales farmacéuticamente aceptables, prodrogas y solvatos de los mismos:



así como composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y los usos de los mismos.

Pat. 18.9.05  
ihv

# PATENT COOPERATION TREATY

000187

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

143

|                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>To:</p> <p>HOFFMANN EITLE<br/>Arabellastrasse 4<br/>81925 München<br/>ALLEMAGNE</p> <p style="text-align: right;">SUM<br/>21.9.05</p> | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> <b>EINGEGANGEN</b><br/> - 9. Sep. 2005<br/> HOFFMANN • EITLE MÜNCHEN<br/> PATENTANWÄLTE RECHTSANWÄLTE </div> <p style="text-align: right;">CT</p> <p style="text-align: center;">NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF<br/>THE INTERNATIONAL PRELIMINARY<br/>REPORT ON PATENTABILITY<br/>(PCT Rule 71.1)</p> |
| <p>Date of mailing (day/month/year) <span style="float: right;">08.09.2005</span></p>                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>Applicant's or agent's file reference<br/>105625 a/ubr</p>                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p><b>IMPORTANT NOTIFICATION</b></p>                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>International application No.<br/>PCT/EP2004/010882</p>                                                                               | <p>International filing date (day/month/year)<br/>29.09.2004</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <p>Priority date (day/month/year)<br/>03.10.2003</p>                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>Applicant<br/>LACER, S.A.</p>                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

**4. REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Name and mailing address of the international preliminary examining authority:</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> <p>European Patent Office<br/>D-80299 Munich<br/>Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx: 523656 epmu d<br/>Fax: +49 89 2399 - 4465</p> </div> </div> | <p>Authorized Officer</p> <p>Siefert, A</p> <p>Tel. +49 89 2399-2469</p> <div style="text-align: right;"> </div> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

000188

## INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

144

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |                                                          |                                                                          |                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>105625 a/ubr                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | <b>FOR FURTHER ACTION</b>                                |                                                                          | See Form PCT/PEAA16                          |
| International application No.<br>PCT/EP2004/010882                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  | International filing date (day/month/year)<br>29.09.2004 |                                                                          | Priority date (day/month/year)<br>03.10.2003 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>C07D493/04, A61K31/34                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |                                                          |                                                                          |                                              |
| Applicant<br>LACER, S.A.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |                                                          |                                                                          |                                              |
| <p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 22 sheets, as follows:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).</p> |  |                                                          |                                                                          |                                              |
| <p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the opinion</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |                                                          |                                                                          |                                              |
| Date of submission of the demand<br><br>03.08.2005                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |                                                          | Date of completion of this report<br><br>08.09.2005                      |                                              |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br><br> European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel: +49 89 2399 - 0 Tx: 523856 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4485                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                                          | Authorized Officer<br><br>Klein, D<br><br>Telephone No. +49 89 2399-7898 |                                              |



# INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT N PATENTABILITY

International application No.  
PCT/EP2004/010882

## Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
  - ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
    - ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
    - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
    - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements\* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

### Description, Pages

1-66 as originally filed

### Claims, Numbers

1-39 received on 03.08.2005 with letter of 03.08.2005

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
    - ☐ the description, pages
    - ☐ the claims, Nos.
    - ☐ the drawings, sheets/figs
    - ☐ the sequence listing *(specify)*:
    - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
  4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
    - ☐ the description, pages
    - ☐ the claims, Nos.
    - ☐ the drawings, sheets/figs
    - ☐ the sequence listing *(specify)*:
    - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

\* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

000193  
146

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/EP2004/010882

**Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

|                               |             |      |
|-------------------------------|-------------|------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 1-39 |
|                               | No: Claims  | --   |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | 1-39 |
|                               | No: Claims  | --   |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-39 |
|                               | No: Claims  |      |

**2. Citations and explanations (Rule 70.7):**

**see separate sheet**

**Re Item V**

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;  
citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following documents:

- ✓D1: WO 00/20420 A1 (LACER, S.A; REPOLLES MOLINER, JOSE; PUBILL COY, FRANCISCO; CABEZA LLOR) 13 April 2000 (2000-04-13)
- ✓D2: LUCCHI DE O ET AL: "CHEMOSELECTIVE REDUCTION OF ISOSORBIDE-2,5-DINITRATE" GAZZETTA CHIMICA ITALIANA, SOCIETA CHIMICA ITALIANA, ROME, IT, vol. 117, no. 3, March 1987 (1987-03), pages 173-176, XP000984806 ISSN: 0016-5603
- ✓D3: NALLET, JEAN PIERRE ET AL: "Synthesis of a series of hexitol and aminodeoxy-hexitol mono-nitrate derivatives containing a sulfur group and pharmacological evaluation of isolated rat aortas" EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY , (5), 933-943 CODEN: EJOCFK; ISSN: 1434-193X, 1998, XP001204497
- ✓D4: EP-A1-0 530 887 (LABORATOIRES HOECHST S.A) 10 March 1993 (1993-03-10)
- ✓D5: EP-A2-0 290 885 (CHIESI FARMACEUTICI S.P.A) 17 November 1988 (1988-11-17)
- ✓D6: FR-A-2 134 6985 (AMERICAN HOME PRODUCTS; AMERICAN HOME PRODUCTS,US) 8 December 1972 (1972-12-08)

**Novelty and Inventiveness (Art. 33(2) &(3) PCT):**

**Claims 1-17,34-39 :**

The subject-matter of claims 1-17, 34-39 concern derivatives of 1,4:3,6 dianhydrohexite for the treatment of vascular disorders and the process for the preparation thereof.

Since none of the available prior art discloses said subject-matter, claims 1-17,34-39 are considered new according to Art. 33(2) PCT.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY  
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

**PCT/EP2004/010882**

Furthermore, the claimed compounds cannot be derived from the combination of D1 with D2-D6 in an obvious manner and, the fact that they also possess antithrombotic activity at a dose that does not modify blood pressure and additional synergise with other compounds such as thrombolitics, anticoagulants, etc, (which are disclosed in the available prior art) is also considered as an unexpected effect which contributes to the acknowledgment of inventiveness.

**Claims 18-33 :**

Claims 18-33 concern uses of the compounds of claims 1-17 as well compounds known from D1.

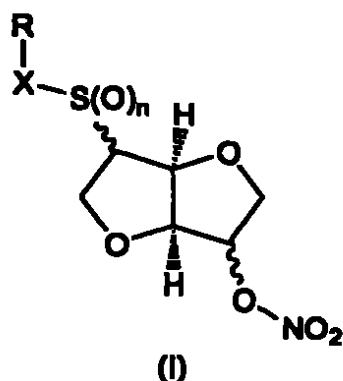
Since none of the claimed uses are disclosed or suggested in the prior art, claims 18-33 are considered new and inventive according to Art. 33(2) & (3) PCT.

**R mark concerning Clarity (Art 6 PCT) :**

The wording "...where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis.." in claims 15,18,19 is vague and unclear as to what it means, "importance" being something quite relative.

## CLAIMS

1. A compound according to formula (I) or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



wherein:

n is an integer of 0, 1, or 2,

X represents  $-\text{S}(\text{O})_n-$ ,  $-(\text{C}=\text{O})-$  or a single bond, wherein m is an integer of 0, 1, or 2, with the proviso that when X represents  $-(\text{C}=\text{O})-$  then n is 0,

R represents hydrogen or is a residue  $\text{R}^a$ , which residue  $\text{R}^a$  is selected from the group consisting of:

C<sub>1-6</sub> alkyl;

C<sub>2-6</sub> alkenyl;

C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;

C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;

C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;

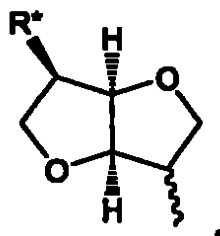
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;

phenyl;

AMENDED SHEET

150

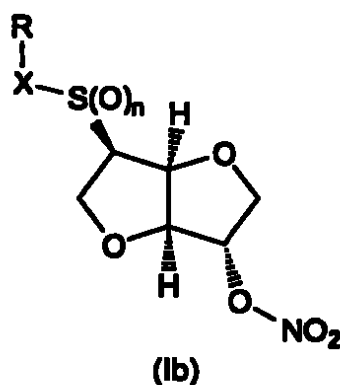
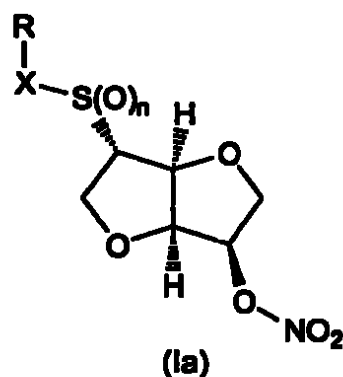
pyridyl;  
 thiophenyl;  
 nitrosyl;  
 S-cysteinyll;  
 S-glutathionyl; and



wherein R\* is selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen;

wherein R<sup>a</sup> optionally is substituted by one to three groups independently selected from C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

provided that when RXS(O)<sub>n</sub>- and -ONO<sub>2</sub> are trans to each other with respect to the ring plane as depicted in formulae (Ia) and (Ib):



AMENDED SHEET

then  $\text{RXS(O)}_n$ - does not represent  $\text{Z}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{S}-$ , wherein Z is an  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  alkyl group, aryl group, or an aralkyl group.

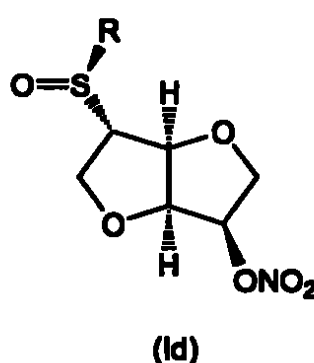
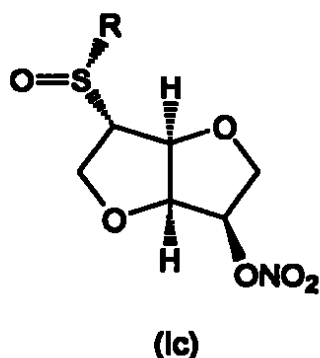
2. A compound according to claim 1, wherein either one or both of m and n is 0.

3. A compound according to any one of claims 1 to 2, wherein X represents a single bond or -S-.

4. A compound according to any one of claims 1 to 3, wherein R represents hydrogen,  $\text{C}_1$ -6 alkyl,  $\text{C}_2$ -6 alkenyl,  $\text{C}_3$ -8 cycloalkyl,  $\text{C}_4$ -8 cycloalkenyl, ( $\text{C}_1$ -6 alkyl) $\text{C}_3$ -8 cycloalkyl, ( $\text{C}_1$ -6 alkyl) $\text{C}_4$ -8 cycloalkenyl, phenyl, ( $\text{C}_1$ -6 alkyl)phenyl, 5-acetyloxyisosorbide-2-yl, 5-hydroxyisosorbide-2-yl or 5-nitratoisosorbide-2-yl.

5. A compound according to any one of claims 1 to 4, wherein R is  $\text{C}_1$ -6 alkyl.

6. A compound according to any one of claims 1 to 5, which is a compound according to formula (Ic) or (Id):



7. A compound according to any one of claims 1 to 6, which is selected from:

2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
5,5'-dinitrate-2,2'-dithi diisosorbide,

AMENDED SHEET

2-methylthioisosorbide 5-mononitrate,  
2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate,  
2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate  
2-methylsulfinylisosorbide 5-mononitrate,  
2-methylsulfonylisosorbide 5-mononitrate,  
S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
2-(tetrahydropyran-2-yl-thio)isosorbide 5-mononitrate,  
2-(isosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate,  
and  
2-(5'-acetyloxyisosorbidyl-2'-dithio)isosorbide  
5-mononitrate.

8. A pharmaceutical composition comprising as active ingredient(s) at least one compound according to any one of claims 1 to 7, optionally together with one or more physiologically acceptable excipient(s), activator(s), chelating agent(s) and/or stabilizer(s).

9. The pharmaceutical composition according to claim 8, which further comprises a thrombolytic agent, preferably a plasminogen activator, urokinase, streptokinase, alteplase or anistreplase.

10. The pharmaceutical composition according to claims 8 or 9, which further comprises an anticoagulant agent, preferably heparin, dicoumarol, acenocoumarol, enoxaparine or pentosan polysulfate.

11. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 10, which further comprises an antithrombotic agent, preferably acetylsalicylic acid, dipyridamole, ticlopidine, clopidrogel, triflusal, pentosan polysulfate or abciximab.

12. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 11, which further comprises an immunoglobulin or

AMENDED SHEET

a fragment thereof having a specificity for glycoprotein IIb/IIIa.

13. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 12, which further comprises an hypolipemiant agent, preferably simvastatin, lovastatin, atorvastatin, pravastatin, fluvastatin, eptastatin, lifibrol, acifran, acitemate, glunilate and rosuvastatin.

14. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 13, which further comprises an antioxidant/free radical scavenger agent, preferably nicaraven, ranolazine, emoxipin, glutathione, edaravone, raxofelast, lycopene, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-D-cysteine, a racemic mixture of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-D-cysteine, or carvedilol.

15. The pharmaceutical composition according to any one of the claims 8 to 14 for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, endothelial dysfunctions, vasospasm, cardiac allograft vasculopathy, dysfunctions of the circulatory system, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, pathological conditions where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion.

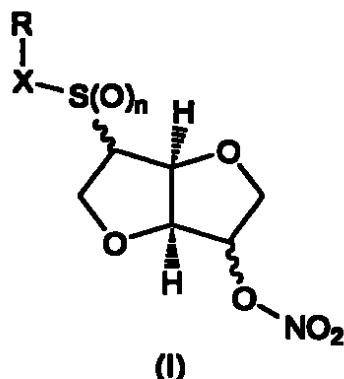
16. The pharmaceutical composition according to claim 15, wherein the pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis are selected from allergies, stroke, Alzheimer's disease, and ischemic cardiovascular diseases.

17. The pharmaceutical composition according to any one of claims 8 to 14 for the treatment and/or prevention of dysfunctions of the circulatory system, preferably cardiovascular and/or coronary dysfunctions.

AMENDED SHEET

154

18. Use of at least one compound of formula (I) or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



wherein:

$n$  is an integer of 0, 1, or 2,

$\text{X}$  represents  $-\text{S(O)}_m-$ ,  $-(\text{C=O})-$  or a single bond, wherein  $m$  is an integer of 0, 1, or 2, with the proviso that when  $\text{X}$  represents  $-(\text{C=O})-$  then  $n$  is 0,

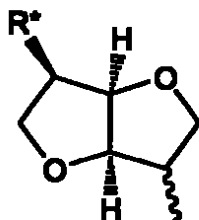
$\text{R}$  represents hydrogen or is a residue  $\text{R}^a$ , which residue  $\text{R}^a$  is selected from the group consisting of:

- $\text{C}_{1-6}$  alkyl;
- $\text{C}_{2-6}$  alkenyl;
- $\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl;
- $\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by O, S, NH or  $\text{NCH}_3$ ;
- $\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl;
- $\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by O, S, NH or  $\text{NCH}_3$ ;
- phenyl;
- pyridyl;
- thiophenyl;
- nitr syl;

AMENDED SHEET

155

S-cysteinylyl;  
S-glutathionyl; and



wherein R\* is selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen;

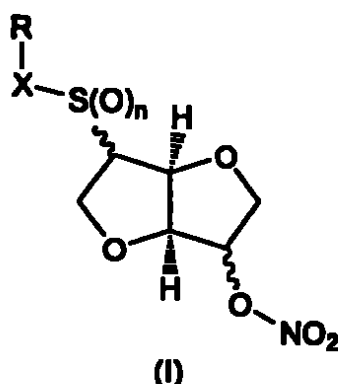
wherein R<sup>a</sup> optionally is substituted by one to three groups independently selected from C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

as active ingredient(s) for the manufacture of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, endothelial dysfunctions, vasospasm, cardiac allograft vasculopathy, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, pathological conditions where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion.

AMENDED SHEET

756

19. Use of at least one compound of formula (I):



or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof as active ingredient(s) for the prevention and/or treatment of atherosclerosis, endothelial dysfunctions, vasospasm, cardiac allograft vasculopathy, platelet activation, thrombosis, stroke, pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis, pathological conditions where a deficit of nitric oxide plays an important role in their pathogenesis, and/or tissue damage due to ischemia and/or due to ischemia-reperfusion,

comprising administering said compound or a tautomer, pharmaceutically acceptable salt, prodrug or solvate thereof to a patient in need thereof,

wherein:

$n$  is an integer of 0, 1, or 2,

$X$  represents  $-\text{S(O)}_m-$ ,  $-(\text{C=O})-$  or a single bond, wherein  $m$  is an integer of 0, 1, or 2, with the proviso that when  $X$  represents  $-(\text{C=O})-$  then  $n$  is 0,

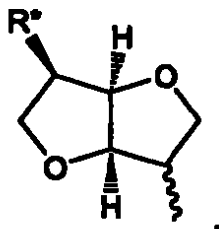
and  $R$  represents hydrogen or is a residue  $R^a$ , which residue  $R^a$  is selected from the group consisting of:

$\text{C}_{1-6}$  alkyl;

AMENDED SHEET

152

C<sub>2-6</sub> alkenyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O,  
S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by  
O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
phenyl;  
pyridyl;  
thiophenyl;  
nitrosyl;  
S-cysteinyll;  
S-glutathionyl; and



wherein R\* is selected from the group consisting of  
hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl,  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and  
halogen;

wherein R<sup>a</sup> optionally is substituted by one to three  
groups independently selected from C<sub>1-6</sub> alkyl,  
C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl,  
acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen.

20. The use according to claims 18 or 19, wherein either one  
or both of m and n is 0.

21. The use according to any one of claims 18 to 20, wherein  
X represents a single bond or -S-.

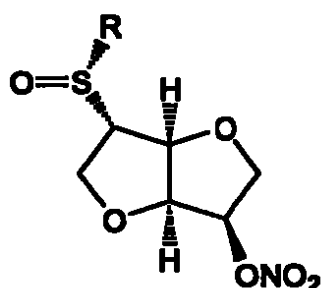
AMENDED SHEET

158

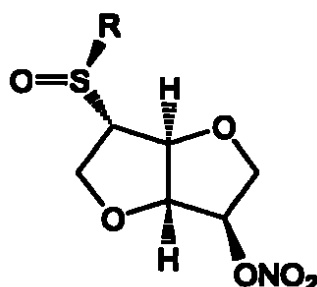
22. The use according to any one of claims 18 to 21, wherein R represents hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, (C<sub>1-6</sub> alkyl)C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, (C<sub>1-6</sub> alkyl)C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, phenyl or (C<sub>1-6</sub> alkyl)phenyl.

23. The use according to any one of claims 18 to 22, wherein R is C<sub>1-6</sub> alkyl.

24. The use according to any one of claims 18 to 23, wherein the compound according to formula (I) is a compound according to formula (Ic) or (Id):



(Ic)



(Id)

25. The use according to any one of claims 18 to 24, wherein the compound of formula (I) is selected from:

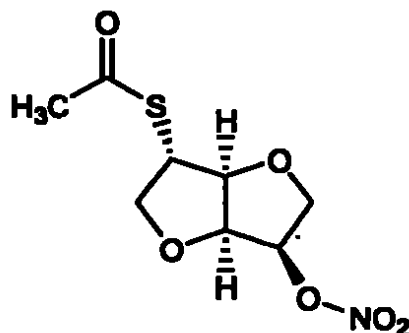
2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
5,5'-dinitrate-2,2'-dithiodiisosorbide,  
2-methylthioisosorbide 5-mononitrate,  
2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate,  
2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate  
2-methylsulfinylisosorbide 5-mononitrate,  
2-methylsulfonylisosorbide 5-mononitrate,  
S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate,  
2-(tetrahydropyran-2-yl-thio)isosorbide 5-mononitrate,  
2-(isosorbidyl-2'-dithio)isosorbide 5-mononitrate,  
and

AMENDED SHEET

159

2-(5'-acetyloxyisosorbidyl-2'-dithio)isosorbide  
5-mononitrate.

26. The use according to claim 18 or 19, wherein the compound is 2-acetylthioisosorbide 5-mononitrate, which is represented by the following formula:



27. The use according to any one of claims 18 to 26, wherein the pharmaceutical composition further comprises a thrombolytic agent, preferably a plasminogen activator, urokinase, streptokinase, alteplase or anistreplase.

28. The use according to any one of claims 18 to 27, wherein the pharmaceutical composition further comprises an anticoagulant agent, preferably heparin, dicoumarol, acenocoumarol, enoxaparine or pentosan polysulfate.

29. The use according to any one of claims 18 to 28, wherein the pharmaceutical composition further comprises an antithrombotic agent, preferably acetylsalicylic acid, dipyridamole, ticlopidine, clopidogrel, triflusal, pentosan polysulfate or abciximab.

30. The use according to any one of claims 18 to 29, wherein the pharmaceutical composition further comprises an immunoglobulin or a fragment thereof having a specificity for glycoprotein IIb/IIIa.

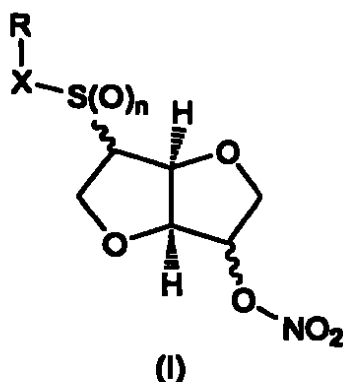
AMENDED SHEET

31. The use according to any one of claims 18 to 30, wherein the pharmaceutical composition further comprises a hypolipemiant agent, preferably simvastatin, lovastatin, atorvastatin, pravastatin, fluvastatin, eptastatin, lifibrol, acifran, acitemate, glunicate or rosuvastatin.

32. The use according to any one of claims 18 to 31, wherein the pharmaceutical composition further comprises an antioxidant/free radical scavenger agent, preferably nicaraven, ranolazine, emoxipin, glutathione, edaravone, raxofelast, lycopene, N-acetyl-L-cysteine, N-acetyl-D-cysteine, a racemic mixture of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-D-cysteine, or carvedilol.

33. The use according to any one of claims 18 to 32, wherein the pathological conditions where oxidative stress plays an important role in their pathogenesis are selected from allergies, stroke, Alzheimer's disease, and ischemic cardiovascular diseases.

34. A process for preparing a compound of formula (I), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



wherein:

n is an integer of 0, 1, or 2,

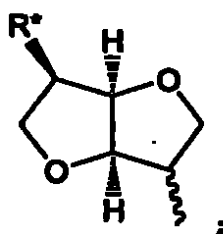
AMENDED SHEET

161

X represents  $-S(O)_m-$  or a single bond, wherein m is an integer of 0, 1, or 2,

and R represents hydrogen or is a residue  $R^a$ , which residue  $R^a$  is selected from the group consisting of:

C<sub>1-6</sub> alkyl;  
C<sub>2-6</sub> alkenyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl;  
C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl;  
C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, wherein one CH<sub>2</sub> group is replaced by O, S, NH or NCH<sub>3</sub>;  
phenyl;  
pyridyl;  
thiophenyl;  
nitrosyl;  
S-cysteinyll;  
S-glutathionyl; and



wherein  $R^*$  is selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

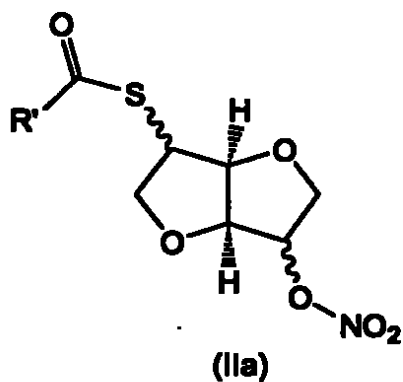
wherein  $R^a$  optionally is substituted by one to three groups independently selected from the group consisting of C<sub>1-6</sub> alkyl, C<sub>2-6</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>4-8</sub> cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl, ONO<sub>2</sub> and halogen,

AMENDED SHEET

162

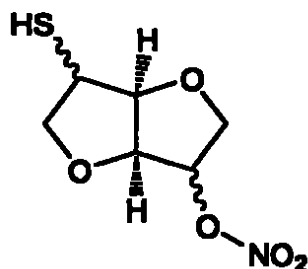
which process comprises conducting the following steps:

a) effecting the hydrolysis of a compound of formula (IIa):



wherein R' is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, preferably methyl,

to obtain the following compound:

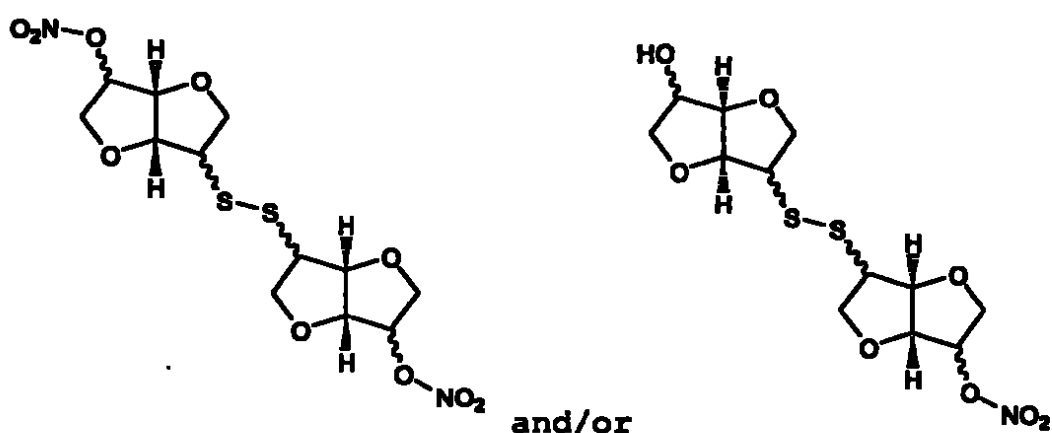


and

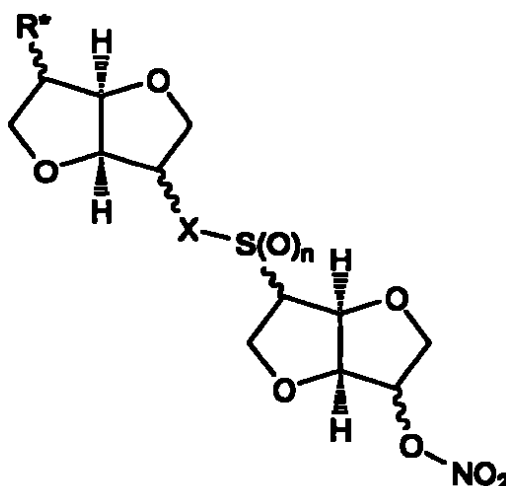
(b) optionally, effecting on the compound prepared according to the step (a):

I. an oxidation reaction to obtain:

AMENDED SHEET



optionally followed by a second oxidation to obtain the following compound:



wherein:

$n$  is 1 or 2,

$X$  is  $-S(O)_m-$ , wherein  $m$  is 0, 1 or 2, and

$R^*$  represents hydroxyl or  $ONO_2$ ;

II. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (I), wherein:

$n$  is an integer of 0,

$X$  represents a bond,

and  $R$  does not represent nitrosyl,

AMENDED SHEET

164

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (I), wherein:

n is an integer of 0,

X represents  $-S(O)_m-$ , wherein m is an integer of 0 or 1,

and R does not represent nitrosyl;

III. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (I), wherein:

n is an integer of 0, and

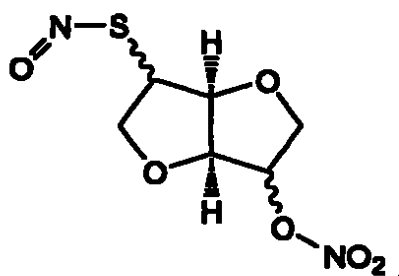
X represents  $-S-$ ;

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (I), wherein:

n is an integer of 1 or 2, and

X represents  $-S(O)_m-$ , wherein m is 0, 1 or 2; r

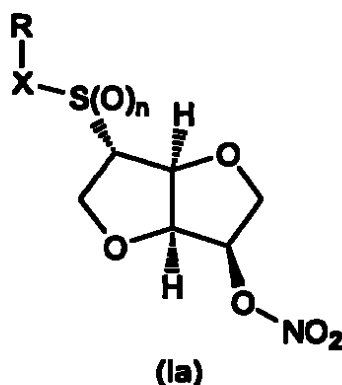
IV. a nitrosation reaction to obtain:



35. A process according to claim 34 for preparing a compound of formula (Ia), a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:

AMENDED SHEET

165



wherein:

$n$  is an integer of 0, 1, or 2,

$\text{X}$  represents  $-\text{S}(\text{O})_m-$  or a single bond, wherein  $m$  is an integer of 0, 1, or 2,

and  $\text{R}$  represents hydrogen or is a residue  $\text{R}^a$ , which residue  $\text{R}^a$  is selected from the group consisting of:

$\text{C}_{1-6}$  alkyl;

$\text{C}_{2-6}$  alkenyl;

$\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl;

$\text{C}_{3-8}$  cycloalkyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by O, S, NH or  $\text{NCH}_3$ ;

$\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl;

$\text{C}_{4-8}$  cycloalkenyl, wherein one  $\text{CH}_2$  group is replaced by O, S, NH or  $\text{NCH}_3$ ;

phenyl;

pyridyl;

thiophenyl;

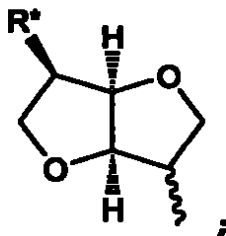
nitrosyl;

S-cysteinylyl;

S-glutathionyl; and

AMENDED SHEET

18



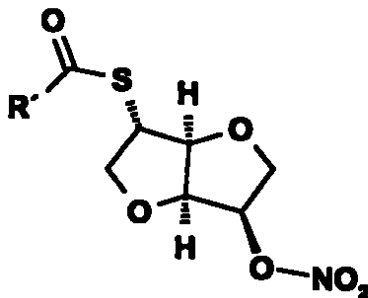
166

wherein  $R^*$  is selected from the group consisting of hydrogen,  $C_1-6$  alkyl,  $C_2-6$  alkenyl,  $C_3-8$  cycloalkyl,  $C_4-8$  cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl,  $ONO_2$  and halogen,

wherein  $R^a$  optionally is substituted by one to three groups independently selected from the group consisting of  $C_1-6$  alkyl,  $C_2-6$  alkenyl,  $C_3-8$  cycloalkyl,  $C_4-8$  cycloalkenyl, acetyloxy, hydroxyl,  $ONO_2$  and halogen,

and wherein said process comprises the following steps:

(a) effecting the hydrolysis of a compound of formula (II):



(II)

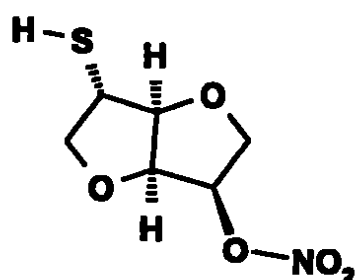
wherein  $R'$  is  $C_1-C_6$  alkyl, preferably methyl, to obtain 2-thioisosorbide 5-mononitrate (1),

AMENDED SHEET

000211

162

19



(1)

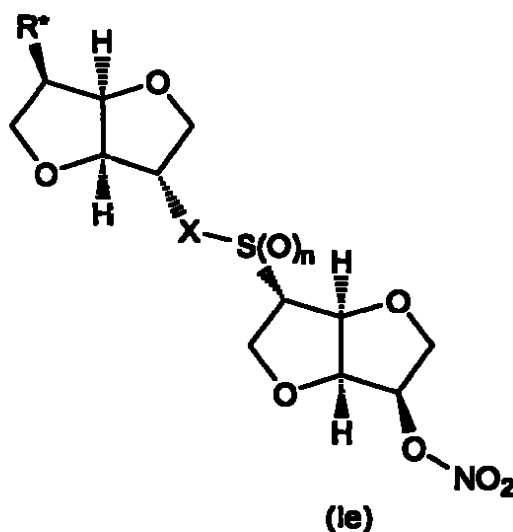
and

(b) optionally, effecting on the compound (1) prepared according to the step (a):

I. an oxidation reaction to obtain:

5,5'-dinitrato-2,2'-dithio-diisosorbide (2) or  
2-(isosorbidyl-2'-dithio)-isosorbide 5-  
mononitrate (8),

optionally followed by a second oxidation to  
obtain a compound according to formula (Ie):



(Ie)

wherein:

n is 1 or 2,

X is -S(O)<sub>m</sub>-, wherein m is 0, 1 or 2, and

AMENDED SHEET

160

R\* represents hydroxyl or ONO<sub>2</sub>;

II. a substitution reaction to obtain a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 0,

X represents a bond,

and R does not represent nitrosyl,

optionally followed by an oxidation to obtain:

a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 0,

X represents -S(O)<sub>m</sub>-, wherein m is an integer of 0 or 1,

and R does not represent nitrosyl;

III. a substitution reaction to obtain:

a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 0, and

X represents -S-;

optionally followed by an oxidation to obtain a compound according to formula (Ia), wherein:

n is an integer of 1 or 2, and

X represents -S(O)<sub>m</sub>-, wherein m is 0, 1 or 2; or

IV. a nitrosation reaction to obtain:

S-nitroso-2-thioisosorbide 5-mononitrate (6)

36. A process according to claim 34 or 35 that includes steps (a) and (b) II for the preparation of:

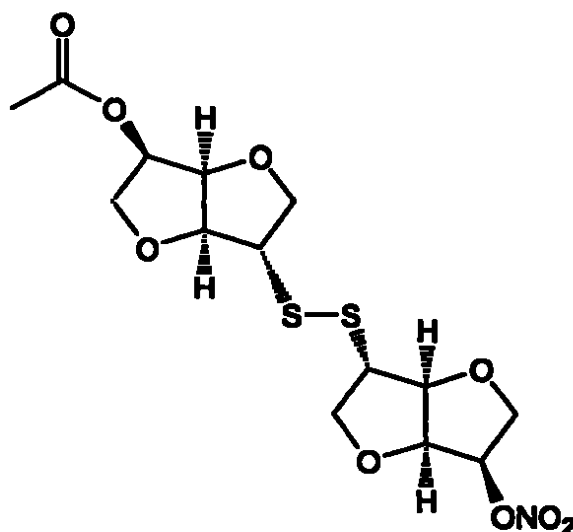
AMENDED SHEET

16a

2-[(R)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate, and/or  
2-[(S)-methylsulfinyl]isosorbide 5-mononitrate.

37. A process according to claim 35, that includes the separation of both diastereoisomers.

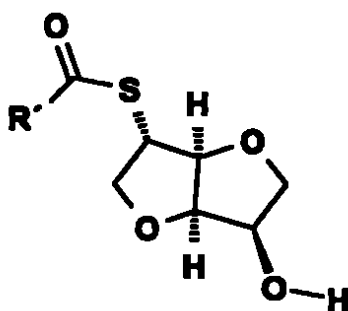
38. A process for preparing a compound of formula (11) or a tautomer, a pharmaceutically acceptable salt, a prodrug or a solvate thereof:



(11)

which process comprises the following steps:

a) effecting an oxidation of a compound of formula (III):

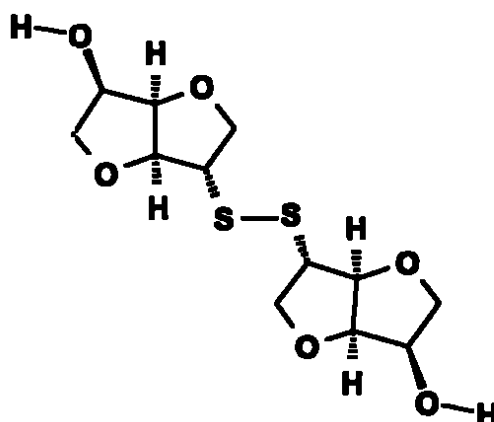


(III)

AMENDED SHEET

170

wherein R' is C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, preferably methyl,  
to obtain 2,2'-dithiodiisosorbide (10),



(10)

and

(b) effecting a nitration of the compound prepared in  
step (a) with a nitrating agent in the presence of a  
carboxylic anhydride, preferably acetic anhydride.

39. 2,2'-dithiodiisosorbide.

AMENDED SHEET

**TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES**  
**PCT**

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL**  
**SOBRE PATENTABILIDAD**

**(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)**  
**(Artículo 36 y Regla 70 PCT)**

Archivo de referencia del agente o solicitante

**105625 a/ubr**

**PARA ACCIÓN COMPLEMENTARIA**

Ver Forma PCT/IPEA/416

Solicitud Internacional No.

**PCT/EP2004/010882**

Fecha de presentación internacional (*día/mes/año*)

**29.09.2004**

Fecha de Prioridad (*día/mes/año*)

**03.10.2003**

Clasificación de Patente Internacional (IPC) o clasificación nacional e IPC

**C07D493/04, A61K31/34**

Solicitante

**LACER, S.A.**

1. Este Reporte de Examen Preliminar Internacional, se establece por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional de acuerdo con el Artículo 35 y se remite al solicitante de acuerdo con el Artículo 36.
2. Este REPORTE consiste de un total de 5 hojas, incluyendo esta hoja de portada.
3. Este reporte también se acompaña por ANEXOS, que comprenden:
  - a. ☒ *Enviar al solicitante y a la Oficina Internacional*) un total de hojas, como sigue:
    - ☒ Hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que se han corregido y son la base para este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas).

122

- ☐ Hojas que reemplazan hojas anteriores, pero que esta Autoridad considera contienen una corrección que va más allá de la descripción en la solicitud internacional como se presentó, como se indica en el ítem 4 de Casilla No. I y la Casilla Complementaria.
- b. ☐ (*enviar solo a la Oficina Internacional*) un total de (indique tipo y número de portador(es) electrónicos), que contienen un listado de secuencias y/o tablas relacionadas con esto, solo en forma legible por computador, como se indicó en la casilla complementaria que se relaciona con el listado de secuencias (ver Sección 802 de Instrucciones Administrativas)
4. Este Reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:
- |                                               |                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Casilla I | Base del Concepto                                                                                                                                                                   |
| <input type="checkbox"/> Casilla II           | Prioridad                                                                                                                                                                           |
| <input type="checkbox"/> Casilla III          | Concepto de sin fundamento con respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial                                                                                       |
| <input type="checkbox"/> Casilla IV           | Falta de unidad de invención                                                                                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> Casilla V | Declaración motivada de acuerdo con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; las citaciones y explicaciones ayudan a dicha declaración |
| <input type="checkbox"/> Casilla VI           | Ciertos documentos citados                                                                                                                                                          |
| <input type="checkbox"/> Casilla VII          | Ciertos defectos en la solicitud internacional                                                                                                                                      |
| <input type="checkbox"/> Casilla VIII         | Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional                                                                                                                              |

Fecha de presentación de la petición

**03.08.2005**

Fecha de terminación de este reporte

**08.09.2005**

Nombre y dirección de correspondencia de la autoridad examinadora preliminar internacional

European Patent Office

D-80298 Munich

Teléfono. + 49 89 2399 – 0 Tx: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 – 4465

Funcionario Autorizado

Klein, D

Teléfono No. +49 89 2399-7896

123

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL  
SOBRE PATENTABILIDAD**

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2004/010882

**Casilla No. I      Bases del Reporte**

1. Con respecto al idioma, este reporte se basa en la solicitud internacional en el idioma en que este fue presentado, a menos que se indique otra cosa de acuerdo con este ítem.
  - ☐ Este reporte se basa en las traducciones del idioma original en el siguiente idioma,                      que es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de:
    - ☐ búsqueda internacional (de acuerdo con las Regla 12.3 y 23.1(b))
    - ☐ publicación de la solicitud internacional (de acuerdo con la Regla 12.4)
    - ☐ examen preliminar internacional (de acuerdo con las Reglas 55.2 y/o 55.3)
2. Con respecto a los **elementos\*** de la solicitud internacional, este reporte se basa en: *(reemplazo de las hojas que han sido suministradas a la Oficina de recepción en respuesta a una invitación de acuerdo con el Artículo 14 se refieren a en este reporte como "presentadas originalmente" y no se anexan a este reporte):*

**Descripción, Páginas:**

1-66                      como se presentó originalmente

**Reivindicaciones, Números:**

1-39                      recibido en 03.08.2005

- ☐ una lista de secuencias y/o cualquier tabla(s) relacionada – ver Casilla Complementaria Relacionada con la Lista de Secuencias

3. Las correcciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ La descripción, páginas:

000218

124

- ☐ Las reivindicaciones, Nos.:
  - ☐ Los dibujos, hojas/figuras
  - ☐ La lista de secuencias (*Especifique*)
  - ☐ Cualquier tabla(s) relacionada con la lista de secuencias (*especifique*):
4. ☐ Este reporte ha sido emitido como si (algunas de) las correcciones no hubieran sido hechas, ya que ellas han sido consideradas que van más allá de la descripción como se presentó, como se indicó en la Casilla Complementaria (Regla 70.2(c)):
- ☐ La descripción, páginas:
  - ☐ Las reivindicaciones, Nos.:
  - ☐ Los dibujos, hojas/figuras
  - ☐ La lista de secuencias (*Especifique*)
  - ☐ Cualquier tabla(s) relacionada con la lista de secuencias (*especifique*)

**\* si el ítem 4 aplica, algunas o todas de estas hojas pueden ser marcadas "reemplazado".**

175

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL  
SOBRE PATENTABILIDAD****Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2004/010882**

**Casilla No. V                      Declaración motivada de acuerdo con el Artículo  
35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; las  
citaciones y explicaciones ayudan a dicha declaración**

**1.      Declaración**

|                                      |            |                         |              |
|--------------------------------------|------------|-------------------------|--------------|
| <b>Novedad (N)</b>                   | <b>Si:</b> | <b>Reivindicaciones</b> | <b>1-39</b>  |
|                                      | <b>No:</b> | <b>Reivindicaciones</b> | <b>- - -</b> |
| <b>Nivel inventivo (IS)</b>          | <b>Si:</b> | <b>Reivindicaciones</b> | <b>1-39</b>  |
|                                      | <b>No:</b> | <b>Reivindicaciones</b> | <b>- - -</b> |
| <b>Aplicabilidad Industrial (IA)</b> |            |                         |              |
|                                      | <b>Si:</b> | <b>Reivindicaciones</b> | <b>1-39</b>  |
|                                      | <b>No:</b> | <b>Reivindicaciones</b> |              |

**2.      Citaciones y Explicaciones (Regla 70.7):  
Ver hoja separada**

176

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL  
SOBRE PATENTABILIDAD  
(HOJA SEPARADA)**

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2004/010882

**Re ítem V**

**Declaración motivada con respecto a novedad, nivel inventivo, aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones apoyan dicha declaración**

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: WO 00/20420 A1 (LACER, S.A.; REPOLLES MOLINER, JOSE; PUBILL COY, FRANCISCO; CABEZA LLOR) 13 Abril 2000 (2000-04-13)

D2: LUCCHI DE O ET AL: "CHEMOSELECTIVE REDUCTION OF ISOSORBIDE-2,5-DINITRATE" GACETA CHIMICA ITALIANA, COSIETA CHIMICA ITALIANA, ROME, IT, vol 117, no. 3, Marzo 1987 (1987-03), páginas 173-176, XP000984806 ISSN: 0016-5603

D3: BALLEET, JEAN PIERRE ET AL: "Síntesis of a series of hexitol and aminodeoxy-hexitol mono-nitrate derivatives containing a sulfur group and pharmacological evaluation of isolated rat aortas" EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, (5), 933-943 CODEN: EJOCFK; ISSN: 1434-193X, 1998, XP001204497

D4: EP-A1-0 530 887 (LABORATORIOS HOECHST S.A.) 10 Marzo 1993 (1993-03-10)

D5: EP-A2-0 290 885 (CHIESI FARMACEUTICI S.P.A.) 17 Noviembre 1988 (1988-11-17)

D6: Ffr-a-2 134 6985 (AMERICAN HOME PRODUCTS; AMERICAN HOME PRODUCTS, US) 8 Diciembre 1972 (1972-12-08)

172

**Novedad e inventiva (Artículo 33(2) & (3) PCT):****Reivindicaciones 1-17, 34-39:**

La materia objeto de las reivindicaciones 1-17, 34-39 se relacionan con derivados de 1,4:3,6 dianhidrohexita para el tratamiento de desórdenes vasculares y el proceso para la preparación de éstos.

En razón a que ninguna de las técnicas anteriores describe dicha materia objeto, las reivindicaciones 1-17, 34-39 se consideran nuevas de acuerdo con el Artículo 33(2) PCT.

Adicionalmente, los compuestos reivindicados no se pueden derivar de la combinación de D1 con D2-D6 en una forma obvia y, el hecho de que ellas también poseen actividad antitrombótica en una dosis que no modifica la presión sanguínea y sinergiza adicionalmente con otros compuestos tales como trombolíticos, anticoagulantes, etc., (que se describen en la técnica anterior disponible) también se considera como un efecto inesperado que contribuye al reconocimiento de inventiva.

**Reivindicaciones 18-33:**

Reivindicaciones 18-33 se relacionan con los usos de los compuestos de las reivindicaciones 1-17 así como también los compuestos conocidos de D1.

Debido a que ninguno de los usos reivindicados se describe o sugiere en la técnica anterior, las reivindicaciones 18-33 se considera nuevo e inventivo de acuerdo con el Artículo 33(2) & (3) PCT.

**Observaciones relacionadas con Claridad (Artículo 6 PCT):**

La frase "... en donde una déficit de óxido nítrico juega u papel importante en su patogénesis ..." en las reivindicaciones 15, 18, 19 es vaga y no es clara en cuanto a lo que significa, "importancia" es algo bastante relativo.

03-08-2005

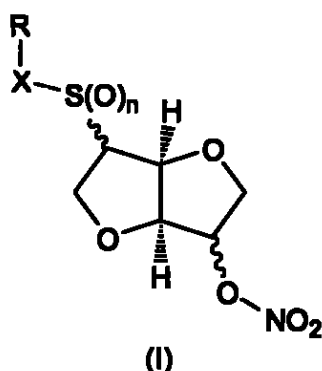
EP0410882

PCT/EP2004/010882  
Lácer, S.A.

105625 01/SVM  
Agosto 3, 2005

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) ó un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo:



donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-\text{S}(\text{O})_m-$ ,  $-(\text{C}=\text{O})-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando X representa  $-(\text{C}=\text{O})-$  entonces n es 0,

R representa hidrógeno o es un residuo  $\text{R}^a$ , siendo dicho residuo  $\text{R}^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

- C<sub>1-6</sub> alquilo;
- C<sub>2-6</sub> alquenilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por O, S, NH o  $\text{NCH}_3$ ;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por O, S, NH o  $\text{NCH}_3$ ;
- fenilo;

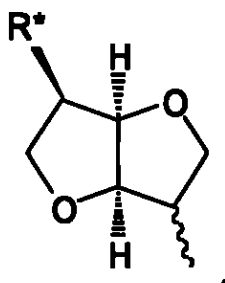
HOJA CORREGIDA

03-08-2005

EP0410882

2

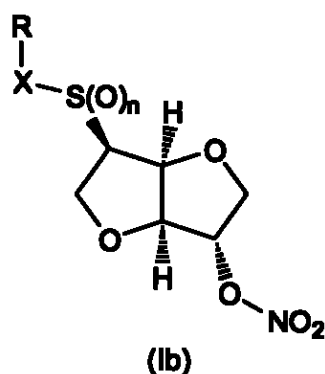
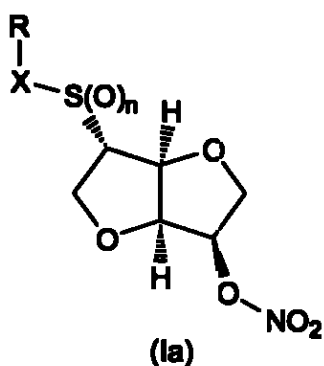
piridilo;  
 tiofenilo;  
 nitrosilo;  
 S-cisteinil;  
 S-glutationil; y



donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

en el que  $R^a$  opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

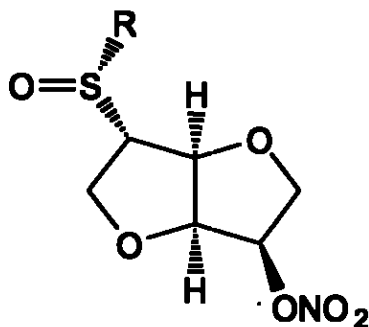
con la condición que cuando  $RXS(O)_n$ - y  $-ONO_2$  estén en forma trans uno respecto al otro, en lo que respecta al plano de anillo, tal y como se describe en las fórmulas (Ia) y (Ib):



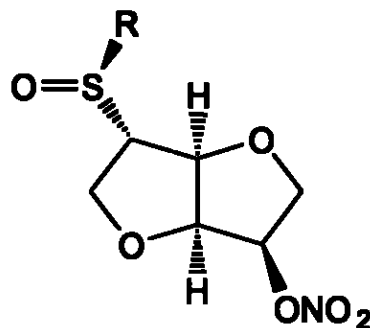
HOJA CORREGIDA

entonces  $RXS(O)_n$  no representa  $Z-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-S-$ , donde Z es un grupo alquilo  $C_{1-4}$ , un grupo arilo o un grupo aralquilo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde m, n, ó ambos es 0.
3. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde X representa un enlace sencillo o -S-.
4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R representa hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo,  $(C_{1-6}$  alquilo) $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $(C_{1-6}$  alquilo)  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, fenilo,  $(C_{1-6}$  alquilo)fenilo, 5-acetiloxiisosorbid-2-il, 5-hidroxiisosorbid-2-yl o 5-nitratoisosorbid-2-il.
5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R es  $C_{1-6}$  alquilo.
6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un compuesto según la fórmula (Ic) ó (Id):



(Ic)



(Id)

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, seleccionado de entre:

2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
5,5'-dinitrato-2,2'-ditiodiisosorbida,  
2-metiltioisosorbida 5-mononitrato,  
2-[(R)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,  
2-[(S)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,  
2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato,  
2-metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato,  
S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
2-(tetrahidropiran-2-il-tio)isosorbida 5-mononitrato,  
2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato, y  
2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mono  
nitrato.

8. Una composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como ingrediente(s) activo(s), opcionalmente junto con uno o más excipiente(s), activador(es), agente(s) quelante(s) y/o estabilizador(es) fisiológicamente aceptables.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 que además contiene un agente trombolítico, preferentemente un activador del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, que además contiene un agente anticoagulante, preferentemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosano.

HOJA CORREGIDA

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que además contiene un agente antitrombótico, preferentemente ácido acetil salicílico, dipyridamol, ticlopidina, clopidrogel, triflusal, polisulfato de pentosano o abciximab.

12. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que además contiene una inmunoglobulina o un fragmento de ésta con especificidad para la glicoproteína IIb/IIIa.

13. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que además contiene un agente hipolipemiente, preferentemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, eptastatina, lifibrol, acifrán, acitemato, glunicato y rosuvastatina.

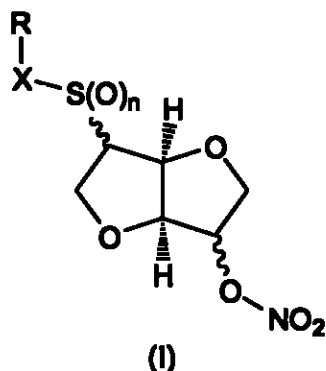
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que además contiene un agente antioxidante/secuestrador de radicales libres, preferentemente nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutathione, edaravona, raxofelast, licopeno, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-D-cisteína, una mezcla racémica de N-acetil-L-cisteína y N-acetil-D-cisteína o carvedilol.

15. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, enfermedades del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, donde las condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su patogénesis se seleccionan de entre las alergias, el ictus, la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades isquémicas cardiovasculares.

17. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del sistema circulatorio, preferentemente enfermedades cardiovascular y/o coronaria.

18. El uso de al menos un compuesto de la fórmula (I) ó de un tautómero, de una sal farmacéuticamente aceptable, de una prodroga o de un solvato del mismo:



donde:

$n$  es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

$\text{X}$  representa  $-\text{S(O)}_m-$ ,  $-(\text{C=O})-$  o un enlace sencillo, donde  $m$  es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando  $\text{X}$  representa  $-(\text{C=O})-$  entonces  $n$  es 0,

$\text{R}$  representa hidrógeno o es un residuo  $\text{R}^a$ , siendo dicho residuo  $\text{R}^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

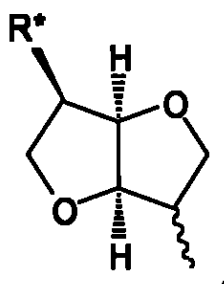
- $\text{C}_{1-6}$  alquilo;
- $\text{C}_{2-6}$  alquenilo;
- $\text{C}_{3-8}$  cicloalquilo;
- $\text{C}_{3-8}$  cicloalquilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  o  $\text{NCH}_3$ ;
- $\text{C}_{4-8}$  cicloalquenilo;
- $\text{C}_{4-8}$  cicloalquenilo, donde un grupo  $\text{CH}_2$  es sustituido por  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NH}$  o  $\text{NCH}_3$ ;
- fenilo;
- piridilo;
- tiofenilo;
- nitrosilo;
- S-cisteinil;
- S-glutationil; y

HOJA CORREGIDA

03-08-2005

EP0410882

8



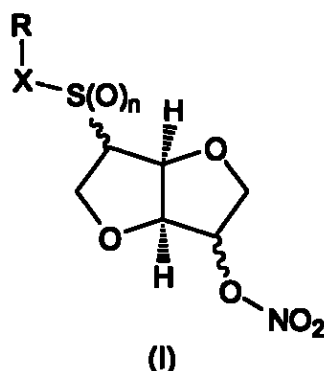
donde R\* es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

en el que R\* opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

como ingrediente(s) activo(s) para la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o el daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión.

HOJA CORREGIDA

19. El uso de al menos un compuesto de la fórmula (I):



o de un tautómero, de una sal farmacéuticamente aceptable, de una prodroga o de un solvato del mismo como un ingrediente(s) activo(s) para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o el daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión,

que incluya la administración de dicho compuesto o de un tautómero, de una sal farmacéuticamente aceptable, de una prodroga o de un solvato del mismo a un paciente que lo necesite,

HOJA CORREGIDA

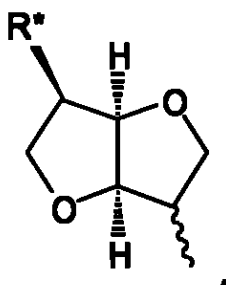
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-S(O)_m-$ ,  $-(C=O)-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando X representa  $-(C=O)-$  entonces n es 0,

y R representa hidrógeno o es un residuo  $R^a$ , siendo dicho residuo  $R^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

C<sub>1-6</sub> alquilo;  
C<sub>2-6</sub> alquenilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
fenilo;  
piridilo;  
tiofenilo;  
nitrosilo;  
S-cisteinil;  
S-glutationil; y



HOJA CORREGIDA

donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

en el que  $R^a$  opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno.

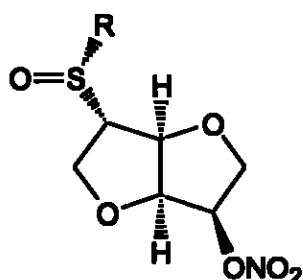
20. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 18 ó 19, donde m, n, o ambas, es 0.

21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde X represente un enlace sencillo o -S-.

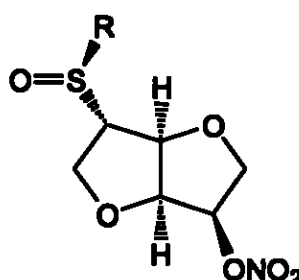
22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde R representa hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo,  $(C_{1-6}$  alquilo) $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $(C_{1-6}$  alquilo)  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, fenil o  $(C_{1-6}$  alquilo)fenilo.

23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, donde R es  $C_{1-6}$  alquilo.

24. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en el que el compuesto según la fórmula (I) es un compuesto según la fórmula (Ic) o (Id):



(Ic)

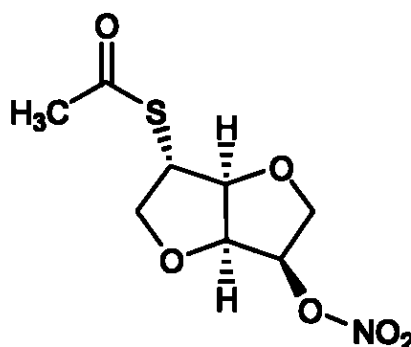


(Id)

25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre:

2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
5,5'-dinitrato-2,2'-ditiodiisosorbida,  
2-metiltioisosorbida 5-mononitrato,  
2-[(R)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato,  
2-[(S)-metilsulfinil]isosorbida 5-mononitrato  
2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato,  
2-metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato,  
S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
2-(tetrahidropiran-2-il-tio)isosorbida 5-mononitrato,  
2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato, y  
2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mono  
nitrato.

26. El uso de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, donde el compuesto es 2-acetiltioisosorbida 5-mononitrato, que se representa mediante la siguiente fórmula:



27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, donde la composición farmacéutica también incluye un agente trombolítico, preferentemente un activador del

HOJA CORREGIDA

plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa.

28. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 27, donde la composición farmacéutica también incluye un agente anticoagulante, preferentemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosano.

29. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 28, donde la composición farmacéutica además contenga un agente antitrombótico, preferentemente ácido acetil salicílico, dipiridamol, ticlopidina, clopidrogel, triflusal, polisulfato de pentosano o abciximab.

30. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 29, donde la composición farmacéutica además contiene inmunoglobulina o un fragmento de ésta con especificidad por la glicoproteína IIb/IIIa.

31. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 30, donde la composición farmacéutica además contiene un agente hipolipemiente, preferentemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, eptastatina, lifibrol, acifrán, acitemato, glunicato o rosuvastatina.

03-08-2005

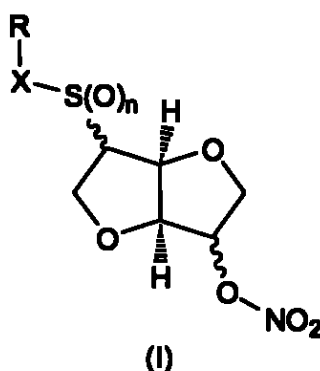
EP0410882

14

32. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 31, donde la composición farmacéutica también contiene un agente antioxidante/secuestrador de radicales libres, preferentemente nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutathione, edaravona, raxofelast, licopeno, N-acetil-L-cisteína, N-acetil-D-cisteína, una mezcla racémica de N-acetil-L-cisteína y N-acetil-D-cisteína o carvedilol.

33. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 32, en el que las condiciones patológicas donde el estrés oxidativo juega un papel importante en su patogénesis es seleccionado de entre las alergias, el ictus, la enfermedad de Alzheimer, y las enfermedades isquémicas cardiovasculares

34. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga ó un solvato del mismo:



HOJA CORREGIDA

03-08-2005

15

EP0410882

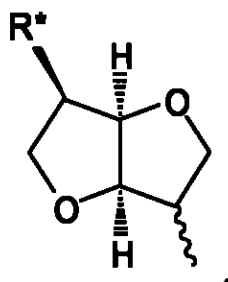
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-S(O)_m-$ , o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

y R representa hidrógeno o es un residuo  $R^a$ , siendo dicho residuo  $R^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

C<sub>1-6</sub> alquilo;  
 C<sub>2-6</sub> alquenilo;  
 C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;  
 C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
 C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;  
 C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
 fenilo;  
 piridilo;  
 tiofenilo;  
 nitrosilo;  
 S-cisteinil;  
 S-glutationil; y



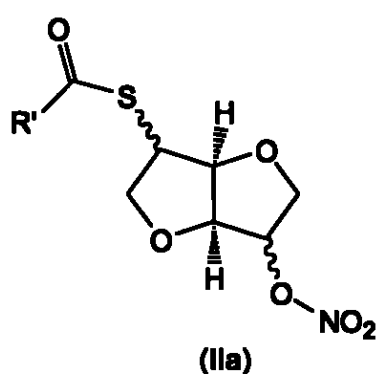
donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

HOJA CORREGIDA

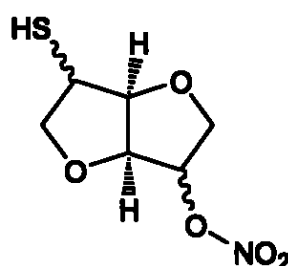
en el que  $R^a$  opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

cuyo proceso comprende la realización de los pasos siguientes:

- a) efectuar la hidrólisis de un compuesto de fórmula (IIa):



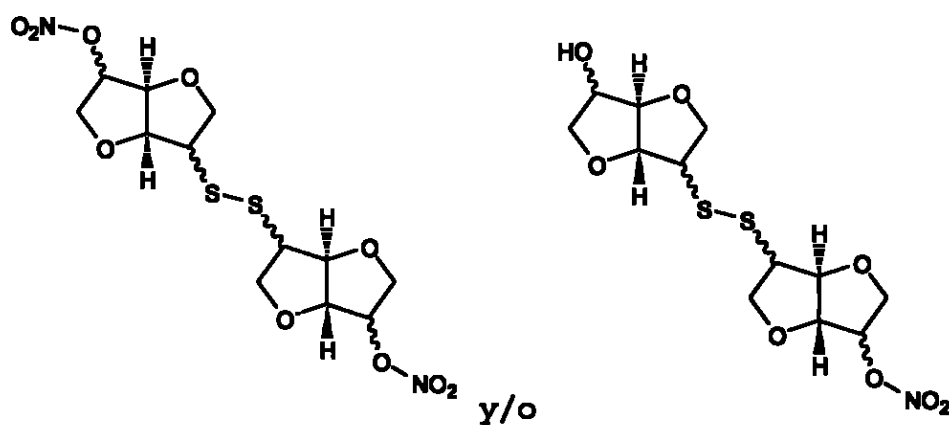
donde  $R'$  es  $C_{1-6}$  alquilo, preferentemente metilo, para obtener el siguiente compuesto



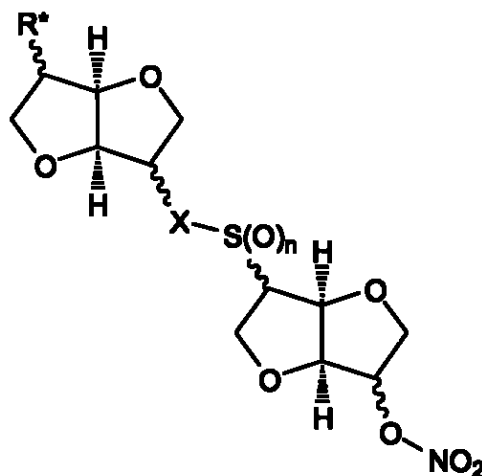
y

b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto preparado de acuerdo con la etapa (a):

I. una reacción de oxidación para obtener:



opcionalmente seguido por una segunda oxidación para obtener:



donde:

n es 1 ó 2,

HOJA CORREGIDA

03-08-2005

EP0410882

18

X es  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, y

R\* representa hidroxilo o  $ONO_2$ ;

II. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 0,

X representa un enlace,

y R no representa nitrosilo,

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener

un compuesto según la fórmula (I), donde:

n es un número entero de 0,

X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es un número entero de

0 ó 1,

Y R no representa nitrosilo;

III. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto según la fórmula (I), donde:

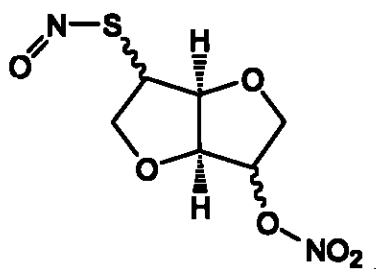
n es un número entero de 0,

X representa  $-S-$ ;

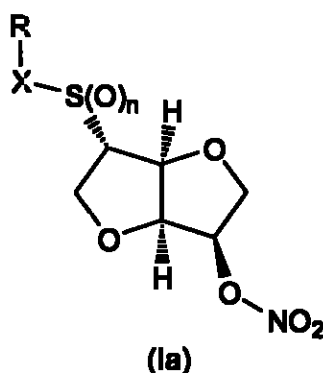
HOJA CORREGIDA

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (I), donde:  
n es un número entero de 1 ó 2, y  
X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, ó

IV. una reacción de nitrosación para obtener:



35. Un proceso según la reivindicación 34 para preparar un compuesto de fórmula (Ia), un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga ó un solvato del mismo:



03-08-2005

20

EP0410882

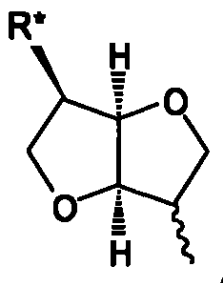
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-S(O)_m-$ , o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

y R representa hidrógeno o es un residuo  $R^a$ , siendo dicho residuo  $R^a$  seleccionado de entre un grupo que comprende:

C<sub>1-6</sub> alquilo;  
C<sub>2-6</sub> alquenilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;  
C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;  
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;  
fenilo;  
piridilo;  
tiofenilo;  
nitrosilo;  
S-cisteinil;  
S-glutationil; y



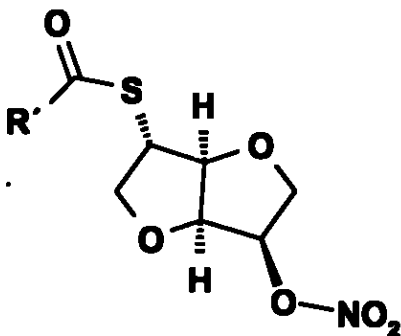
HOJA CORREGIDA

donde R\* es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

en el que R<sup>a</sup> opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno,

y donde el mencionado proceso comprende la realización de los pasos siguientes:

- a) efectuar una hidrólisis de un compuesto de la fórmula (II):



(II)

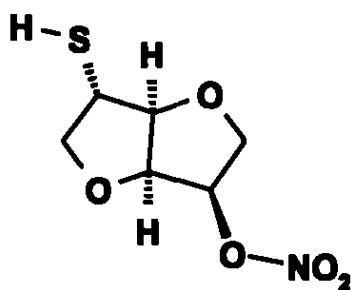
donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo, para obtener 2-tioisoscorbida 5-mononitrato (1),

.. 000243  
199

03-08-2005

22

EP0410882



(1)

y

b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto (1) preparado de acuerdo con la etapa (a):

I. una reacción de oxidación para obtener:

5,5'-dinitrato-2,2'-ditiodiisosorbida (2) 6

2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato  
(8),

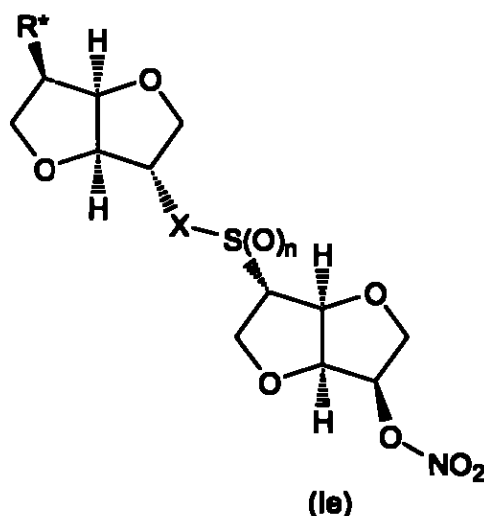
opcionalmente seguido por una segunda oxidación para obtener un compuesto según la fórmula (Ie):

HOJA CORREGIDA

03-08-2005

EP0410882

23



donde

n es 1 ó 2,

X es  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, y

R\* representa hidroxilo ó  $ONO_2$ ;

II. una reacción de sustitución para obtener un compuesto de acuerdo con la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 0,

X representa un enlace,

Y R no representa nitrosilo,

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener:

un compuesto de acuerdo con la fórmula (Ia), donde:

HOJA CORREGIDA

n es un número entero de 0,

X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es un número entero de

0 ó 1,

y R no representa nitrosilo;

III. una reacción de sustitución para obtener:

un compuesto según la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 0, y

X representa  $-S-$ ;

opcionalmente seguido por una oxidación para obtener

un compuesto según la fórmula (Ia), donde:

n es un número entero de 1 ó 2, y

X representa  $-S(O)_m-$ , donde m es 0, 1 ó 2, ó

IV. una reacción de nitrosación para obtener:

S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato (6)

36. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 34 ó 35

que incluye las etapas (a) y (b) II para la preparación de:

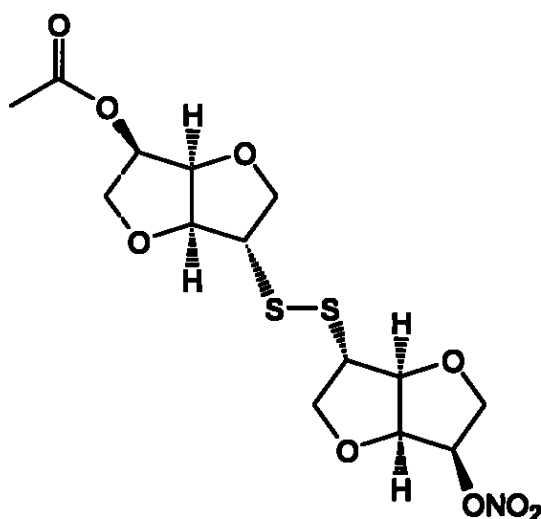
HOJA CORREGIDA

2-[(R)-metilsufinil]isosorbida 5-mononitrato y/o

2-[(S)-metilsufinil]isosorbida 5-mononitrato.

37. Un proceso según la reivindicación 35, que comprende la separación de ambos diastereoisómeros.

38. Un proceso para la preparación de un compuesto de formula (11), ó un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga ó un solvato del mismo:

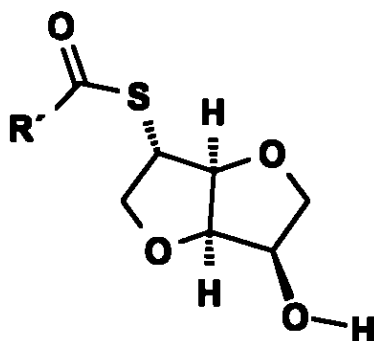


(11)

que comprende las siguientes etapas:

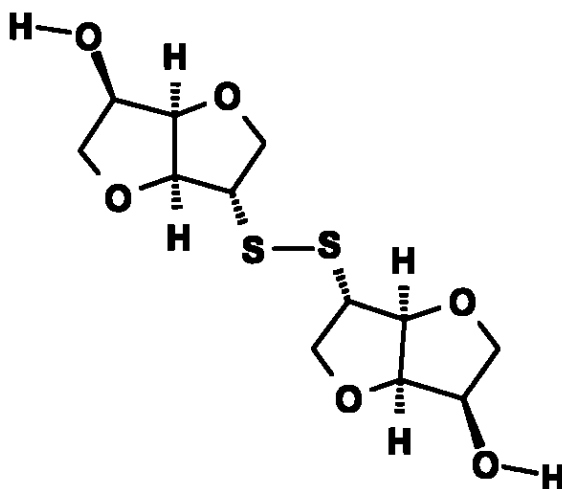
a) efectuar una oxidación de un compuesto de la fórmula (III):

HOJA CORREGIDA



(III)

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo,  
para obtener 2,2'-ditiodiisorbida (10),



(10)

y

b) efectuar una nitración del compuesto preparado en  
la etapa a) con un agente nitrante en presencia de

HOJA CORREGIDA

000243

204

03-08-2005

27

EP0410882

un anhídrido carboxílico, preferentemente anhídrido acético.

39. 2,2'-ditio-diisoborbida.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/010882

008249

109

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C07D493/04 A61K31/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | WO 00/20420 A1 (LACER, S.A; REPOLLES MOLINER, JOSE; PUBILL COY, FRANCISCO; CABEZA LLOR) 13 April 2000 (2000-04-13) cited in the application the whole document                                                                             | 1-39                  |
| Y          | LUCCHI DE O ET AL: "CHEMOSELECTIVE REDUCTION OF ISOSORBIDE-2,5-DINITRATE" GAZZETTA CHIMICA ITALIANA, SOCIETA CHIMICA ITALIANA, ROME, IT, vol. 117, no. 3, March 1987 (1987-03), pages 173-176, XP000984806 ISSN: 0016-5603 compounds 5C,6C | 1-39                  |
|            | -/-                                                                                                                                                                                                                                        |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.**\* Special categories of cited documents:**

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 2005

Date of mailing of the international search report

03/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 8818 Palantien 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klein, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/010882

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y          | NALLET, JEAN PIERRE ET AL: "Synthesis of a series of hexitol and aminodeoxy-hexitol mono-nitrate derivatives containing a sulfur group and pharmacological evaluation of isolated rat aortas" EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY , (5), 933-943 CODEN: EJOCFK; ISSN: 1434-193X, 1998, XP001204497 the whole document | 1-39                  |
| Y          | EP 0 530 887 A1 (LABORATOIRES HOECHST S.A) 10 March 1993 (1993-03-10) the whole document                                                                                                                                                                                                                                | 1-39                  |
| Y          | EP 0 290 885 A2 (CHIESI FARMACEUTICI S.P.A) 17 November 1988 (1988-11-17) the whole document                                                                                                                                                                                                                            | 1-39                  |
| Y          | FR 2 134 698 A5 (AMERICAN HOME PRODUCTS; AMERICAN HOME PRODUCTS,US) 8 December 1972 (1972-12-08) the whole document                                                                                                                                                                                                     | 1-39                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/010882

000251

100

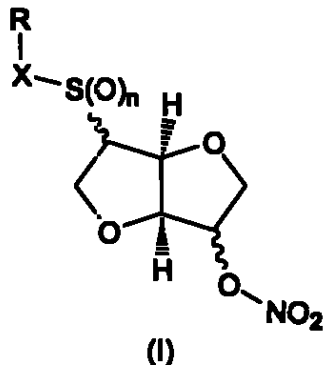
| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0020420                                | A1 | 13-04-2000          | ES 2142773 A1              | 16-04-2000          |
|                                           |    |                     | AU 762724 B2               | 03-07-2003          |
|                                           |    |                     | AU 6204199 A               | 26-04-2000          |
|                                           |    |                     | BG 105417 A                | 31-12-2001          |
|                                           |    |                     | BR 9914355 A               | 26-06-2001          |
|                                           |    |                     | CA 2346010 A1              | 13-04-2000          |
|                                           |    |                     | CN 1322205 T               | 14-11-2001          |
|                                           |    |                     | CZ 20011257 A3             | 15-08-2001          |
|                                           |    |                     | DE 19983612 T0             | 27-09-2001          |
|                                           |    |                     | EA 3360 B1                 | 24-04-2003          |
|                                           |    |                     | EE 200100207 A             | 17-06-2002          |
|                                           |    |                     | EP 1120419 A1              | 01-08-2001          |
|                                           |    |                     | GB 2359810 A , B           | 05-09-2001          |
|                                           |    |                     | HR 20010256 A1             | 30-04-2002          |
|                                           |    |                     | HU 0103937 A2              | 28-02-2002          |
|                                           |    |                     | ID 29946 A                 | 25-10-2001          |
|                                           |    |                     | JP 2002526544 T            | 20-08-2002          |
|                                           |    |                     | NO 20011778 A              | 06-04-2001          |
|                                           |    |                     | NZ 510855 A                | 27-02-2004          |
|                                           |    |                     | PL 347030 A1               | 11-03-2002          |
|                                           |    |                     | TR 200100961 T2            | 21-02-2003          |
|                                           |    |                     | US 2003225134 A1           | 04-12-2003          |
|                                           |    |                     | US 2001051735 A1           | 13-12-2001          |
|                                           |    |                     | ZA 200102836 A             | 05-07-2002          |
| EP 0530887                                | A1 | 10-03-1993          | FR 2680173 A1              | 12-02-1993          |
|                                           |    |                     | CA 2113922 A1              | 18-02-1993          |
|                                           |    |                     | WO 9303037 A1              | 18-02-1993          |
|                                           |    |                     | EP 0604459 A1              | 06-07-1994          |
|                                           |    |                     | HU 70546 A2                | 30-10-1995          |
|                                           |    |                     | JP 7500817 T               | 26-01-1995          |
|                                           |    |                     | MX 9204613 A1              | 01-09-1993          |
|                                           |    |                     | US 5591758 A               | 07-01-1997          |
|                                           |    |                     | ZA 9205892 A               | 28-07-1993          |
| EP 0290885                                | A2 | 17-11-1988          | IT 1204571 B               | 10-03-1989          |
|                                           |    |                     | JP 63297383 A              | 05-12-1988          |
|                                           |    |                     | US 4956384 A               | 11-09-1990          |
| FR 2134698                                | A5 | 08-12-1972          | AU 465217 B2               | 18-09-1975          |
|                                           |    |                     | AU 4149672 A               | 01-11-1973          |
|                                           |    |                     | CA 967164 A1               | 06-05-1975          |
|                                           |    |                     | CH 576475 A5               | 15-06-1976          |
|                                           |    |                     | DE 2221080 A1              | 09-11-1972          |
|                                           |    |                     | DK 138182 B                | 24-07-1978          |
|                                           |    |                     | DK 138121 B                | 17-07-1978          |
|                                           |    |                     | GB 1356374 A               | 12-06-1974          |
|                                           |    |                     | NL 7205786 A               | 31-10-1972          |
|                                           |    |                     | SE 385895 B                | 26-07-1976          |
|                                           |    |                     | US 3886186 A               | 27-05-1975          |
|                                           |    |                     | ZA 7202868 A               | 19-12-1973          |

207

|                                                                                                                                                                                                |  |                                                                                                                                                                                                                  |  |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--------|
|  <b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                                              |  | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b>                                      |  | 000252 |
| (21) N° de solicitud:<br><br>22) Fecha de solicitud: 03/05/06<br><br>(30) Prioridad (31) No. 200302368 (32) Fecha 03/10/03 (33) País ES                                                        |  | (51) Int Cl: C07D 483/04<br><br>(71) Solicitante(s) LACER S.A.<br><br>(72) Inventor(es) REPOLLES MOLINER, José<br>SALAS PEREZ-RASILLA, Eduardo<br>PUBILL COY, Francisco<br>(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ |  |        |
| (85) Fecha límite inicio fase nacional:<br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud: 29/09/04<br>No. de solicitud PCT/EP2004/010882 |  | (87) Publicación internacional<br>Fecha: 28/04/05<br>N° publicación: WO 2005/037842 A1                                                                                                                           |  |        |
| (54) Título: DERIVADOS DE DISULFURO, SULFURO, SULFÓXIDO Y SULFONA DE AZÚCARES CÍCLICOS Y SUS USOS                                                                                              |  |                                                                                                                                                                                                                  |  |        |

Reivindicaciones:

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) ó un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, una prodroga o un solvato del mismo:



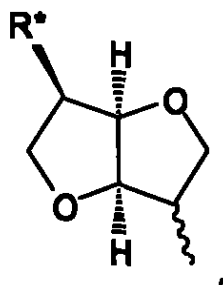
donde:

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa -S(O)<sub>n</sub>-, -(C=O)- o un enlace sencillo, donde n es un número entero de entre 0, 1, ó 2; con la condición que cuando X representa -(C=O)- entonces n es 0,

R representa hidrógeno o es un residuo R<sup>a</sup>, siendo dicho residuo R<sup>a</sup> seleccionado de entre un grupo que comprende:

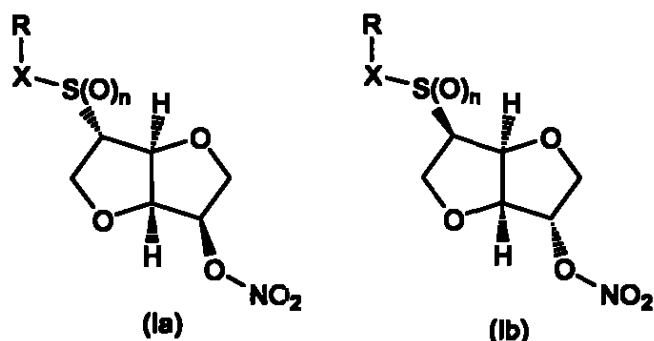
- C<sub>1-6</sub> alquilo;
- C<sub>2-6</sub> alquenilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;
- C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;
- C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;
- fenilo;
- piridilo;
- tiofenilo;
- nitrosilo;
- S-cisteinil;
- S-glutationil; y



donde  $R^*$  es seleccionado de entre el grupo que comprende hidrógeno,  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

en el que  $R^*$  opcionalmente es substituido por uno a tres grupos seleccionados por separado de entre  $C_{1-6}$  alquilo,  $C_{2-6}$  alquenilo,  $C_{3-8}$  cicloalquilo,  $C_{4-8}$  cicloalquenilo, acetiloxi, hidroxilo,  $ONO_2$  y halógeno,

con la condición que cuando  $RXS(O)_n$  y  $-ONO_2$  estén en forma trans uno respecto al otro, en lo que respecta al plano de anillo, tal y como se describe en las fórmulas (Ia) y (Ib):



entonces  $RXS(O)_n$  no representa  $Z-\overset{O}{\parallel}C-S-$ , donde  $Z$  es un grupo alquilo  $C_{1-4}$ , un grupo arilo o un grupo aralquilo.

Folios 254 y 255  
Tañetas  
Gm



# Industria y Comercio

## SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
RSD: 05-041525-00000-0000 Fco: 2005-05-03 15:35:21  
Dep. 2020 NUECREACIONES  
Tte: 11 PATENTEYI Eje 379 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION Folios: 255

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

### REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

|                                                                                                             | USUARIO | RADICADOR |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|
| PATENTE DE INVENCION (✓) MODELO DE UTILIDAD ( )                                                             | ( )     | ( )       |
| -Indicación de que se solicita la concesión de una patente.                                                 | (✓)     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | (✓)     | ( )       |
| -Descripción de la invención.                                                                               | (✓)     | ( )       |
| -Dibujos de ser estos pertinentes.                                                                          | (✓)     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | (✓)     | ( )       |
| COMPLETA (✓) INCOMPLETA                                                                                     | ( )     | ( )       |
| DISEÑO INDUSTRIAL ( )                                                                                       |         |           |
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                                            | ( )     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )     | ( )       |
| -Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| COMPLETA ( ) INCOMPLETA                                                                                     | ( )     | ( )       |
| ESQUEMA DE TRAZADO ( )                                                                                      |         |           |
| -Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.                                            | ( )     | ( )       |
| -Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.                      | ( )     | ( )       |
| -Representación gráfica del Esquema Trazado.                                                                | ( )     | ( )       |
| -Comprobante de Pago de las tasas establecidas.                                                             | ( )     | ( )       |
| COMPLETA ( ) INCOMPLETA                                                                                     | ( )     | ( )       |

Firma Responsable:



Fecha:

Mayo 3, 2006

210

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

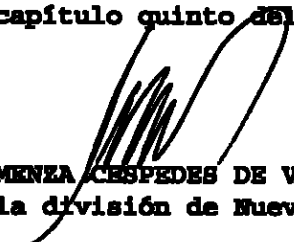
|            |                            |               |
|------------|----------------------------|---------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 06 41525      |
|            | Solicitud internacional    | EP2004/010882 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 03/05/2006    |
|            | Trámite                    | 11            |
|            | Evento                     | 379           |
|            | Actuación                  | 430           |
|            | Oficio No.                 | 8774          |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
2. La solicitud no contiene el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art.27-c) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

  
ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 AGO. 2006  
adpal