(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 605 494**

(51) Int. Cl.:

C07D 235/30 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/EP2013/078068**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102339**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13815780 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2938597**

(54) Título: **Sales de sulfato de N-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina, preparación y uso de las mismas**

(30) Prioridad:

27.12.2012 EP 12306690

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2017

(73) Titular/es:

ALZPROTECT (33.3%)
70 Rue du Docteur Yersin, Parc Eurasante
59120 Loos, FR;
INSERM (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE LILLE 2 DROIT ET SANTÉ (33.3%)

(72) Inventor/es:

BURLET, STÉPHANE;
ESTRELLA, CÉCILIA;
BARRIER, MATHIEU;
MELNYK, PATRICIA;
SERGEANT, NICOLAS;
BUEE, LUC y
VERWAERDE, PHILIPPE

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 605 494 T3

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

DESCRIPCIÓN

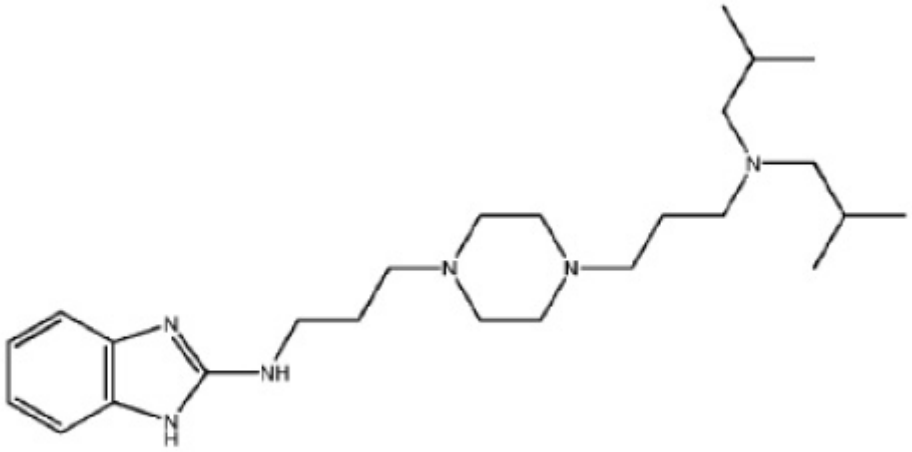
Sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, preparación y uso de las mismas

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a nuevas sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina y solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas, a su preparación, a composiciones farmacéuticas que las contienen, y al uso de las mismas en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

Estado de la técnica

La *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, que tiene la estructura de Fórmula I:



Fórmula I

pertenece a una familia de derivados de 1,4-bis(3-aminopropil)piperazina desvelados previamente en el documento WO2006/051489, y que son útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

La forma de base libre de este compuesto presenta problemas de estabilidad a largo plazo, probablemente debidos a oxidaciones que se producen en el anillo de piperazina. Además, la forma de base libre no cristaliza. De hecho, en términos de desarrollo de productos farmacéuticos, se prefieren las formas cristalinas de los principios activos. Por lo general, resuelven los problemas de estabilidad y se abren a los procesos de cristalización y/o recristalización, que son adecuados para la purificación a escala industrial, una alta reproducibilidad de lote a lote y, en particular, con respecto a la cristalinidad.

Aunque se sabe que la salificación de una molécula farmacéuticamente activa (PAM) puede mejorar sus propiedades físicoquímicas, la selección de una sal adecuada sigue siendo un proceso complejo. De hecho, la mejora de las propiedades físicoquímicas va más allá de la obtención de materiales sólidos estables. Estos sólidos deben comprender una fase cristalizada que tenga una buena cristalinidad y una morfología definida. En otros aspectos, las formas de sal pueden proporcionar otros beneficios tales como mejorar la hidrosolubilidad, pero también pueden ser igualmente perjudiciales debido a la higroscopicidad, a problemas de estabilidad o a la toxicidad intrínseca. Por lo tanto, la selección de la sal no puede hacerse arbitrariamente, y garantiza estudios en profundidad en primer lugar.

La sal de oxalato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, de la que, por cierto, se ha informado en el documento WO2006/051489, supera en parte los inconvenientes mencionados anteriormente encontrados con la base libre. Sin embargo, se requieren 4 equivalentes de ácido oxálico para obtener la sal de oxalato en forma de un polvo estable. Por consiguiente, el porcentaje en peso de la molécula farmacéuticamente activa con sales de oxalato se reduce a tan bajo como el 54 %. La cantidad de fármaco que se administrará para una dosis dada de PAM es, por tanto, significativamente mayor.

Además, los oxalatos ya no se consideran una de las sales más farmacéuticamente aceptables. Las sales de oxalato son, en ciertos casos, nefrotóxicas, por ejemplo, se sabe que el oxalato de naftidofurilo causa la cristaluria del oxalato de calcio y, por lo tanto, cálculos renales en pacientes de edad avanzada. Además, debido a la baja solubilidad del oxalato de calcio, el aumento de la concentración del oxalato de calcio en los fluidos corporales, incluyendo la orina (hiperoxaluria), puede conducir a la deposición de oxalato de calcio (oxalosis) en el tejido del riñón (nefrocalcinosis) o el tracto urinario (urolitiasis). La oxalosis puede afectar a muchos órganos diferentes cuando los riñones no pueden eliminar el oxalato de calcio. Los depósitos en los vasos sanguíneos pueden causar úlceras dolorosas en la piel que no se curan, los depósitos en la médula ósea causan anemia y los depósitos en el corazón causan anomalías del ritmo cardiaco o una mala función cardiaca. Los pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas, en general, son de edad avanzada y padecen otras patologías para las que reciben otras medicaciones. Sus riñones ya están, por lo tanto, muy solicitados para la excreción de los fármacos tomados por estos pacientes que, por cierto, tienen una menor sensación de sed y, por lo tanto, son propensos a la deshidratación. El exceso de oxalato de calcio finalmente se excreta en los pacientes con riñones sanos y que beben gran cantidad de agua. El exceso de oxalato de calcio es, de hecho, un problema real en el tratamiento, especialmente, para los ancianos. Además, los tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas suelen ser crónicos, durante períodos muy largos de tiempo, si no lo son durante toda la vida. El solicitante consideró que, debido a su toxicidad potencial para el riñón y el tracto urinario, las sales de oxalato añadirían una carga indebida a los pacientes ya debilitados por su afección. Así pues, el solicitante consideró las sales de oxalato farmacéuticamente inaceptables, sobre todo porque la *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina requiere 4 equivalentes del contraión de la sal para permanecer estable. Por lo tanto, a pesar de que las sales de oxalato permiten la obtención de materiales sólidos estables, implican el riesgo de efectos secundarios tóxicos.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad en la técnica de sales no higroscópicas, estables y cristalinas de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina que no presenten los inconvenientes mencionados anteriormente en términos de formación de sales y toxicidad.

Objeto de la invención

La presente invención se basa en los hallazgos inesperados de que las sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina proporcionan polvos cristalinos sueltos estables que no son higroscópicos y que satisfacen los exigentes criterios establecidos anteriormente.

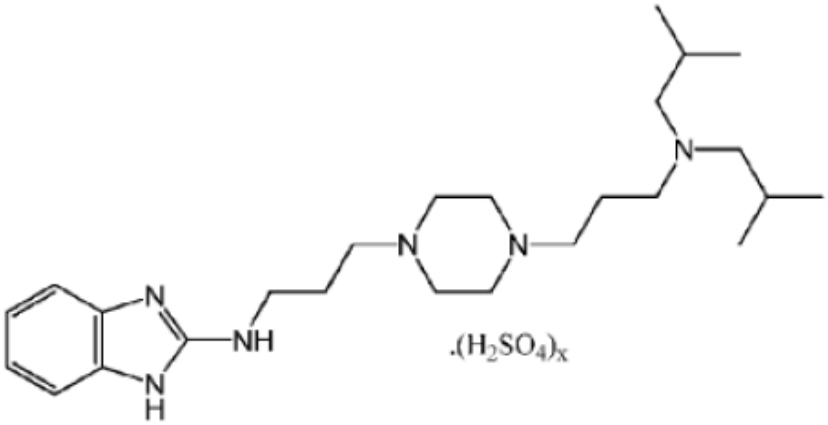
La invención se refiere, por tanto, a una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina y a solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma.

Las sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina y los solvatos de las mismas se obtienen en forma de polvos que tienen una fase cristalina con una buena cristalinidad y una morfología definida. Las sales de sulfato de la invención son, además, especialmente adecuadas para la preparación de composiciones farmacéuticas que las contengan. Son farmacéuticamente aceptables y, que el solicitante sepa, no se asocian con ningún tipo de toxicidad intrínseca. En este sentido, el solicitante ha llevado a cabo varios estudios crónicos *in vivo* con sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, y no ha observado ningún caso de toxicidad inesperada hasta la fecha.

Por otra parte, en comparación con otras sales, tales como las sales de oxalato, el peso molecular inferior de los iones de sulfato permite un aumento de la proporción en peso de la *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina con respecto al peso total de su sal. Por ejemplo, el porcentaje en peso de la PAM con sales de disulfato es del 69 %. Por lo tanto, en comparación con la sal de oxalato, la cantidad de sal de sulfato requerida para una dosis dada de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina se reduce. Esto, a su vez, disminuye la cantidad de producto administrada a un paciente y, por consiguiente, reduce los costes de producción de las composiciones farmacéuticas que contienen *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de la invención son sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina y solvatos farmacéuticamente aceptables las mismas. Más concretamente, las sales de sulfato de la invención y los solvatos de las mismas son aquellos de Fórmula II:



Fórmula II

en la que x es de 0,5 a 4, preferentemente x es de 0,5 a 3,5, más preferentemente x es de 0,9 a 3. En otras palabras, la sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina contiene de 0,5 a 4 equivalentes, preferentemente de 0,5 a 3,5 equivalentes, más preferentemente de 0,9 a 3 equivalentes de sulfato por molécula de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

En una realización, x es de 2,5 a 3,5, preferentemente de 2,6 a 3,2, más preferentemente x es de 2,8 a 3, incluso más preferentemente x es aproximadamente 2,9 o x es 2,9.

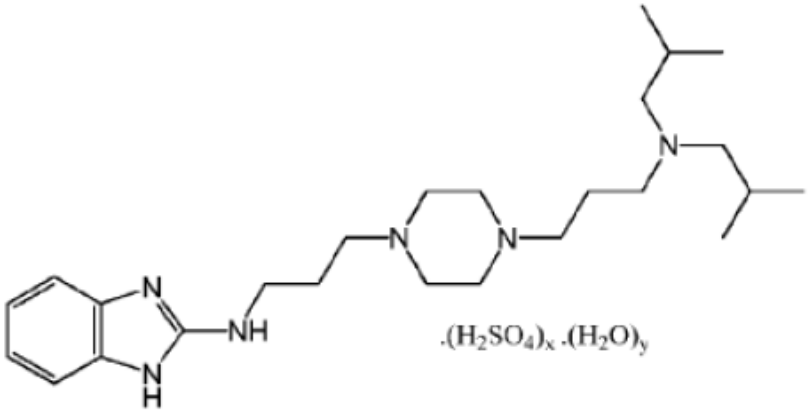
En otra realización, x es de 1,5 a 2,5, preferentemente x es de 1,5 a 2,1, más preferentemente x es de 1,7 a 1,9, incluso más preferentemente x es aproximadamente 1,8 o x es 1,8.

En otra realización más, x es de 0,5 a 1,5, preferentemente x es de 0,7 a 1,3, más preferentemente x es de 0,9 a 1,1, incluso más preferentemente x es aproximadamente 1 o x es 1.

En otra realización, x es de 1,7 a 2,3, preferentemente x es de 1,9 a 2,1, más preferentemente x es aproximadamente 2 o x es 2.

En una realización particular, la sal de sulfato de Fórmula II está en forma de un solvato farmacéuticamente aceptable, preferentemente un hidrato. La estequiometría del solvato es de entre 0,5 y 5, preferentemente de entre 1 y 4, más preferentemente de entre 1,5 y 2,5, aún más preferentemente y es de 1,8 a 2,2, incluso más preferentemente 2 o aproximadamente 2 moléculas de solvato por 1 molécula de la sal de sulfato de Fórmula II.

Los solvatos farmacéuticamente aceptables preferidos de sales de sulfato de Fórmula II son aquellos de Fórmula III:



Fórmula III

en la que

x es como se ha definido anteriormente en la Fórmula II e
y es de 0,5 a 5, preferentemente y es de 1 a 4, más preferentemente y es de 1,5 a 2,5, aún más preferentemente y es de 1,8 a 2,2, incluso más preferentemente y es aproximadamente 2 o y es 2.

Los compuestos preferidos de Fórmula III son aquellos en los que x es de 0,5 a 1,5, preferentemente de 0,8 a 1,2, más preferentemente x es de 0,9 a 1,1, incluso más preferentemente x es aproximadamente 1 o x es 1.

Los compuestos particularmente preferidos de la invención son compuestos de Fórmula III, en la que x es aproximadamente 1 e y es aproximadamente 2, o x es 1 e y es 2.

El solicitante ha demostrado que una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina y los solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma son útiles para rectificar el metabolismo del precursor de la proteína amiloide (APP) en cuatro puntos esenciales:

1) aumentando los fragmentos carboxi-terminales del APP (los CTF de APP), poseyendo todos ellos en común los últimos 50 aminoácidos del APP y, en especial, los que tienen actividades fisiológicas potenciales, tales como adaptadores α (los CTF de APP alfa) y adaptadores γ (los CTF de APP gamma o AICD para el dominio intracelular de APP);
2) aumentando la secreción de sAPP α, que presenta propiedades neuroprotectoras/neurotróficas;
3) reduciendo la producción de subproductos neurotóxicos del APP, es decir, péptidos β-amiloides (Aβ), especialmente en su forma x-42;
4) no modificando la expresión de APP y en ausencia de neurotoxicidad.

De hecho, las sales de sulfato de la invención y los solvatos de las mismas son útiles en la orientación del metabolismo de APP hacia las vías no amiloidogénicas de la corteza frontal y del hipocampo.

El solicitante también ha demostrado que una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina y los solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma son útiles para la alteración de la fosforilación de la proteína Tau patológica, a la vez que alivian los procesos del estrés oxidativo. Las proteínas Tau interactúan con la tubulina para estabilizar los microtúbulos y potenciar el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos, estando la estabilidad de los microtúbulos controlada por las isoformas y la fosforilación. Las patologías de Tau comprenden mecanismos que conducen a modificaciones anómalas de las proteínas Tau asociadas con los microtúbulos, a la agregación progresiva y a la acumulación en material fibrilar del interior de las neuronas degenerativas para formar los denominados ovillos neurofibrilares (NFT).

Además, y al contrario de otras sales, sus propiedades fisicoquímicas son especialmente útiles con respecto a la formulación o a la seguridad, la solubilidad, la estabilidad, la cristalinidad, la morfología y la toxicidad del fármaco.

Por lo tanto, las sales de sulfato de la invención son útiles como un medicamento, en particular, para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas y todas las enfermedades en las que se observa una disfunción del metabolismo del APP, incluyendo, pero sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, angiopatías amiloides, demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y síndrome de Down.

Las sales de sulfato de la invención son, por tanto, útiles como un medicamento, en particular, para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas y todas las enfermedades en las que se observa una disfunción de la fosforilación de la proteína Tau, incluyendo, pero sin limitación, tauopatías tales como demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17.

Por consiguiente, la invención también se refiere a una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad seleccionada entre enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy (DLB), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) con demencia frontotemporal, miopatía de cuerpos de inclusión con enfermedad ósea de Paget y/o demencia frontotemporal (IBMPFD), degeneración del lóbulo frontotemporal, sinucleopatías, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson, amiloidopatías incluyendo angiopatías amiloides, tauopatías, incluyendo la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17, enfermedades neuromusculares con inclusiones de proteínas, así como enfermedades del desarrollo, incluyendo el síndrome de Down. Preferentemente, la enfermedad se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) con demencia frontotemporal, miopatía de cuerpos de inclusión con enfermedad ósea de Paget y/o demencia frontotemporal (IBMPFD), degeneración del lóbulo frontotemporal, sinucleopatías, enfermedad de Huntington, amiloidopatías incluyendo angiopatías amiloides, tauopatías incluyendo demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17. Más preferentemente, la enfermedad se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, sinucleopatías, amiloidopatías incluyendo angiopatías amiloides y tauopatías incluyendo demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17. Incluso más preferentemente, la enfermedad se selecciona entre enfermedad de Alzheimer y tauopatías incluyendo demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17.

En otros términos, la divulgación también proporciona un método de tratamiento y/o de prevención de una enfermedad seleccionada entre enfermedades neurodegenerativas, amiloidopatías, tauopatías y enfermedades del desarrollo, en particular, las citadas anteriormente, así como realizaciones del mismo, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en el presente documento. En una realización particular, la enfermedad se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer y tauopatías.

En una realización particular, la invención también se refiere a una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma como se define en el presente documento para su uso en el retraso en un paciente de la aparición de una enfermedad seleccionada entre enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy (DLB), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) con demencia frontotemporal, miopatía por cuerpos de inclusión con la enfermedad ósea de Paget y/o demencia frontotemporal (IBMPFD), degeneración del lóbulo frontotemporal, sinucleopatías, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson, amiloidopatías incluyendo angiopatías amiloides, tauopatías incluyendo demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17, enfermedades neuromusculares con inclusiones de proteínas, así como enfermedades del desarrollo, incluyendo el síndrome de Down. Preferentemente, la enfermedad se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) con demencia frontotemporal, miopatía de cuerpos de inclusión con enfermedad ósea de Paget y/o demencia frontotemporal (IBMPFD), degeneración del lóbulo frontotemporal, sinucleopatías, enfermedad de Huntington, amiloidopatías incluyendo angiopatías amiloides, tauopatías incluyendo demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17. Más preferentemente, la enfermedad se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, sinucleopatías, amiloidopatías incluyendo angiopatías amiloides y tauopatías incluyendo demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17. Incluso más preferentemente, la enfermedad se selecciona entre enfermedad de Alzheimer y tauopatías incluyendo demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17.

En otros términos, la divulgación proporciona un método para retrasar, en un paciente, la aparición de una enfermedad seleccionada entre enfermedades neurodegenerativas, amiloidopatías, tauopatías y enfermedades del desarrollo, en particular, las citadas anteriormente, así como realizaciones del mismo, que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de una sal de sulfato de la invención o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. En una realización particular, la enfermedad se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer y tauopatías.

De acuerdo con una característica adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de modulación del metabolismo del APP, en un paciente, preferentemente en un animal de sangre caliente, y aún más preferentemente en un ser humano, que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina de la presente invención o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

De acuerdo con una característica adicional más de la presente divulgación, se proporciona un método de alteración de la fosforilación patológica de la proteína Tau, a la vez que se palian los procesos de estrés oxidativo en un

paciente, preferentemente, en un animal de sangre caliente, y aún más preferentemente en un ser humano, que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina de la presente invención o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma como se describe en el presente documento y al menos un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables. En una realización, la invención también engloba composiciones farmacéuticas que contienen, además de una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo, agentes terapéuticos y/o principios activos adicionales.

De acuerdo con una realización, las sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina de la invención, así como sus solvatos farmacéuticamente aceptables, se pueden administrar como parte de una terapia de combinación. Por lo tanto, se incluyen dentro del alcance de la invención realizaciones que comprenden la administración conjunta de composiciones y medicamentos que contienen, además de una sal de sulfato de la presente invención o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo, agentes terapéuticos y/o principios activos adicionales. Dichas pautas de múltiples fármacos, a menudo denominadas "terapia de combinación", se pueden usar en el tratamiento y/o en la prevención de cualquiera de las enfermedades o afecciones mediadas por o asociadas con la modulación del metabolismo del APP. El uso de dichas combinaciones de agentes terapéuticos es especialmente pertinente con respecto al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas mencionadas anteriormente en un paciente que necesita tratamiento o que se encuentra en riesgo de convertirse en dicho paciente.

Además del requisito de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de agentes activos además de las sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o de los solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas, puede haber razones adicionales que obliguen o recomienden encarecidamente el uso de combinaciones de fármacos que incluyan principios activos que representen una terapia adyuvante, es decir, que complementen y suplementen la función realizada por las sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina de la presente invención o los solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas. Los agentes terapéuticos adicionales adecuados usados con el fin del tratamiento adyuvante incluyen fármacos que, en lugar de tratar y/o prevenir directamente una enfermedad o afección mediada por o asociada con el metabolismo del APP, tratan enfermedades o afecciones producidas directamente como consecuencia de o que acompañan indirectamente a la enfermedad o afección básica o subyacente modulada por el metabolismo del APP.

De acuerdo con una característica adicional de la presente invención, una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma se pueden usar en terapia de combinación con otros fármacos usados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Más concretamente, el compuesto de Fórmula II, así como un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede usar como una terapia adjunta en combinación con inhibidores de la acetilcolinesterasa, incluyendo, pero sin limitación, donepezil (n.º CAS 120014-06-4), y sales y solvatos del mismo, galantamina (n.º CAS 357-70-0), y sales y solvatos de la misma, rivastigmina (n.º CAS 123441-03-2), y sales y solvatos de la misma, tacrina (n.º CAS 321-64-2), y sales y solvatos de la misma, o en combinación con antagonistas del receptor de glutamato NMDA, incluyendo, pero sin limitación, memantina (n.º CAS 19982-08-2), y sales y solvatos de la misma, o en combinación con inhibidor dual de la acetilcolinesterasa y antagonista del receptor de glutamato NMDA, incluyendo, pero sin limitación, huperzina A (n.º CAS 102518-79-6), y sales y solvatos de la misma, o en combinación con agonistas del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), incluyendo, pero sin limitación, liraglutida (n.º CAS 204656-20-2), y sales y solvatos de la misma, exenatida (n.º CAS 141732-76-5), y sales y solvatos de la misma, o en combinación con retinoides, incluyendo, pero sin limitación, acitretina (n.º CAS 55079-83-9), y sales y solvatos de la misma, o en combinación con bloqueadores de los canales de calcio (CCB), incluyendo, pero sin limitación, nilvadipina (n.º CAS 75530-68-6), y sales y solvatos de la misma, nitrendipina (n.º CAS 39562-70-4), y sales y solvatos de la misma, nimodipina (n.º CAS 66085-59-4), y sales y solvatos de la misma, o en combinación con bloqueadores de los receptores de la angiotensina, incluyendo, pero sin limitación, valsartán (n.º CAS 137862-53-4), y sales y solvatos de la misma, o en combinación con antibióticos de tetraciclina, incluyendo, pero sin limitación, minociclina (n.º CAS 10118-90-8), y sales y solvatos de la misma.

Por lo tanto, los métodos de tratamiento de la presente divulgación y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden emplear una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma en monoterapia. Sin embargo, dichos métodos y composiciones también pueden usarse en terapia múltiple, en la que una o más sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o su solvatos farmacéuticamente aceptables se administran en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En la realización descrita anteriormente, las combinaciones de sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o un solvato farmacéuticamente aceptable de las mismas y otros agentes terapéuticos activos pueden administrarse, en términos de formas de dosificación, bien por separado o combinados entre sí, y en términos de su tiempo de administración, bien en serie o simultáneamente. Por lo tanto, la administración de un agente componente puede ser previa, concurrente con o posterior a la administración del/de los otro/s agente/s componente/s.

En general, para un uso farmacéutico, las sales de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina o los solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas pueden formularse como una composición farmacéutica que comprenda al menos una sal de sulfato de la invención o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma y al menos un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos y/o principios activos adicionales.

Mediante ejemplos no limitantes, la composición farmacéutica puede estar en una forma farmacéutica adecuada para la administración oral, para la administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, o infusión intravenosa), para la administración tópica (incluyendo la ocular), para la administración por inhalación, mediante un parche cutáneo, mediante un implante, mediante un supositorio, etc. Dichas formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la forma de administración, así como los métodos y vehículos, diluyentes y excipientes para su uso en la preparación de las mismas, serán evidentes para el experto en la materia. Se hace referencia a la última edición de “Remington’s Pharmaceutical Sciences”. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en forma sólida y volver a disolverse o suspenderse antes de su uso.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de formas farmacéuticas incluyen comprimidos, píldoras, polvos, grageas, bolsitas, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, pomadas, cremas, lociones, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, gotas, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles (que, por lo general, se reconstituyen antes de su uso) para la administración en forma de bolo y/o para la administración continua, que se pueden formular con vehículos, excipientes y diluyentes que sean adecuados en sí para dichas formulaciones, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, celulosa, agua (estéril), metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, talco, estearato de magnesio, aceites comestibles, aceites vegetales y aceites minerales o mezclas adecuadas de los mismos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener, opcionalmente, otras sustancias que se usan comúnmente en las formulaciones farmacéuticas, tales como agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes dispersantes, agentes de desintegración, agentes estabilizantes, agentes isotónicos, agentes formador de volumen, cargas, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes colorantes, agentes antibacterianos y/o agentes antifúngicos tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, agentes de dispensación, reguladores del flujo, agentes de liberación, etc. Las composiciones también se pueden formular para proporcionar la liberación rápida, sostenida o retardada del/de los compuesto/s activo/s contenido/s en las mismas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención están preferentemente en una forma farmacéutica unitaria, y se pueden envasar convenientemente, por ejemplo en una caja, un blíster, un vial, un frasco, una oblea, una ampolla o en cualquier otro soporte o recipiente monodosis o multidosis adecuado (que pueda marcarse adecuadamente); opcionalmente, con uno o más folletos que contengan la información y/o instrucciones de uso del producto. En general, dichas dosis unitarias contendrán entre 0,05 y 1.000 mg, y normalmente entre 1 y 500 mg, de al menos un compuesto de la invención, por ejemplo, aproximadamente 10, 25, 50, 100, 200, 300 o 400 mg por dosis unitaria.

Por lo general, dependiendo de la afección que se vaya a prevenir o a tratar y de la vía de administración, por lo general, el compuesto activo de la invención se administrará entre 0,01 a 100 mg por kilogramo, más a menudo entre 0,1 y 50 mg, tal como entre 1 y 25 mg , por ejemplo, aproximadamente 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 o 25 mg, por kilogramo de peso corporal del paciente al día, pudiéndose administrar como una sola dosis diaria, dividida en una o más dosis diarias, o de manera esencialmente continua, por ejemplo, usando una infusión de goteo.

Todas las referencias a los compuestos de Fórmula II incluyen referencias a solvatos, en particular, a los compuestos de Fórmula III, complejos de múltiples componentes y cristales líquidos de los mismos.

Los compuestos desvelados a lo largo de presente solicitud se nombraron usando el programa ChemDraw® Ultra versión 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, EE.UU.).

La *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina se puede obtener como se desvela en el documento WO2006/051489. Las sales de sulfato y los solvatos de las mismas pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia tales como las que implican precipitación, cristalización, recristalización, liofilización, transferencia de fase o resinas de intercambio iónico.

Definiciones

El término "solvato", en el presente documento, se usa para describir un compuesto de la presente invención que contiene cantidades estequiométricas o subestequiométricas de una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables tales como etanol. El término "hidrato" se refiere a cuando dicho disolvente es agua. Las moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables se pueden cristalizar junto con el compuesto de la invención, y/o estar presentes en fase cristalina y/o amorfa de sus sólidos, y/o ser adsorbidas al mismo.

La expresión "enfermedad de Alzheimer", como se usa en el presente documento, designa todos los tipos de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo, pero sin limitación, los tipos esporádicos y familiares.

La expresión "miopatía por cuerpos de inclusión con la enfermedad ósea de Paget y/o demencia frontotemporal (IBMPFD)", como se usa en el presente documento, es un tipo de miopatía, más concretamente, una enfermedad multisistémica hereditaria de aparición en la edad adulta, que afecta a los músculos, los huesos y al sistema nervioso central. Los pacientes con dicha afección pueden presentar una variedad de manifestaciones, que comprenden miopatía por cuerpos de inclusión, enfermedad ósea de Paget, demencia frontotemporal y/o esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig).

La expresión "demencia con cuerpos de Lewy (DLB)", como se usa en el presente documento, también conocida como demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, enfermedad de cuerpos de Lewy corticales y demencia senil de tipo Lewy, es un tipo de demencia estrechamente asociada tanto con la enfermedad de Alzheimer como con la enfermedad de Parkinson. Se caracteriza por la presencia de cuerpos de Lewy, grupos de proteína alfa-sinucleína y ubiquitina en las neuronas, detectables en la histología *post mortem* del cerebro.

El término "sinucleopatías", como se usa en el presente documento, significa una enfermedad del sistema nervioso central caracterizada por deposiciones positivas en alfa-sinucleína en las neuronas.

La expresión "angiopatías amiloides", como se usa en el presente documento, significa las enfermedades relacionadas con los depósitos de amiloide que se forman en las paredes de los vasos sanguíneos del sistema nervioso central.

El término "tauopatías", como se usa en el presente documento, significa las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la agregación patológica de la proteína Tau en el cerebro humano.

La expresión "enfermedades del desarrollo", como se usa en el presente documento, significa cualquier afección que aparece en alguna etapa del desarrollo de un niño, y retrasa o evita el desarrollo de una o varias funciones fisiológicas tales como habilidades lingüísticas. Las enfermedades del desarrollo incluyen enfermedades psicológicas y físicas. Los ejemplos no limitantes de enfermedades del desarrollo son el trastorno del espectro autista (ASD), síndrome de Down, trastorno de déficit de atención (ADD) y trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD).

El término "paciente" se refiere a un animal de sangre caliente, más preferentemente a un ser humano, que está a la espera de recibir o que está recibiendo atención médica o que es/será sometido de un procedimiento médico.

El término "ser humano" se refiere a un sujeto de ambos géneros y en cualquier etapa del desarrollo (es decir, recién nacido, infantil, juvenil, adolescente, adulto).

Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento, como se usan en el presente documento, se entiende que incluyen aliviar, atenuar o abrogar una afección o enfermedad y/o sus síntomas acompañantes.

Los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención", como se usan en el presente documento, se refieren a un método de retardo o exclusión de la aparición de una afección o enfermedad y/o sus síntomas acompañantes, que evita que un paciente adquiera una afección o una enfermedad, o que reduce el riesgo de que un paciente adquiera una afección o enfermedad.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" (o más simplemente una "cantidad eficaz"), como se usa en el presente documento, significa la cantidad de agente activo o principio activo (por ejemplo, de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina que es suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en el paciente a quien se administra.

El término "administración", o una variante del mismo (por ejemplo, "administrar"), significa proporcionar el agente activo o principio activo (por ejemplo, la *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina), solo o como parte de una composición farmacéuticamente aceptable, al paciente en quien se va a tratar o prevenir la afección, el síntoma o la enfermedad.

"Farmacéuticamente aceptable" pretende significar que los ingredientes de una composición farmacéutica son compatibles entre sí y no perjudiciales para el paciente que los recibe.

La expresión "vehículo farmacéutico", como se usa en el presente documento, significa un vehículo o medio inerte usado como disolvente o diluyente en el que el agente farmacéuticamente activo se formula y/o administra. Los ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticos incluyen cremas, geles, lociones, soluciones y liposomas.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el espectro de DSC de la sal de tartrato (1 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

La **Figura 2** muestra el espectro de DSC de la sal de fumarato (1 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

La **Figura 3** muestra el espectro de DSC de la sal de oxalato (2 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

La **Figura 4** muestra el espectro de DSC de la sal de oxalato (3 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

La **Figura 5** muestra el espectro de DSC de la sal de oxalato (4 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

La **Figura 6** muestra el espectro de DSC de la sal de sulfato (1 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

La **Figura 7** muestra el espectro de DSC de la sal de sulfato (2 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina.

La **Figura 8** muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de oxalato (4 eq..).

La **Figura 9** muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (2,9 eq..) del Ejemplo 1.

La **Figura 10** muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1,8 eq..) del Ejemplo 2 (gráfica de intensidad superior) superpuesto con el de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (2,9 eq..) del Ejemplo 1 (gráfica de intensidad inferior).

La **Figura 11** muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1 eq..) del Ejemplo 3.

La **Figura 12** muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1 eq..) del Ejemplo 3 (gráfica inferior) superpuesto con el de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (base libre) (gráfica superior).

La **Figura 13-a** muestra fotografías de cristales de sal de oxalato (4 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, que se observan con un microscopio óptico, a zoom de 325 aumentos, bajo luz transmitida.

La **Figura 13-b** muestra fotografías de cristales de sal de oxalato (4 eq..) de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, que se observan con un microscopio óptico, a zoom de 325 aumentos, bajo luz polarizada cruzada.

La **Figura 14** muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (2 eq..) del Ejemplo 4.

La **Figura 15** muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (2 eq..) del Ejemplo 4 (gráfica inferior) superpuesto con el de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (base libre) (gráfica superior).

La **Figura 16** muestra la curva de secado de DVS a 25 ºC de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1 eq..) del Ejemplo 3.

La **Figura 17** muestra las gráficas de isotermas de sorción/desorción de DVS a 25 ºC de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1 eq..) del Ejemplo 3.

La **Figura 18** muestra los gráficas de isotermas de sorción/desorción de DVS a 25 ºC de la forma deshidratada de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1 eq..) del Ejemplo 3.

Las **Figuras 19-a a 19-d** muestran los resultados obtenidos para *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1,8 eq.) en el ensayo de metabolismo de APP *in vitro*. En todas las figuras, se proporcionan los resultados para el control (barra de color blanco) y la sal de sulfato de la invención a cuatro concentraciones (barras de color negro). La Figura 19-a muestra los niveles de la AICD; la Figura 19-b, los niveles de CTFα; la Figura 19-c, los niveles $A\beta_{1-42}$; y la Figura 19-d, los niveles sAPPα.

La **Figura 20** muestra los niveles de CTFα medidos en la corteza frontal de ratones tratados con varias dosis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1,8 eq.) (ensayo de metabolismo de APP *in vivo*; tratamiento agudo de 24 h). Se proporcionan los resultados para el vehículo (barra de color blanco) y la sal de sulfato de la invención a cinco dosis (barras de color gris oscuro).

La **Figura 21** muestra los niveles de CTFα medidos en la corteza frontal de ratones tratados con varias dosis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (2 eq.) o de la sal de oxalato del documento WO2006/051489 (ensayo de metabolismo de APP *in vivo*; tratamiento agudo de 24 h en ratones). Se proporcionan los resultados para el vehículo (barra de color blanco), la sal de oxalato (barras de color gris claro) y la sal de sulfato de la invención (barras de color gris oscuro) a 6 mg/kg.

Las **Figuras 22-a** y **22-b** muestran los resultados obtenidos para *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1,8 eq.) en el ensayo de metabolismo de APP *in vivo* (estudio crónico de 1 mes en ratas). En todas las figuras, se proporcionan los resultados para el vehículo (barra de color blanco) y la sal de sulfato de la invención a dos concentraciones (barras de color gris oscuro). La Figura 22-a muestra los niveles de CTF en la corteza frontal; y la Figura 22-b, los niveles de CTFβ en el hipocampo.

Las **Figuras 23-a**, **23-b** y **23-c** muestran los resultados obtenidos para *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, sal de sulfato (1,8 eq.) en el ensayo de metabolismo de APP *in vivo* (estudio crónico de 3 meses en ratones). En todas las figuras, se proporcionan los resultados para el vehículo (barra de color blanco) y la sal de sulfato de la invención a tres concentraciones (barras de color gris oscuro). La Figura 23-a muestra los niveles de AT100; la Figura 23-b, los niveles AT8; y la Figura 23-c, los niveles de LPO.

EJEMPLOS DE QUÍMICA

A lo largo de la presente solicitud, se usan las siguientes abreviaturas: ºC: grados centígrados, DIPE: di-*iso*-propiléter, DSC: calorimetría diferencial de barrido, DVS: sorción/desorción dinámica de vapor de agua, δ: desplazamientos químicos de RMN expresados en ppm, eq. : equivalente/s, Et: etilo, g: gramo/s, h: hora/s, HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, IPA: isopropanol, IR: infrarrojo, l: litro/s, LCMS: HPLC combinada a un espectrómetro de masas, M: mol/l, mM: mmol/l, µM: µmol/l, Me: metilo, mg: miligramo/s, min: minuto/s, ml: mililitro/s, mol: mol/es, mmol: milimol/es, µmol: micromol/es, MS: espectrometría de masas, RMN: resonancia magnética nuclear, ppm: partes por millón, HR: humedad relativa, mr: mezcla de reacción, rpm: serie/s por minuto, Tr: tiempo de retención, TA: temperatura ambiente (aproximadamente 15-25 ºC), RR: recipiente de reacción, THF: tetrahidrofurano, XRPD: difracción de rayos X de polvo, W: vatio/s.

Todas las temperaturas presentadas se expresan en grados centígrados (ºC); todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (TA) a menos que se indique lo contrario.

Los procedimientos de configuración o purificación experimentales que se usaron en la presente invención, cuando no se describen en detalles específicos, se supone que son conocidos por los versados en la técnica y que se describen en manuales de referencia convencionales tales como: i) Gordon, A. J.; Ford, R. A. "The Chemist's Companion - A Handbook of Practical Data, Techniques, and References", Wiley: Nueva York, 1972; ii) “Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry”, Pearson Prentice Hall: Londres, 1989.

Análisis de HPLC

Método A:

Los espectros de HPLC normalmente se obtienen en un sistema de HPLC Waters Alliance 2695. El instrumento incluye un muestreador automático, una bomba cuaternaria y un detector de múltiples longitudes de onda de radiación ultravioleta. La cromatografía en columna usada fue una columna Waters X-Terra RP18, 5 µm, 4,6 x 250 mm.

El eluyente usado normalmente fue una mezcla de solución A (TFA al 0,1 % en H_2O) y solución B (TFA al 0,1 % en MeOH).

El gradiente se aplicó a un caudal de 1 ml por minuto de la siguiente manera: gradiente mantenido en las condiciones iniciales de solución B al 5 % durante 0 min, aumento lineal hasta solución B al 40 % en 50 min, se mantenimiento al 40 % durante 5 min, retorno a las condiciones iniciales en 1 min y mantenimiento durante 5 min.

Método B:

En una variante, los análisis de HPLC se llevaron a cabo de acuerdo con los parámetros desvelados en la Tabla 1 que se presenta a continuación.

Tabla 1: Parámetros de HPLC para el método B

Equipo de HPLC	Inyector/bomba: Waters Alliance 2695 Detector: Matriz de fotodiodos Waters 996 Software: Waters Millenium		
Columna	SymmetryShield C18 150 mm x 4,6 mm - espesor = 5 μm		
Fase móvil	A: H_2O/TFA al 0,05 % B: MeOH/TFA al 0,05 %		
	Punto temporal	% de A	% de B
	0	95	5
	5	95	5
	20	10	90
	25	10	90
	25,1	95	5
	30	95	5
Caudal	1 ml/min		
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente		
Detección	UV: λ = 276 nm		
Solución de ensayo	Dilución adecuada en H_2O/CH_3CN 50/50 (v/v)		
Volumen de inyección	5 µL		
Temperatura del inyector	20 ºC		
Tiempo de retención	Base libre ~ 13 min		

Análisis de RMN

Los espectros de ^1H (300 MHz) se registraron en un instrumento Bruker Avance DRX de 300 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm, unidades δ). Las constantes de acoplamiento se expresan en hercios (Hz). Las abreviaturas para las multiplicidades observadas en los espectros de RMN son las siguientes: s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), m (multiplete), a (amplio).

Espectros de DSC. TA Instrument, DSC Q10.

Los espectros de DSC se registraron en un instrumento TA DSC Q10 en un intervalo de temperaturas de -10 ºC a 300 ºC o 400 ºC y con incrementos de 10 ºC.

Microscopia óptica

La observación por microscopía óptica se realizó en un microscopio LEICA DMIRB dotado de una cámara digital y una platina motorizada. Se dispersan unos cuantos granos de polvo en una placa de vidrio con aceite mineral. Se

graban fotografías con una plataforma de análisis de imágenes de Microvision Instruments, tanto bajo luz transmitida como luz polarizada.

Difracción de rayos X de polvo

El análisis de difracción de rayos X de polvo (XRPD) se realiza en un difractómetro AXS D8 Advance de Brüker, usando un anticátodo de cobre, un portamuestras de silicio monocristalino y un detector sensible a la posición. Las condiciones de funcionamiento del instrumento para la adquisición de patrones de rayos X se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de funcionamiento del instrumento para la adquisición del perfil de rayos X

Temperatura		Ambiente
Atmósfera		Ambiente
Generador de rayos X	- tensión (kV)	40
	- intensidad (mA)	40
Fuente de rayos X	- diana	Cu
	- radiación de emisión $K\lambda_1$ (nm)	0,15406
	$K\lambda_2$ (nm)	0,15444
	Proporción de $K\lambda_2/K\lambda_1$	0,5
	- filtro de $K\beta$	Ni
Ranura (nm)	- antidivergencia	0,6
Goniómetro	- sector angular analizado (º para 2θ)	5-70
	- tamaño de paso (º para 2θ)	0,0714
Velocidad de rotación para el portamuestras (rpm)		30
Detección	- abertura angular (θ)	8
	- tiempo de paso para medir la intensidad de difracción (s)	6

Se dispersa la muestra de polvo en el portamuestras de silicio de forma que se evite la orientación preferida (cristales no orientados aleatoriamente) y se garantice la planaridad de la superficie de la muestra.

Sorción dinámica del vapor

Los análisis de sorción dinámica del vapor (DVS) con agua se realizaron en un incubador intrínseco de DVS de SMS Ltd, dotado de un software de control intrínseco de DVS 1.0.

Se sometió una muestra de aproximadamente 5 a 10 mg, dispuesta en un soporte de cubeta de aluminio, a un análisis de ciclo completo (sorción seguida de desorción) en las condiciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones de funcionamiento para el análisis de DVS

Temperatura	25 ºC
Gas portador y velocidad	Aire seco y filtrado a 100 $mL \cdot min^{-1}$
Modo y criterio	$dm/dt \leq 0{,}002\ \% \cdot min^{-1}$
Intervalo de humedad	HR del 0 al 95 %
Paso de HR	5 %
Tiempo de paso mínimo	10 min
Tiempo de paso máximo	360 min

Se secó la muestra previamente bajo una corriente de aire filtrado seco hasta que se obtuvo una masa estable. A continuación, se aumentó la humedad relativa en incrementos del 5 %. En cada paso, se dejó que la muestra aumentara hasta alcanzarse el equilibrio (criterio dm/dt), entonces se aumentó todavía más la humedad relativa. Se

elevó la humedad relativa hasta el 95 %. Tras equilibrar en esta fase, se inicia la desorción de una manera escalonada similar, dejando que se estabilice el peso de la muestra tras cada paso incremental de reducción de la humedad.

Los disolventes y los reactivos se adquirieron y se usaron como se recibieron de los proveedores comerciales a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1: Síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 2,9 eq. de sal de sulfato

Se preparó una solución de ácido sulfúrico diluida en DIPE añadiendo 4 ml (0,0751 mol) de ácido sulfúrico concentrado a 28 ml (0,197 mol) de DIPE.

A una suspensión de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (16,1 g, 0,03756 mol) en DIPE (280 ml), se añadieron gota a gota 32 ml de la solución de ácido sulfúrico diluida anteriormente descrita. Se observó un ligero aumento de la temperatura de aproximadamente 10 ºC. Se agitó la mezcla de reacción a TA y se volvió límpida durante una hora. Se filtró la solución de color blanco resultante y se recuperó. A continuación, se secó el polvo blanco obtenido al vacío a 50 ºC durante 48 horas.

Datos analíticos

HPLC (método A): Tr: 20,24 min.

Análisis elemental:

calculado: % de C = 48,06; % de H = 7,74; % de N = 13,45; % de S = 10,26; % de O = 20,48
experimental: % de C = 41,43; % de H = 6,95; % de N = 11,60; % de S = 12,34; % de O = 26,53.

Ejemplo 2: Síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 1,8 eq. de sal de sulfato

El compuesto del título se preparó de acuerdo con un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.

Datos analíticos

HPLC (método A): Tr: 29,207 min;

RMN (D_2O): δ (ppm): 7,2 (m, 4H, 2C<u>H</u>); 3,7 (b, 8H, 4C<u>H</u>$_2$); 3,4-3,1 (m, 8H, 4CH$_2$); 2,9 (m 4H, 2C<u>H</u>$_2$); 2,3-1,9 (m, 6H, 2C<u>H</u>+2C<u>H</u>$_2$); 0,85 (d, 12H, 4CH$_3$).

Análisis elemental:

calculado: % de C = 48,06; % de H = 7,74; % de N = 13,45; % de S = 10,26; % de O = 20,48
experimental: % de C = 49,55; % de H = 7,89; % de N = 13,87; % de S = 8,95; % de O = 19,29.

Ejemplo 3: Síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 1 eq. de sal de sulfato

Se añadieron 3 ml de etanol a 99,6 mg de la síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, obteniéndose la disolución casi completa mediante el calentamiento a 70 ºC. Se añadió una cantidad equimolar de una solución acuosa 0,5 M de ácido sulfúrico (465 µl) y se observó la disolución completa. Se secó la solución al vacío a 70 ºC, dando un residuo sólido. Se volvió a suspender el sólido en IPA/EtOH a 70 ºC, proporcionando una suspensión de partículas finas. A continuación, se redujo el volumen de disolvente parcialmente al vacío. Se dejó enfriar la suspensión hasta la temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se secó el polvo al vacío durante 2 horas a 70 ºC, produciendo el compuesto del título en un rendimiento del 89 %.

Análisis de HPLC (método B): el porcentaje de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (base libre) en el compuesto del título, determinado mediante estandarización externa, resultó ser del 83,4 %. Este resultado coincidió con el porcentaje teórico calculado: 81,4 %.

Ejemplo 4: Síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 2 eq. de sal de sulfato

Se añadieron 3 ml de etanol a 101,7 mg de síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, obteniéndose la disolución casi completa tras el calentamiento a 70 ºC. Se añadió una

cantidad 2 molar de una solución acuosa 0,5 M de ácido sulfúrico (950 µl) y se observó la disolución completa. Se secó la solución al vacío a 70 ºC, dando una película translúcida en la que se fue produciendo progresivamente la cristalización de la sal esperada. Se volvió a suspender el sólido en 3 ml de metanol, dando una suspensión clara, que se agitó a 60 ºC durante 15 minutos. Se añadieron 10 ml de IPA para finalizar la cristalización de la sal, y se agitó la suspensión resultante a 80 ºC durante 30 minutos. Entonces, se dejó enfriar la suspensión hasta la temperatura ambiente y se almacenó durante la noche a una temperatura inferior a la temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante del matraz y se secó el polvo al vacío durante 2,5 horas a 70 ºC, proporcionando el compuesto del título con un rendimiento del 71 %.

Análisis HPLC (método B): el porcentaje de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (base libre) en el compuesto del título, determinado mediante estandarización externa, resultó ser del 65,8 %. Este resultado coincidió con el porcentaje teórico calculado: 68,6 %.

No se observó inestabilidad a largo plazo debida a la oxidación, en particular, a la oxidación en el anillo de piperazina, con las sales de sulfato en estado sólido.

Ejemplo 5: Análisis fisicoquímico de diferentes sales

Las sales de clorhidrato, bromhidrato, acetato, tartrato, fumarato, malato, oxalato y sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina se prepararon de acuerdo con procedimientos similares a los descritos en los ejemplos anteriores o métodos de formación de sales convencionales bien conocidos en la técnica. Los resultados de estas formaciones de sales se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de la formación de sales

Sal	Eq. de ácido añadidos	Forma física
Base libre	0	*Polvo amorfo*
Cloruro	4	Precipitación de un sólido muy higroscópico[1]
Bromuro	1,1	No se formó ningún sólido
Acetato	1	No se formó sólido, residuo oleoso
Acetato	2	No se formó sólido, residuo oleoso
Fumarato	1	No cristalina[2]
Tartrato[3]	1	No cristalina[2]
Malato	1	Polvo
Oxalato	2	Goma
Oxalato	3	Goma
Oxalato	4	Polvo cristalino
Sulfato	1	Polvo cristalino (sólido incoloro)
Sulfato	2	Polvo cristalino (sólido incoloro)

[1]Se dejó reposar una muestra pesada de sal de cloruro abierta al aire. Dicha muestra ganó peso rápidamente y, finalmente, se volvió delicuescente en unos cuantos segundos o minutos, dependiendo de la HR ambiente.
[2]El espectro de DSC no reveló ninguna endotermia, siendo, por tanto, característico de los sólidos que carecen de una fase cristalina.
[3]Sal formada en EtOH/agua.

La sal de cloruro se encontró abiertamente muy higroscópica, mientras que las sales de acetato no se obtuvieron en forma sólida. Aunque las sales de tartrato y de fumarato se obtuvieron en forma de sólidos, el análisis de DSC mostró que no son cristalinas (véanse las Figuras 1 y 2). Dicha deficiencia puede resultar en las variaciones entre los lotes con respecto a las formas sólidas. La reproducibilidad de lote a lote es un criterio esencial en la síntesis de compuestos farmacológicos, especialmente cuando diferentes formas sólidas pueden tener diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Por lo tanto, las sales de tartrato y de fumarato no son satisfactorias.

La sal de malato se obtuvo en forma de un polvo; sin embargo, porta un átomo de carbono asimétrico. Los centros quirales complican considerablemente el desarrollo clínico, ya que cada estereoisómero debe caracterizarse igualmente como el estereoisómero activo.

Con respecto a las sales de oxalato, se requieren 4 eq. de contraiones de oxalato para obtenerse polvos cristalinos adecuados. Las gráficas de DSC de las sales de oxalato (2 eq., 3 eq. y 4 eq.) se muestran respectivamente en las Figuras 3, 4 y 5. Como los espectros de DSC muestran, la sal de tetraoxalato porta la endotermia mejor formada y definida. El requisito de tener 4 equivalentes de sal de oxalato es una salvedad, ya que el porcentaje en peso de molécula activa se reduce hasta tanto como el 54 %. La cantidad de fármaco que se va a administrar para una dosis dada de PAM aumenta, por lo tanto, significativamente, así como el riesgo de nefrotoxicidad asociada a los oxalatos.

Ambas sales de sulfato precipitaron en forma de sólidos. Resultaron ser estables al dejarlas expuestas al aire. En contraste con la sal de cloruro, no se observó ningún problema de higroscopicidad. El análisis de DSC (véanse las Figuras 6 y 7) reveló endotermias bien definidas, que coinciden con los sólidos que comprenden una fase cristalina.

Ejemplo 6: Análisis de XRPD de las sales de oxalato y de sulfato

En la Figura 8, se muestra el difractograma de XRPD de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 4 eq., sal de oxalato. En la franja angular analizada, se detectaron unos cuantos grandes rayos de difracción de baja intensidad. El perfil de XPRD revela la presencia de un alto fondo de difusión. Dicho perfil de XPRD es característico de un polvo que tiene una fase cristalina con poca o baja cristalinidad (rayos de gran tamaño) con la presencia de una fase amorfa (alto fondo de difusión).

El perfil de difracción de rayos X de la sal de sulfato del Ejemplo 1 (véase la Figura 9) muestra varios picos de difracción bien definidos y agudos entre 5 y 25 º en la escala 2-theta, lo que indica que la forma sólida de dicha sal de sulfato comprende una muy buena fase cristalina. El difractograma también presenta un halo de fondo (entre 10 y 30 º), que se interpreta como procedente de una fracción amorfa presente en el sólido. La comparación de los perfiles con la sal de sulfato del Ejemplo 2 revelan un gran solapamiento entre los diversos picos de difracción detectados (véase la Figura 10).

El difractograma de XPRD de la sal de sulfato del Ejemplo 3 (véase la Figura 11) confirmó la buena cristalinidad de esta sal con numerosos picos de difracción excelentes y bien definidos entre 4 y 30 º 2θ, y presentó un perfil de difracción diferente de la síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (base libre). El perfil de XPRD de esta sal se ha comparado con el de la base libre, y los dos perfiles superpuestos en un mismo cromatógrafo (Figura 12) coinciden con diferentes formas cristalinas entre la sal de sulfato y la base libre. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas mediante el microscopio óptico. De hecho, la alta birrefringencia y la morfología de varilla bien definida de las partículas al observarse con luz transmitida (Figura 13a) y luz polarizada cruzada (Figura 13b) indicaron una sal de sulfato de buena cristalinidad.

El difractograma de XPRD de la sal de sulfato del Ejemplo 4 (véase la Figura 14) confirmó la buena cristalinidad de esta sal con numerosos picos de difracción entre 4 y 30 º 2θ, y presentó un perfil de difracción diferente de la síntesis de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (base libre). El perfil de XPRD de esta sal se ha comparado con el de la base libre, estando ambos perfiles superpuestos en un mismo cromatógrafo (Figura 15) coincidiendo con diferentes formas cristalinas entre la sal de sulfato y la base libre.

Como resultado de ello, los Ejemplos 5 y 6 muestran claramente que las sales de sulfato son superiores a cualquier otra sal de ácido y sales de oxalato en particular. Las sales de sulfato no portan una grave higroscopicidad como las sales de cloruro. A diferencia de las sales de bromuro, se cristalizan para proporcionar materiales en polvo. De hecho, su cristalinidad es muy superior a la de las sales de tartrato y de fumarato. Como sales de sulfato, la sal de oxalato con una estequiometría específica de 4 eq. proporciona sólidos que comprenden una fase cristalina y una fase amorfa. Sin embargo, los perfiles de XRPD y de microscopía óptica bajo luces de transmisión y polarizadas revelaron que la fase cristalina de las sales de sulfato está mejor definida en términos de morfología y cristalinidad que la de la sal de oxalato. Por otra parte, las sales de sulfato resuelven las deficiencias de la *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina (base libre), es decir, pueden aislarse en una forma sólida que tenga una fase cristalizada con una buena cristalinidad y que no tenga problemas de estabilidad evidentes. Por otra parte, amplían las posibilidades de formulación de este PAM debido a su muy alta hidrosolubilidad. La sal de oxalato (4 eq.) no subsanó totalmente las deficiencias de la base libre en términos de cristalinidad ni de morfología, siendo, de todos modos, inferior a las sales de sulfato en estos aspectos. El experto en la materia podría incluso considerar una sal de oxalato (4 eq.) como el empeoramiento de las propiedades globales de la base libre de PAM, ya que contiene altas cantidades de contraiones de oxalato que pueden inducir una grave nefrotoxicidad.

Ejemplo 7: Perfil de DVS de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 1 eq., sal de sulfato

Los análisis de DVS se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en las Figuras 16 y 17, que muestran la curva de secado de DVS, así como las gráficas de isotermas de DVS (trazas de sorción/desorción de vapor de agua) tras el secado preliminar de la sal de sulfato del Ejemplo 3. En la Figura 17, la curva superior corresponde a la fase de desorción, y la curva inferior a la fase de

sorción.

Tras el secado a 25 ºC/HR del 0 %, la muestra perdió el 0,18 % de su masa.

Tras la sorción, se observaron tres intervalos de humedad relativa correspondientes a diferentes tasas y comportamientos de sorción de agua a partir de la variación de masa de la muestra:

- HR del 0 al 80 %: tasa de sorción de agua continua y lenta; la absorción de agua a 25 ºC/HR del 60 % y 25 ºC/HR del 80 %, respectivamente, fueron del 0,7 % y 1,5 % en comparación con la masa de la muestra obtenida tras el secado inicial a una HR del 0 %;
- HR del 80 al 90 %: tasa de sorción de agua rápida y casi constante; la absorción de agua a 25ºC/HR del 90 % fue del 9,7 % en comparación con la masa de la muestra obtenida tras el secado inicial a la HR del 0 %;
- entonces, aumentó la sorción de agua aún más, y la absorción de vapor de agua a 25 ºC/HR del 95 % fue del 19,4 % en comparación con la masa de la muestra obtenida tras el secado inicial a una HR del 0 %.

Tras la desorción, se observaron tres intervalos de humedad relativa correspondientes a diferentes tasas y comportamientos de sorción de agua:

- HR del 95 al 90 %: reducción rápida de la tasa de agua residual, quedando un 10 % a 25 ºC/HR del 75 % en comparación con la masa de la muestra obtenida tras el secado inicial al 0 % de HR;
- HR del 75 al 10 %: la muestra retuvo el agua "adsorbida" con una potente histéresis y casi constante (hasta del 6,7 % a 25 ºC/HR del 75 %);
- HR del 10 al 0 %: la muestra perdió parte de su agua; la cantidad restante de agua fue del 4,6 % a 25 ºC/HR del 0 %, en comparación con la masa de la muestra obtenida tras el secado inicial a una HR del 0 %; en esta etapa se estabilizó la masa de la muestra y, por lo tanto, en equilibrio con el ambiente circundante.

Basándose en los criterios usados comúnmente (es decir, se dice que un compuesto es higroscópico si presenta más del 2 % en peso de absorción de agua a 25 ºC/HR del 60 %), la sal de sulfato del Ejemplo 3 no resultó ser higroscópica a 25 ºC/HR del 60 %, con solo una absorción de masa global en esta etapa.

Dada la rápida absorción del agua a la HR del 80 %, así como la potente histéresis (del 6 al 6,7 % del agua restante de la HR del 80 al 10 % tras la desorción), la sal de sulfato del Ejemplo 3, obtenida originalmente en su forma no solvatada, se convirtió en una forma dihidratada a alta humedad relativa. La absorción de agua teórica para la forma dihidratada de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 1 eq., sal de sulfato del Ejemplo 3 es del 6,8 %, y está en línea con la del 6,7 % determinada experimentalmente.

Al final del primer ciclo de DVS descrito anteriormente, se sometió la misma muestra a un segundo ciclo de DVS con una segunda fase de sorción y una segunda fase de desorción. Los resultados se muestran en la Figura 18. Tanto la segunda fase de sorción y como la segunda fase de desorción fueron idénticas a la curva de la primera fase de desorción obtenida durante el primer ciclo de DVS. De hecho, como puede verse en la Figura 18, la fase de desorción y la fase de sorción se solapan entre sí. La forma dihidratada de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina, 1 eq., sal de sulfato del Ejemplo 3, que se obtuvo a una HR de más del 80 % a 25 ºC durante el primer ciclo, fue, por lo tanto, estable y no higroscópica.

EJEMPLOS DE BIOLOGÍA

Ensayo del metabolismo de APP *in vitro*

El presente ensayo se realizó usando células SH-5Y5Y (línea celular de neuroblastoma humano que sobreexpresa el APP humano de tipo silvestre), que se trataron durante 24 h con la sal de sulfato del Ejemplo 2. Dicho ensayo se llevó a cabo a cuatro concentraciones diferentes de compuesto de 0,3, 1, 3 y 10 µM. La cuantificación de los diferentes metabolitos se obtuvo mediante análisis de transferencia Western. Se analizaron CTFα, CTFβ y AICD usando anti-actina ((1-19) (SC-1616 Santa Cruz Biotechnology; 1:1000 a partir de solución madre a 200 µg/ml) como un control interno y anticuerpo anti-APP de extremo C (1:250.000 en tampón de lavado). Las concentraciones de proteína se determinaron con el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific). Se separaron las muestras (20 µg de proteína total) mediante SDS-PAGE al 16 % de acuerdo con el peso molecular de cada proteína, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Los resultados se muestran en las Figuras 19-a, 19-b, 19-c y 19-d. Muestran niveles aumentados dependientes de la dosis de AICD, CTFα y sAPPα, y niveles reducidos de $A\beta_{1-42}$.

Por lo tanto, la sal de sulfato del Ejemplo 2 induce un aumento significativo del metabolismo del APP a través de la vía no amiloidogénica concomitante con una reducción de la formación de metabolitos nocivos implicados en la formación de las placas amiloides. Estos resultados resultan todavía más extraordinarios si se tiene en cuenta que $A\beta_{1-42}$ es uno de los subproductos más perjudiciales del metabolismo del APP con respecto a la formación de las placas amiloides. Por otra parte, el péptido sAPPα no induce la formación de placas amiloides y, en cambio, se

reconoce por tener efectos neuroprotectores beneficiosos.

Además, se observó que no se encontró citotoxicidad para esta sal de sulfato, su CC_{50} en la línea celular SH-5Y5Y resultó ser superior a 30 μM. La CC_{50} se define, en el presente documento, como la concentración a la que el 50 % de células sembradas en placas permanece vivo.

Ensayo del metabolismo de APP *in vivo*

Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo en ratones hembra C57B16 de 4 meses de edad o en ratas Sprague Dawley de 2 meses de edad

Tratamiento agudo: 24 h por vía oral

Se trataron ratones hembra C57B16 por vía oral (sonda gástrica) con vehículo o compuesto (Ejemplo 2) en 0,25, 0,5, 1, 3 y 6 mg/kg (n = 6 por grupo) durante 24 h. El producto se administró con un tubo desechable de alimentación de roedores ECIMED n.º de Ref V0104030 (4 mm x 30 mm). Se sacrificaron los animales tras 24 horas, se extirpó el cerebro inmediatamente para la disección. Se midieron los niveles de CTFα de la corteza frontal (CF) y/o del hipocampo (HIP) mediante análisis de transferencia Western como se ha descrito anteriormente. En resumen, se homogenizaron los tejidos con 200 μl de tampón de lisis (10 ml de tampón de prelisis Laemmli y 1 comprimido de cóctel de inhibidor de proteasa Complete Mini (Roche)) en un homogenizador Potter. Tras el tratamiento con ultrasonidos (5 min), se centrifugaron los homogenizados a 1.600 rpm durante 5 min a 4 ºC. Se dividieron los sobrenadantes en partes alícuotas y se almacenaron a -80 ºC antes de la transferencia Western.

En la Figura 20, se muestran los resultados dependientes de la dosis. El compuesto del Ejemplo 2 potencia el metabolismo del APP a través de la vía no amiloidogénica en la corteza frontal, como se muestra mediante concentraciones crecientes de CTFα. En general, la corteza frontal es la primera región del cerebro que se ve afectada por la formación de placas amiloides en las enfermedades relacionadas con el metabolismo anómalo del APP.

También se comparó el compuesto del Ejemplo 2 con la sal de oxalato del documento WO2006/051489 en el mismo ensayo (dosis de 6 mg/kg). Los resultados mostrados en la Figura 21 indican la eficacia superior de la sal de sulfato en comparación con la sal de oxalato.

Tratamiento crónico: 1 mes

Se proporcionaron a ratas durante un mes 1 o 10 mg/kg/día del compuesto del Ejemplo 2 disuelto en su agua potable. La notable alta solubilidad de esta sal de sulfato permitió la fácil formulación y administración de la misma a los animales. Se sacrificaron los animales después de un mes y se midieron los niveles de CTFα y de CTFβ de la corteza frontal (CF) y/o del hipocampo (HIP) mediante análisis de transferencia Western como se ha descrito anteriormente. En las Figuras 22-a y 22-b, se muestran los resultados dependientes de la dosis. La sal de sulfato del Ejemplo 2 potencia el metabolismo del APP a través de la vía no amiloidogénica en la corteza frontal, como se muestra mediante el aumento de las concentraciones de CTFα (Figura 22-a). La sal de sulfato del Ejemplo 2 atenúa el metabolismo del APP a través de la vía amiloidogénica en el hipocampo, como se muestra por la disminución de las concentraciones de CTFβ (Figura 22-b). En general, la corteza frontal es la primera región del cerebro que se ve afectada por la formación de placas amiloides en las enfermedades relacionadas con el metabolismo anómalo del APP, mientras que el hipocampo, que participa en gran medida en los procesos de memoria y recuerdo, se ve afectado más tarde, aunque de forma más grave. Por lo tanto, la sal de sulfato del Ejemplo 2 tiene un efecto muy positivo sobre el metabolismo del APP tanto en la corteza frontal como en el hipocampo, y podría ser, por tanto, de interés en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, en particular, para las etapas tanto tempranas como avanzadas de las enfermedades relacionadas con el metabolismo anómalo del APP.

Tratamiento crónico: 3 meses

Los trastornos neuropatológicos también se caracterizan por la fosforilación anómala de la proteína Tau (AT100). La hiperfosforilación de la proteína Tau (en sitios específicos) puede generar la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares (NFT), que participan en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y en otras tauopatías. Uno de los ejes del estudio fue, por tanto, estudiar el efecto de la sal de sulfato del Ejemplo 2 en esta fosforilación anómala. En paralelo, también se controló dicho efecto con respecto a la fosforilación no patológica de la proteína Tau (AT8), que debe permanecer invariable. Otro de los ejes de este estudio fue, por tanto, el impacto de la sal de sulfato del Ejemplo 2 sobre el estrés oxidativo (EO). Por lo tanto, se determinaron los niveles de peroxidación lipídica, un marcador conocido para la evaluación del estrés oxidativo. De hecho, se cree que el estrés oxidativo (EO) producido por la generación de especies tóxicas de oxígeno reactivo (ROS) y de daño oxidativo (oxidación de componentes celulares vitales como lípidos, proteínas y ADN) participa en la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos. La respuesta de EO de las células neuronales se estudia, en particular, por su contribución a los procesos de neurodegeneración. El EO produce un desequilibrio entre la generación de ROS y las defensas antioxidantes, lo que lleva a una acumulación de daños oxidativos y, finalmente, a la muerte celular. El daño oxidativo también se ha

asociado con la pérdida neuronal patológica en la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Huntington (EH).

Se suministraron a ratones hembra C57B16 de 4 meses de vida 0,5, 1 o 3 mg/kg del compuesto del Ejemplo 2 disuelto en su agua potable. En primer lugar, se pesaron todos los ratones y se distribuyeron en cada jaula con el fin de tener aproximadamente el mismo peso medio + DT por jaula. Cada concentración de producto se preparó en frascos estériles, que se mantuvieron a temperatura ambiente protegidos de la luz. Los frascos de bebida se llenaron cada semana y se pesaron. Se calculó el volumen consumido pesando cada frasco después de cada semana y desechando el volumen restante.

Se realizaron las mediciones de los niveles de fosforilación de AT100 en los tejidos cerebrales mediante análisis de transferencia Western (descrito anteriormente) usando anticuerpo anti-AT100 específico (anticuerpo monoclonal anti-PHF-Tau humano, MN1020, ThermoScientific/Pierce).

Se realizaron las mediciones de los niveles de fosforilación de AT8 en los tejidos cerebrales mediante análisis de transferencia Western (descrito anteriormente) usando anticuerpo anti-AT8 específico (anticuerpo monoclonal anti-PHF-Tau humano, MN1060, ThermoScientific/Pierce).

Mediciones de los niveles de LPO: el nivel de peroxidación lipídica en el hipocampo se determina como equivalentes de hidroperóxido de cumeno (CHP) y se expresa como equivalentes de CHP por peso en húmedo de tejido y como el porcentaje de datos del grupo de control tras el *ensayo FOX* modificado.

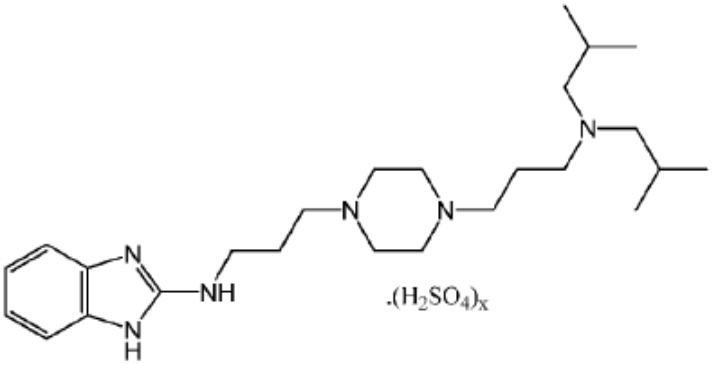
Los resultados se muestran en las Figuras 23-a, 23-b y 23-c. La sal de sulfato de la invención disminuye la fosforilación patológica de la proteína Tau (Figura 23-a) mientras que no afecta a la fosforilación normal de la proteína Tau (Figura 23-b). Además, esta sal de sulfato induce una disminución significativa de los niveles de LPO y, por tanto, es capaz de paliar, en parte, los procesos de estrés oxidativo (Figura 23-c).

En vista de los resultados experimentales anteriores, las sales de sulfato de la invención son útiles en la orientación del metabolismo del APP hacia las vías no amiloidogénicas en la corteza frontal y en el hipocampo. Alteran aún más la fosforilación patológica de la proteína Tau, paliando los procesos de estrés oxidativo

REIVINDICACIONES

1. Una sal de sulfato de *N*-(3-(4-(3-(diisobutilamino)propil)piperazin-1-il)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-amina y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma.

2. La sal de sulfato de la reivindicación 1, que tiene la fórmula II



Fórmula II

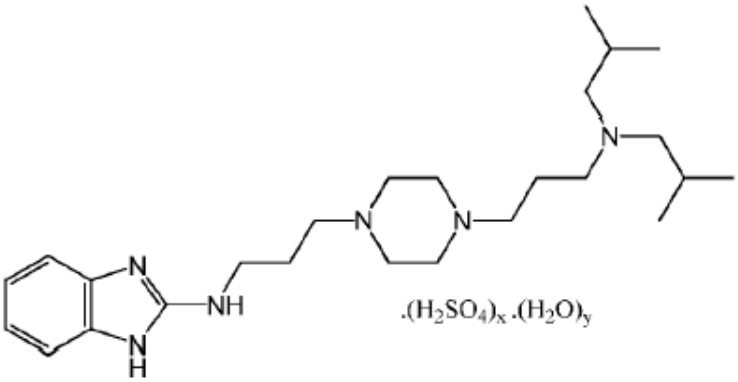
en la que x es de 0,5 a 4, y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma.

3. La sal de sulfato de la reivindicación 2 y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma, **caracterizada por que** x es de 1,5 a 2,5.

4. La sal de sulfato de la reivindicación 2 y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma, **caracterizada por que** x es de 0,5 a 1,5.

5. La sal de sulfato de la reivindicación 2 y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma, **caracterizada por que** x es de 2,5 a 3,5.

6. La sal de sulfato de la reivindicación 2, que tiene la fórmula III



Fórmula III

en la que

x es como se ha definido en la reivindicación 2 e
y es de 0,5 a 5.

7. Una composición farmacéutica que comprende una sal de sulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y al menos un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

8. La sal de sulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso como un medicamento

9. La sal de sulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de una enfermedad seleccionada entre enfermedades neurodegenerativas, amiloidopatías, tauopatías y enfermedades del desarrollo.

10. La sal de sulfato para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la enfermedad se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy (DLB), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) con demencia frontotemporal, miopatía de cuerpos de inclusión con enfermedad ósea de Paget y/o demencia frontotemporal (IBMPFD), degeneración del lóbulo frontotemporal, sinucleopatías, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, angiopatías amiloides, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17 y síndrome de Down.

11. La sal de sulfato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el retraso, en un paciente, del inicio de una enfermedad seleccionada entre enfermedades neurodegenerativas, amiloidopatías, tauopatías y enfermedades del desarrollo.

12. La sal de sulfato para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la enfermedad se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy (DLB), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) con demencia frontotemporal, miopatía de cuerpos de inclusión con enfermedad ósea de Paget y/o demencia frontotemporal (IBMPFD), degeneración del lóbulo frontotemporal, sinucleopatías, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, angiopatías amiloides, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculada al cromosoma 17 y síndrome de Down.

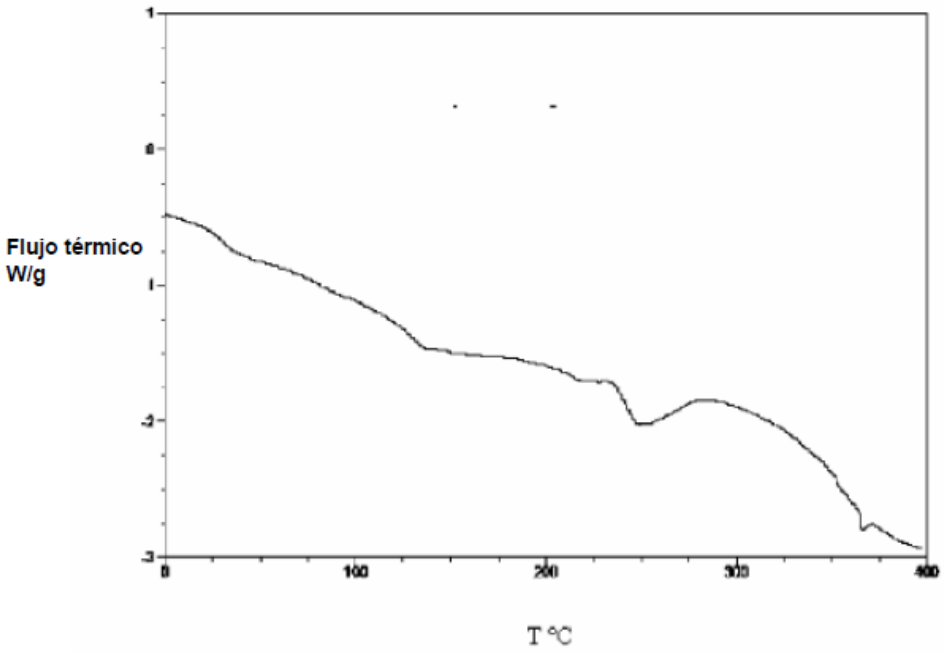


Figura 1

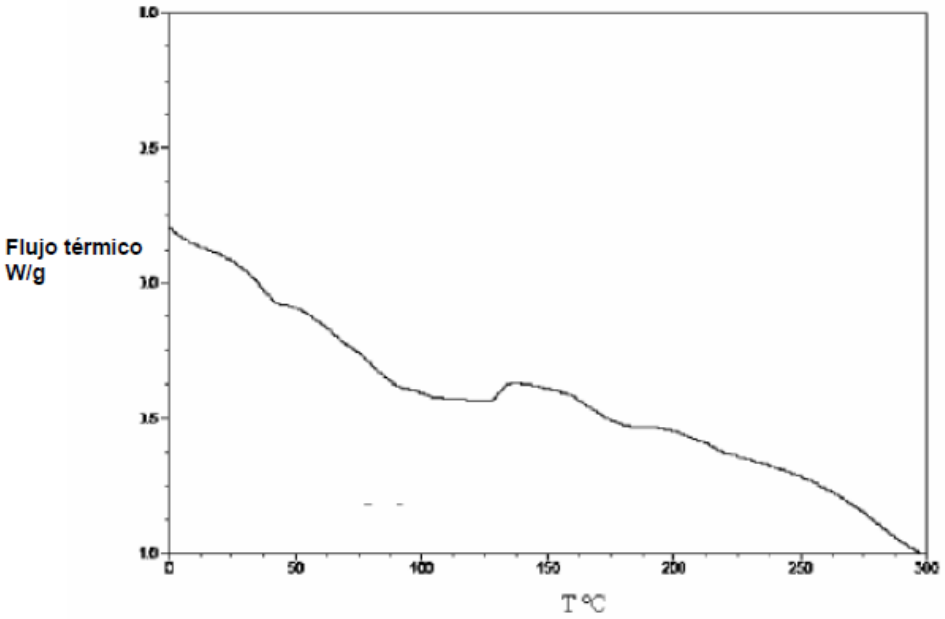


Figura 2

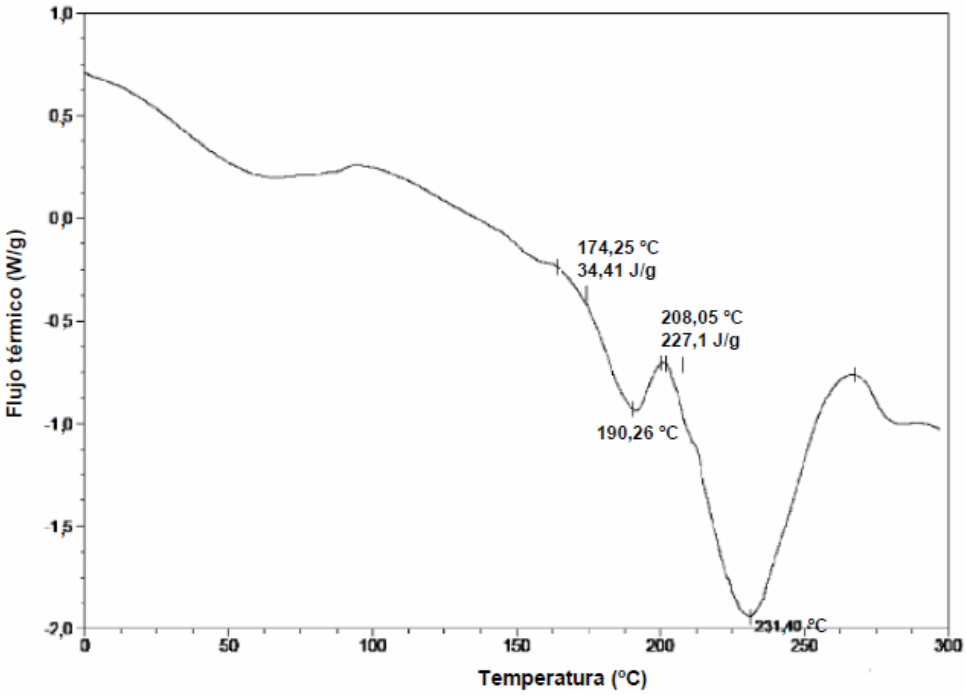


Figura 3

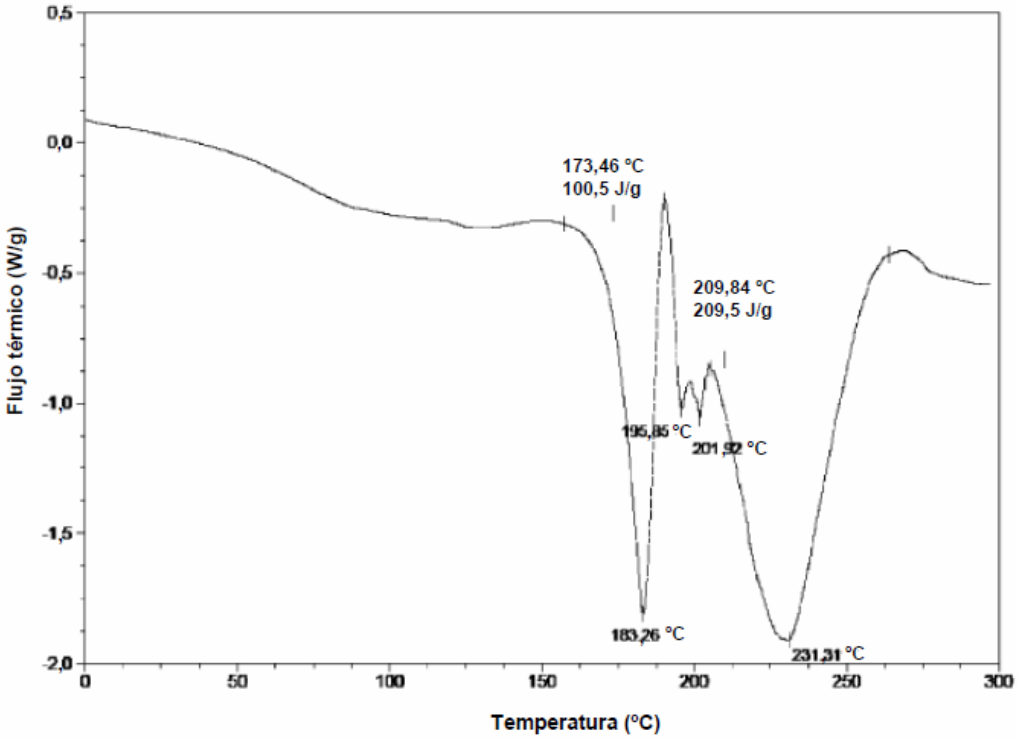


Figura 4

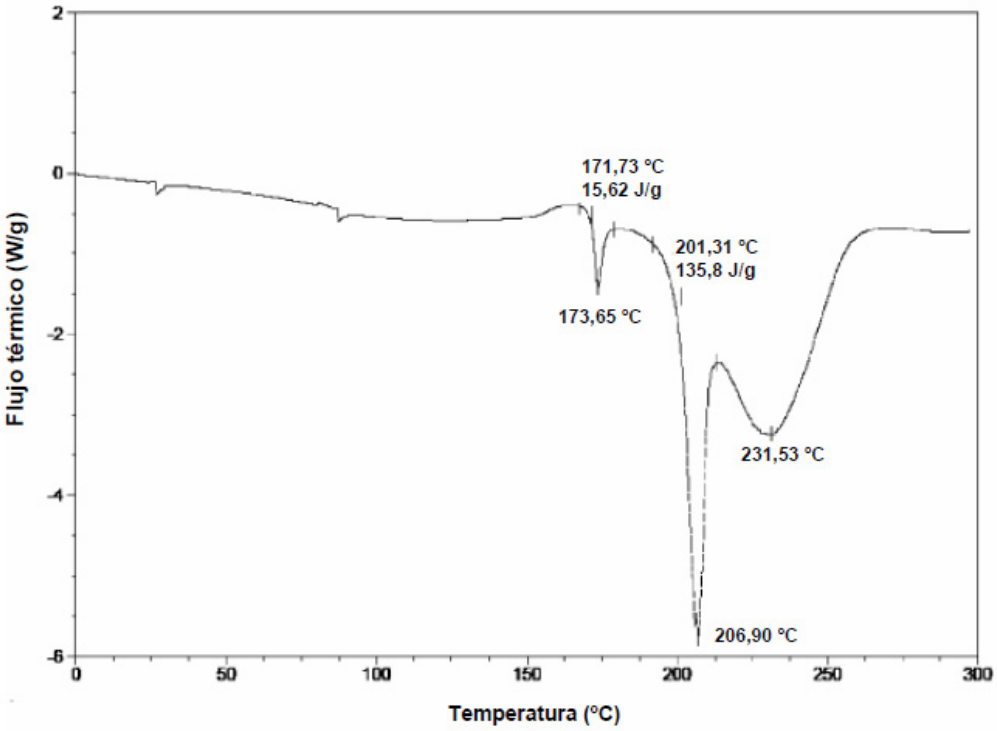


Figura 5

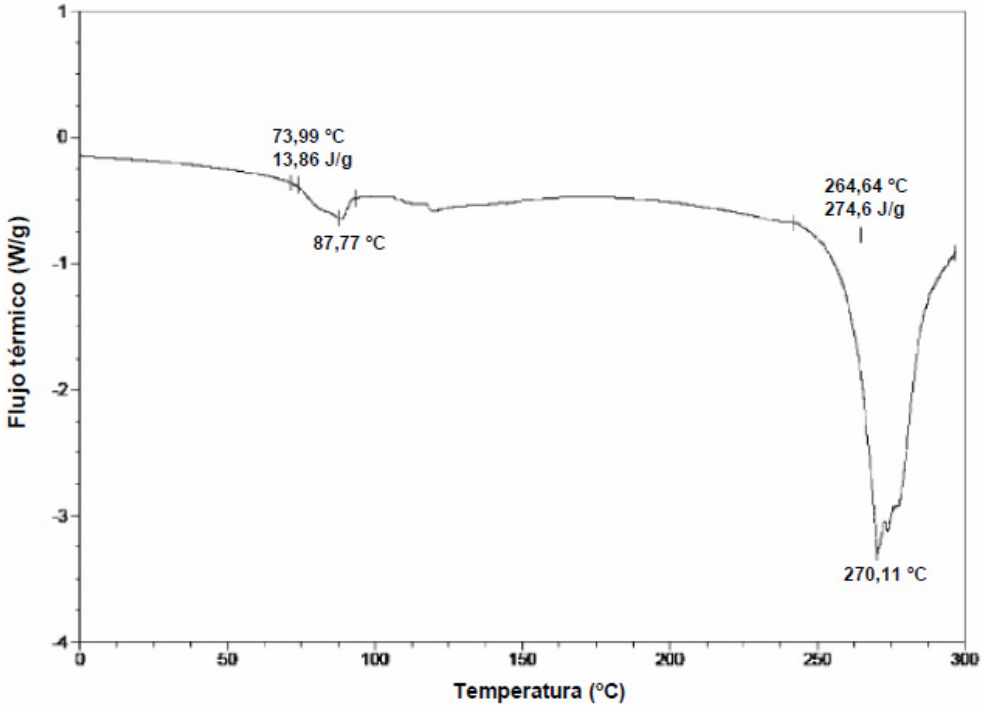


Figura 6

Figura 7

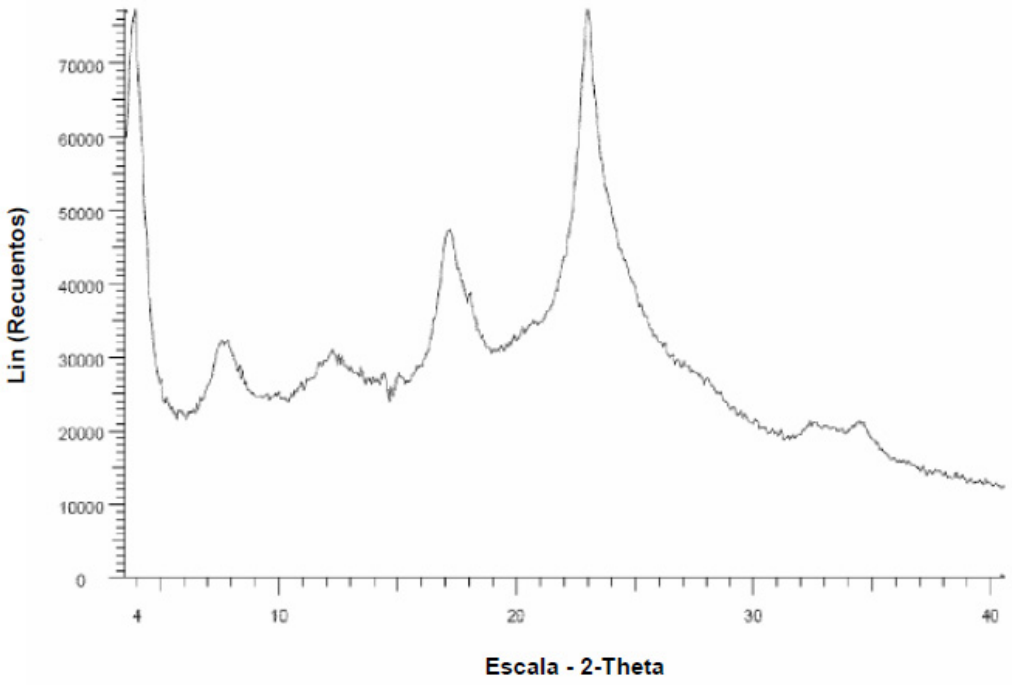


Figura 8

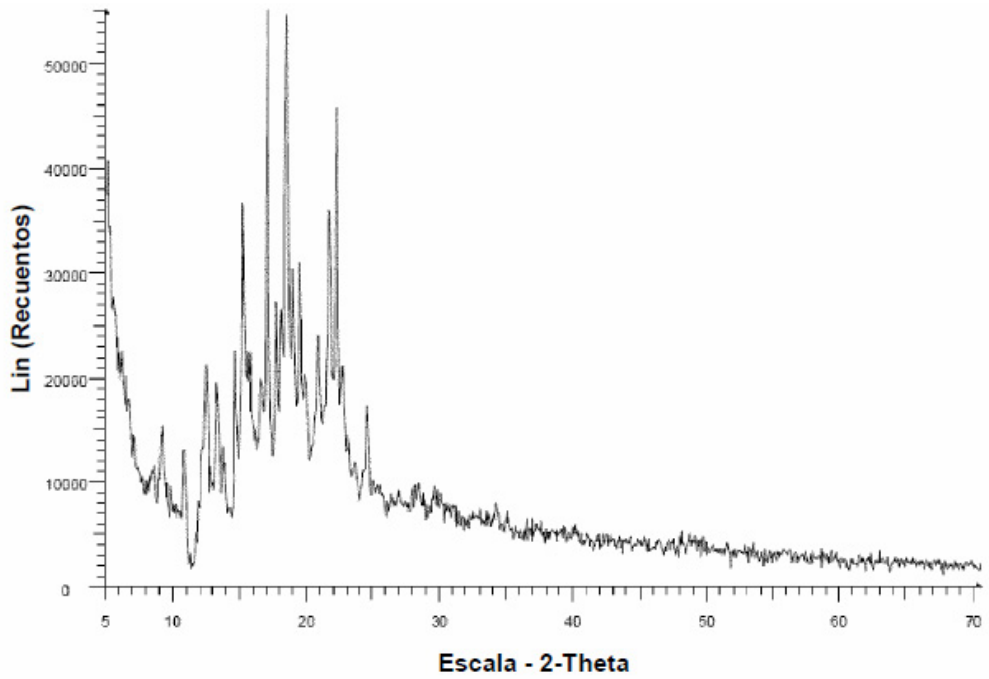


Figura 9

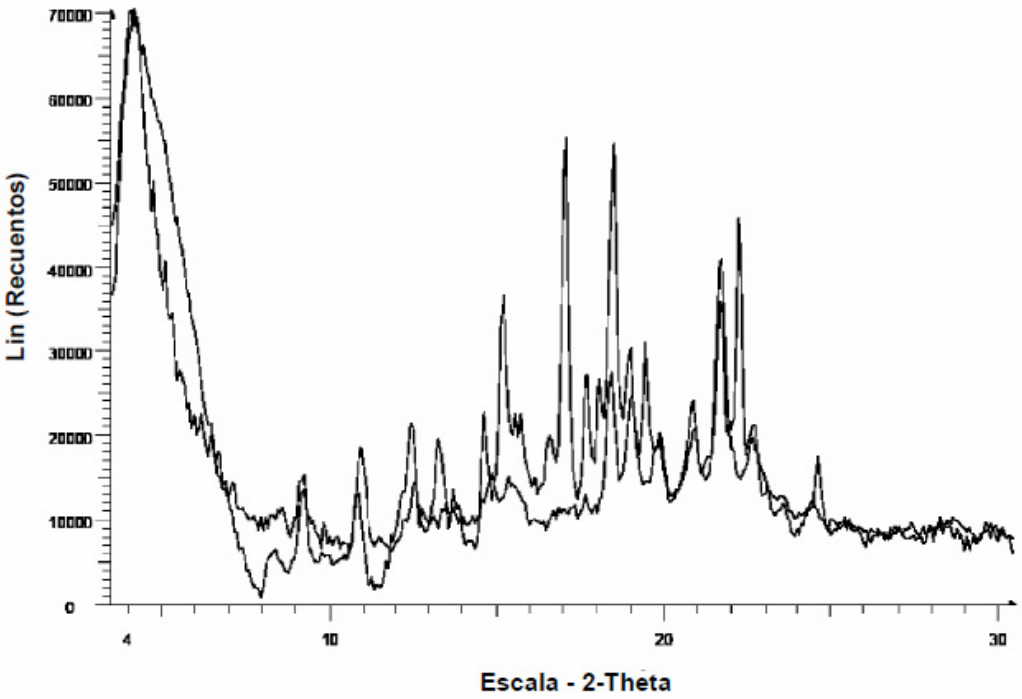


Figura 10

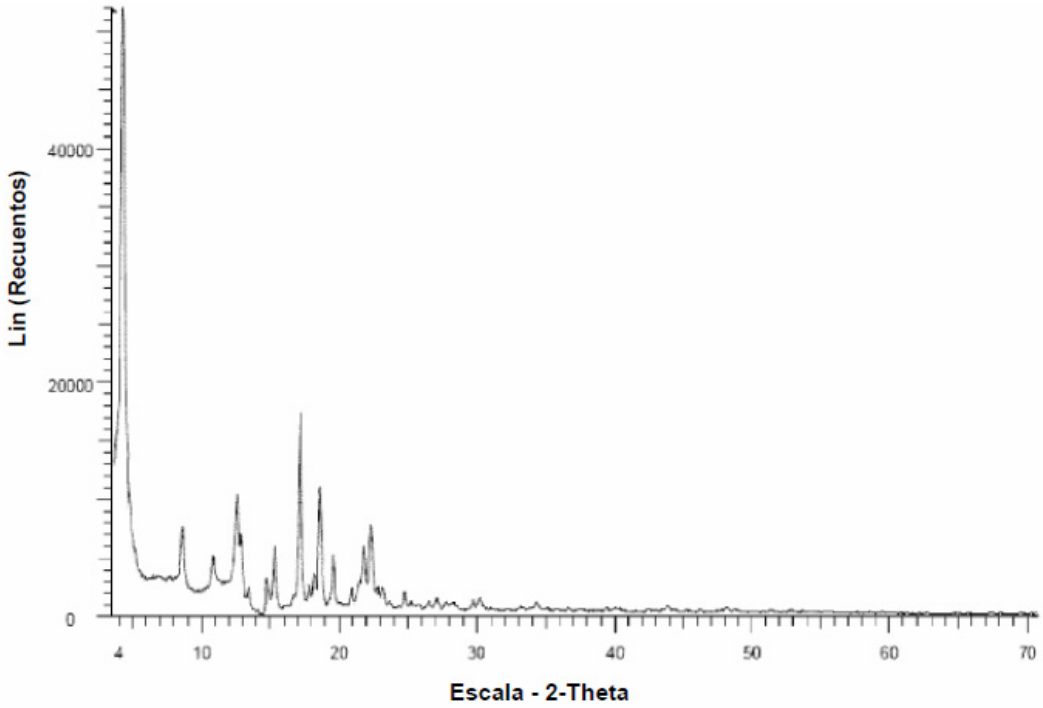


Figura 11

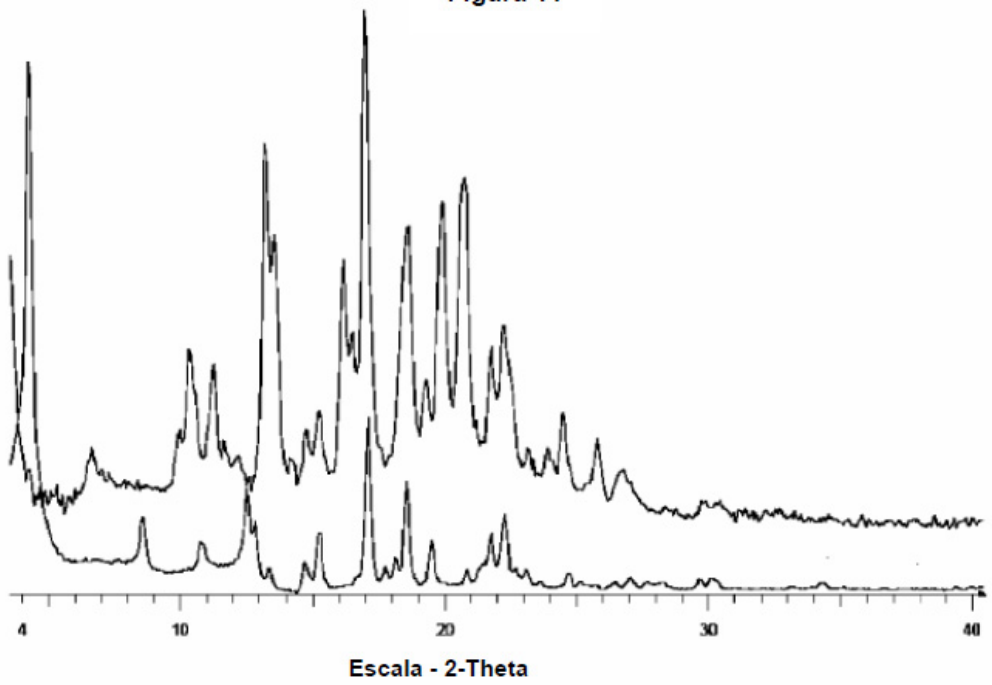


Figura 12

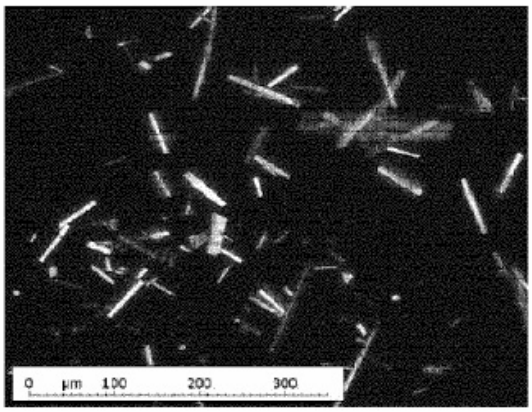


Figura 13-a

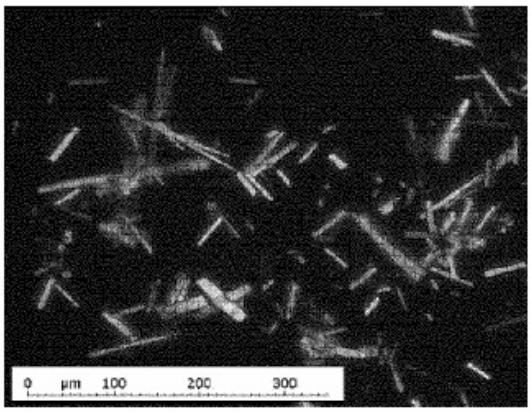


Figura 13-b

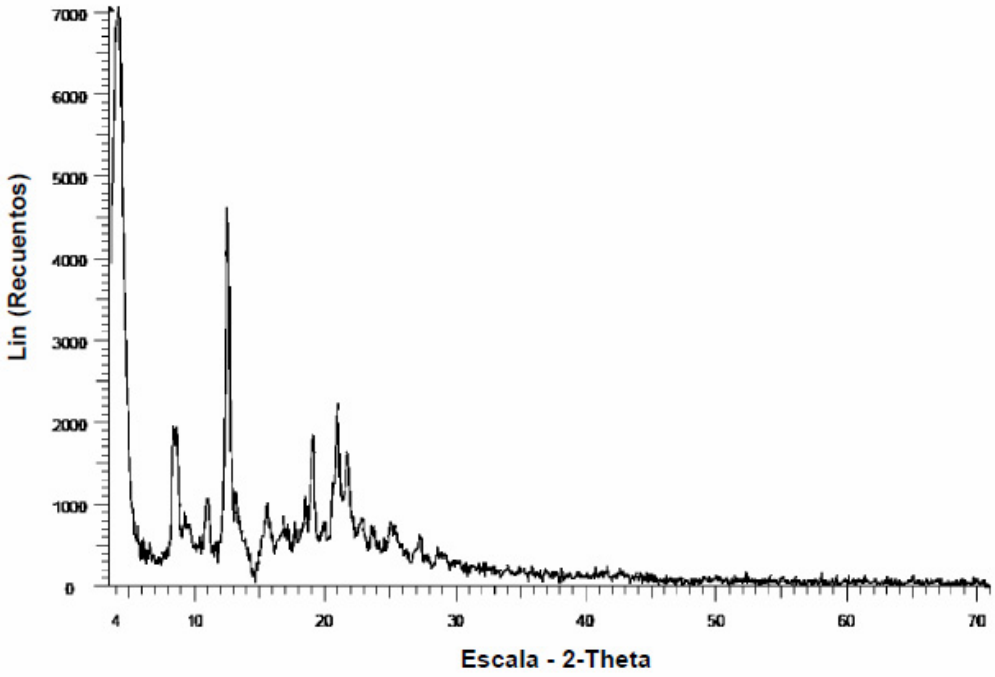


Figura 14

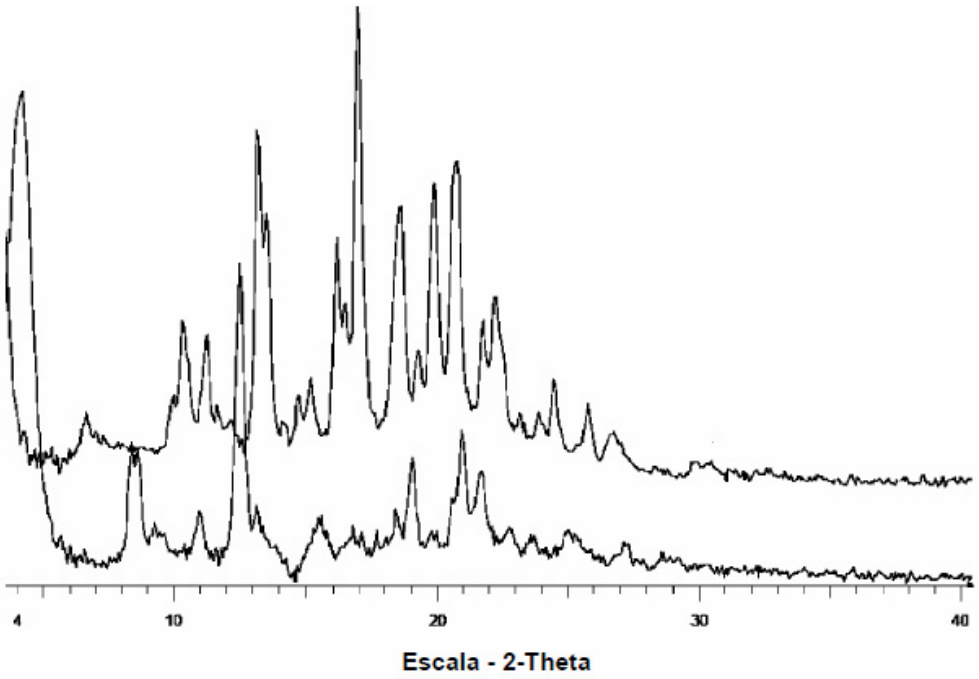


Figura 15

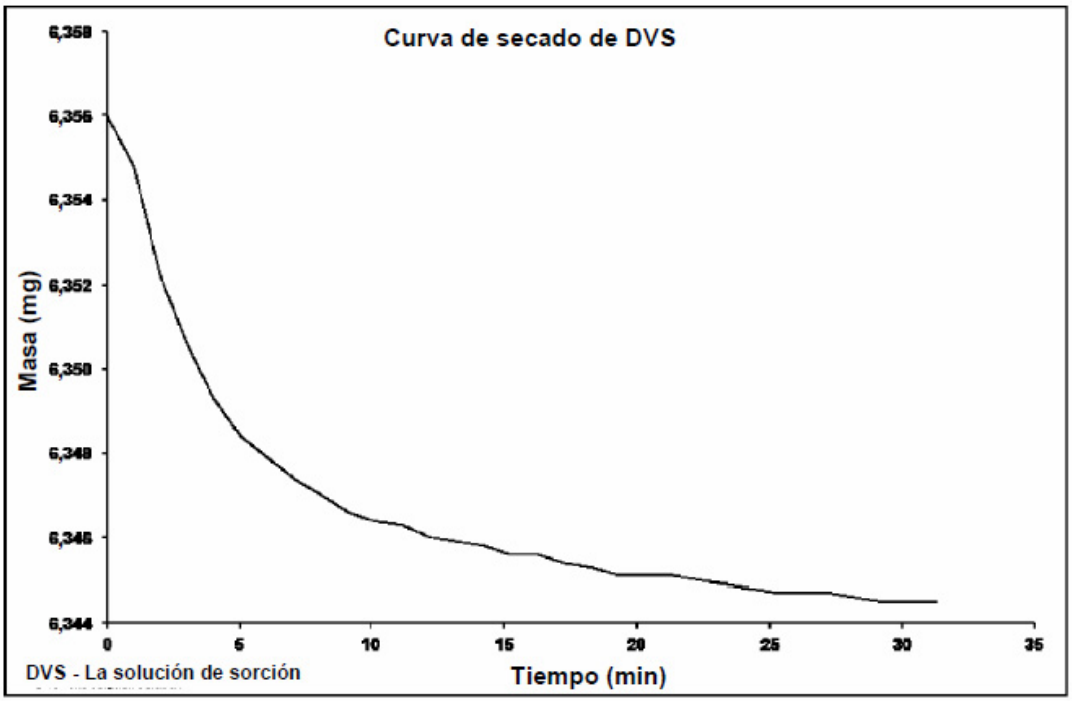


Figura 16

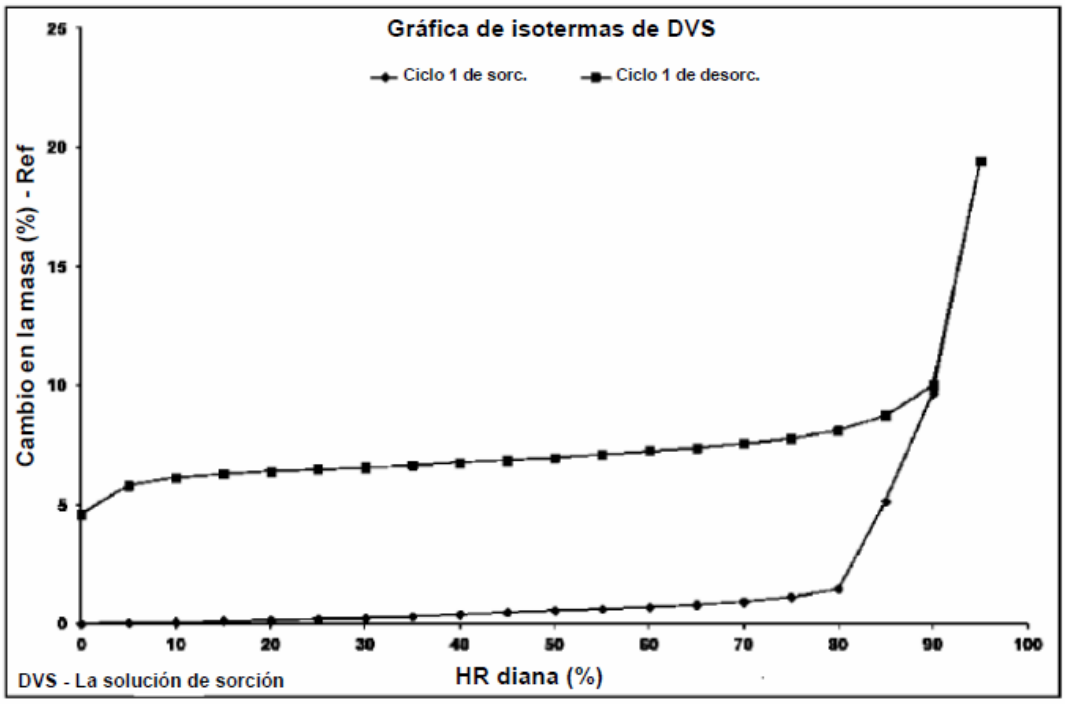


Figura 17

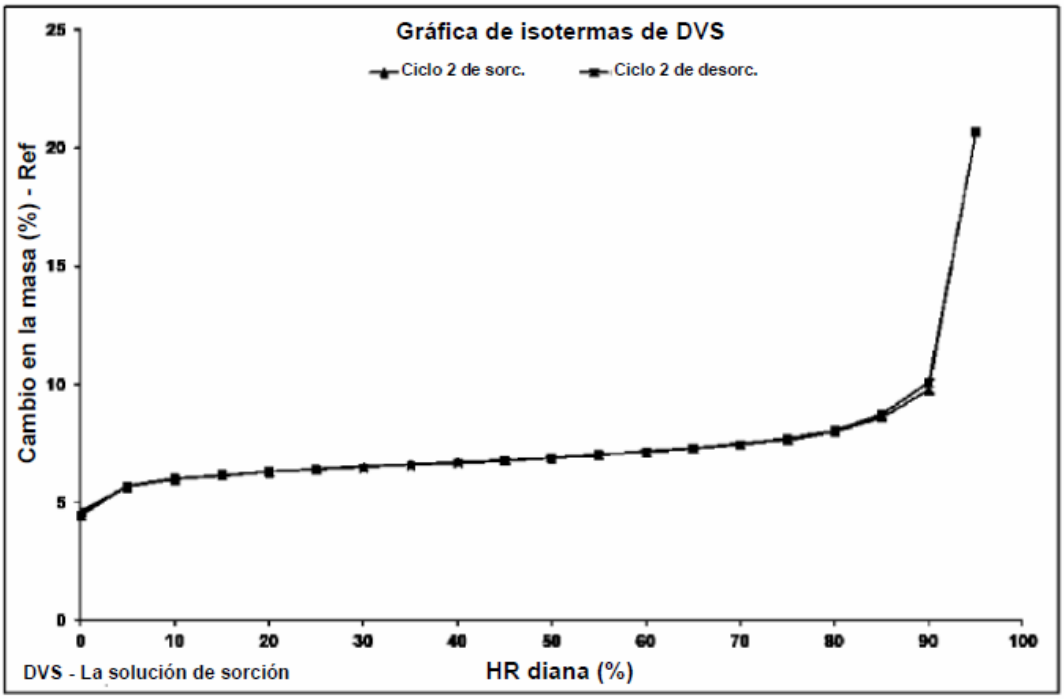


Figura 18

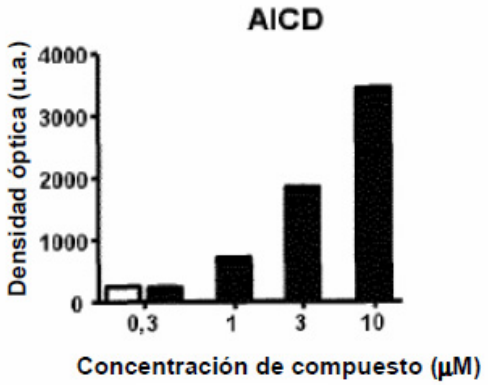


Figura 19-a

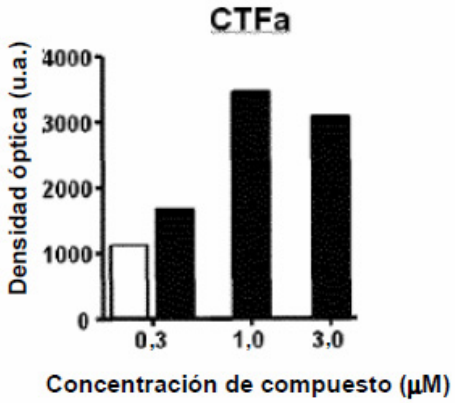


Figura 19-b

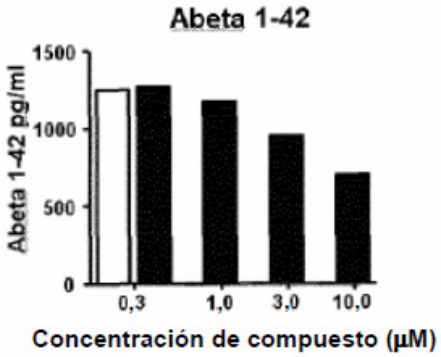


Figura 19-c

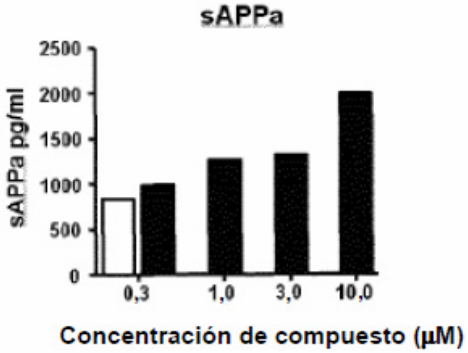


Figura 19-d

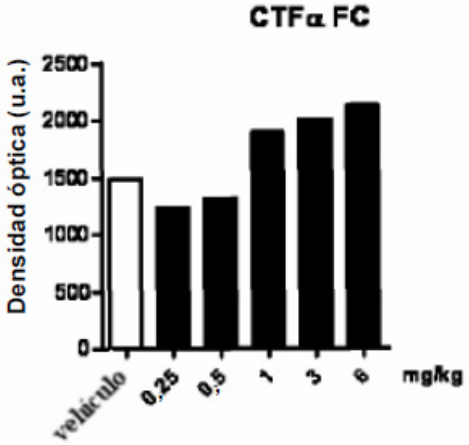


Figura 20

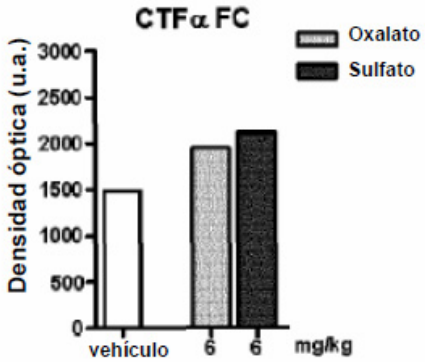


Figura 21

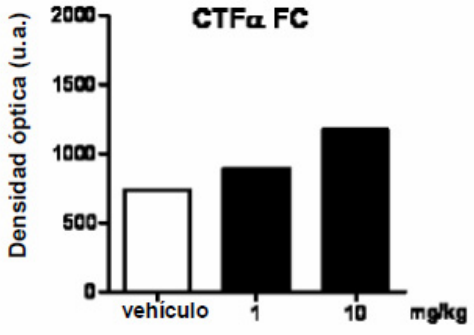


Figura 22-a

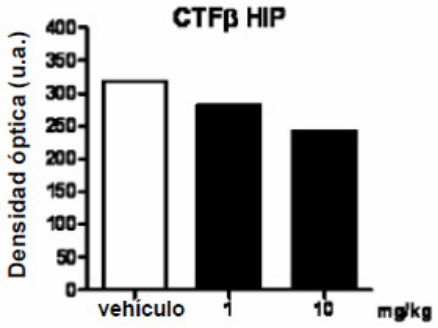


Figura 22-b

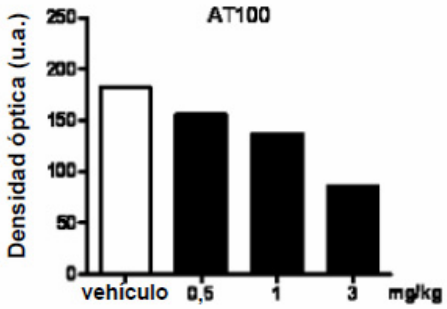


Figura 23-a

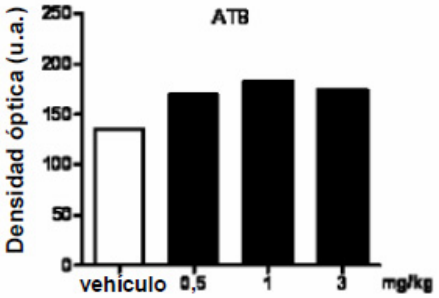


Figura 23-b

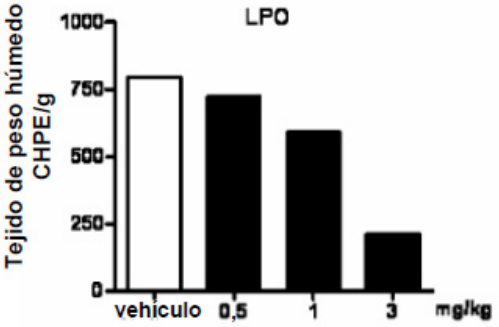


Figura 23-c