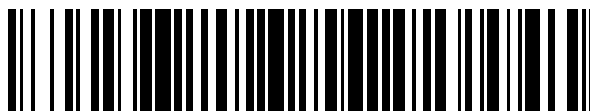


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 205**

51 Int. Cl.:

A61K 31/196 (2006.01)

C07C 229/64 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2007 PCT/KR2007/001801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2007 WO07119973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2007 E 07745964 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2004164**

54 Título: **Composición farmacéutica para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

13.04.2006 KR 20060033596

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

19.11.2018

73 Titular/es:

**NEUROTECH PHARMACEUTICALS CO., LTD.
(100.0%)**

**29-35, Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon-si
Gyeonggi-do 442-821, KR**

72 Inventor/es:

**GWAG, BYOUNG-JOO;
CHO, SUNG-IG;
CHO, JAE-YOUNG;
LEE, YOUNG-AE;
BYUN, HAN-YEOL;
LIM, DOO-SOON;
HAHM, KI-BAIK;
KWON, YOUNG-BAE;
LEE, JIN-HWAN;
YOON, BOK-SEON;
AN, CHUN-SAN y
RYU, KEUN-SIL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 690 205 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

Composición farmacéutica para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para usar en un método de tratamiento o prevención de inflamación y daño celular que se produce en la enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en gastritis, úlcera gástrica, pancreatitis, colitis, artritis, inflamación diabética y dolor, arteriosclerosis, nefritis, hepatitis, enfermedad intestinal inflamatoria e hiperalgesia asociada con artritis o artritis reumatoide.

Antecedentes de la técnica

10 La inflamación son reacciones de membranas de la sangre y células contra un factor de lesión que se origina en la célula lesionada y material extraño que entra en el cuerpo. Se sabe que 1) los metabolitos del ácido araquidónico, es decir, prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas, 2) el factor activador de plaquetas, 3) citoquinas tales como factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina-1 (IL-1), etc., y quimioquinas como proteína quimioattractora de monocitos (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa (MCP-1alfa), etc., 4) el óxido nítrico (NO), 5) el oxígeno reactivo, 6) factores de vasodilatación tales como histamina, serotonina, etc., son materiales que intervienen en la reacción de inflamación. El propósito principal de la reacción de inflamación es eliminar material extraño y células dañadas (o tejido celular), pero la reacción de inflamación puede ser una causa de enfermedades crónicas como la artritis reumatoide y la arteriosclerosis.

20 En el caso de que el grado de daño inflamatorio sea pequeño, limitado y temporal, los factores de lesión son eliminados y el tejido vuelve al estado normal según termina la reacción de inflamación. La reacción de inflamación que se produce donde hay un daño grande o la capacidad de regeneración es débil, va acompañada de daño tisular importante, que puede producir disfunción. La reacción de inflamación crónica que se produce durante un tiempo prolongado puede ser una causa de un daño mortal de los tejidos en la artritis reumatoide, arteriosclerosis, tuberculosis, enfermedad pulmonar crónica, etc. (*Pathological Basis of Disease*, pág. 47-86, 7ª edición).

25 Además, hay mucha bibliografía que describe que la inflamación tiene una función crítica en la fisiopatología de la enfermedad cerebral degenerativa. La microglía presente en el cerebro es activada en el sitio donde se produce el daño neuronal en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Lou Gehrig (Liu B y Hong JS., *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304(1):1-7; Orr CF et al., *Prog Neurobiol.* 2002; 68(5):325-40; y Henkel JS et al., *Ann Neurol.* 2004; 55(2):221-35). La microglía activada produce prostaglandinas, citoquinas, quimioquinas, especies de oxígeno reactivas, NO, etc., que empiezan la reacción de inflamación en el cerebro (Minghetti L. *Curr Opin Neurol.* 2005; 18(3):315-21; Gao HM, *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24 (8):395-401; Weydt P y Moller T. *Neuroreport.* 2005; 16(6):527-31; J.J.M. Hoozemans *Int. J. Devl Neuroscience.* 2006; 24:157-165). Por lo tanto, se ha descrito que la administración de fármaco inhibidor de la inflamación suprime la producción de beta-amiloide y placa en el modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (Townsend KP y Pratico D. *FASEB J.* 2005; 18:315-21), protege la célula neuronal dopaminérgica en el modelo animal de la enfermedad de Parkinson (Ferber B et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 360(3):256-61; Teismann P, Ferger B. *Synapse.* 2001; 39(2):167-74), previene la muerte de motoneuronas espinales y reduce la actividad de la glía en el modelo de enfermedad de Lou Gehrig (Kiaei M et al., *J Neurochem.* 2005; 93(2):403-11). Realmente, la tasa de ataques de enfermedad de Alzheimer es alta en pacientes que tienen reacción de inflamación cerebral causada por contusión, etc. (Breitner JC. *Neurology.* 1994; 44(2):227-32), y la tasa de ataques de enfermedad de Alzheimer es baja en pacientes de artritis reumatoide que toman fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) durante un tiempo prolongado (McGeer PL et al., *Lancet.* 1990; 335(8696):1037). Además, se ha descrito que la administración de AINE no solo previene la enfermedad de Alzheimer, sino que también retrasa el avance del daño de la función cognitiva (Rich et al., *Neurology.* 1995). Estos resultados sugieren que se puede usar un fármaco que inhibe la reacción de inflamación para prevenir y tratar una enfermedad cerebral degenerativa.

50 Los AINE, fármacos que suprimen la actividad de la ciclooxigenasa que interviene en la producción de prostaglandina, se han desarrollado y usado ampliamente para aliviar síntomas, que incluyen dolor de enfermedades inflamatorias, pero hay efectos secundarios para bloquear el uso de los AINE. Específicamente, los trastornos gastrointestinales tales como dispepsia, gastritis, úlcera, hemorragia y perforación, son efectos secundarios que se producen a menudo después de la administración de AINE. Realmente, debido a los efectos adversos de los AINE, se ha informado que 107.000 personas han sido hospitalizadas y se ha informado que 16.500 personas han muerto solo en EE.UU. El celecoxib y rofecoxib, inhibidores selectivos de la enzima COX-2 (ciclooxigenasa 2), que tienen pocos efectos secundarios en el daño gastrointestinal, se han desarrollado y se han usado para tratar la artritis y el dolor. Sin embargo, la FDA de EE.UU. ha informado que la administración a largo plazo de celecoxib, rofecoxib y valdecoxib podría producir enfermedad cardíaca y ha prohibido el uso de estos como fármacos para tratar la artritis. Además, se interrumpieron los ensayos clínicos para evaluar la eficacia terapéutica del celecoxib y rofecoxib en la demencia debido a su seguridad.

Además, se sabe que las especies de oxígeno reactivas producidas por neutrófilos, macrófagos, monocitos, etc. en la enfermedad inflamatoria son una razón principal que produce daño tisular por mediación de la reacción inflamatoria. De hecho, se ha descrito que la administración de fármacos que eliminan el oxígeno reactivo es eficaz para tratar el daño gástrico que se produce en las enfermedades inflamatorias (Matthews GM et al., *Helicobacter*. 2005; 10(4):298-306), daño pancreático (Shi C et al., *Pancreatology*. 2005; 5(4-5):492-500), aterosclerosis (Tardif JC. *Curr Atheroscler Rep*. 2005; 7(1):71-7), daño del colon (Oz HS et al., *J Nutr Biochem*. 2005; 16(5):297-304), daño de articulaciones (Henrotin YE et al., *Osteoarthritis Cartilage*. 2003; 11(10):747-55), daño renal (Tian N et al., *Hypertension*. 2005; 45(5):934-9), daño hepático (Loguercio C et al., *Free Radic Biol Med*. 2003; 34(1):1-10) y daño cardiovascular (Haidara MA et al., *Curr Vasc Pharmacol*. 2006; 4(3):215-27). Además, la administración de AINE causa la producción de oxígeno reactivo e induce daño en la membrana de la mucosa gástrica. Se ha descrito que este daño gástrico disminuye por la administración de material antioxidante (Graziani G et al., *Gut*. 2005; 54(2):193-200).

La inflamación tiene una función importante en la fisiopatología de la enfermedad digestiva, enfermedad respiratoria o enfermedad del sistema neuronal, pero el uso de los fármacos actualmente disponibles está limitado debido a los efectos secundarios de los fármacos. Se sabe que la aspirina (ácido acetilsalicílico), un fármaco antiinflamatorio, suprime la acción de NF-kB y quinsa c-Jun N-terminal (Ko HW et al., *J Neurochem*. 1998; 71(4):1390-5), y se sabe que la sulfasalazina protege a la célula por su actividad antioxidante (Ryu BR et al., *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(1):48-56). Sin embargo, hay el inconveniente de que la aspirina y la sulfasalazina muestran sus efectos protectores de la célula solo en alta concentración.

El documento WO 01/79153 describe la síntesis de ácido 5-bencilamino-salicílico y sus derivados, así como el tratamiento de enfermedades neurológicas.

El documento US 2007/0049565 describe una combinación de un inhibidor de necrosis celular y litio, y el uso de la combinación para tratar enfermedades neurológicas

Descripción

25 Problema técnico

Por consiguiente, el objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para usar en un método de tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria y que no tiene efectos secundarios tales como daño gástrico y trastorno cardiovascular.

Solución técnica

30 Para lograr el objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende derivado del ácido 2-hidroxibenzoico o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-hidroxi-5-fenetilamino-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(2-nitro-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-difluoro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(4-fluoro-2-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(2-fluoro-4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-metoxi-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(2-o-tolil-etilamino)-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-fenil-propilamino)-benzoico, ácido 5-[3-(4-fluoro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[3-(3,4-dicloro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-p-tolil-propilamino)-benzoico y ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, para usar en el tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en gastritis, colitis, pancreatitis, artritis, inflamación y dolor diabéticos, arteriosclerosis, nefritis, hepatitis, enfermedad intestinal inflamatoria, úlcera gástrica e hiperalgesia asociada con artritis o artritis reumatoide.

La presente invención también proporciona el uso de un derivado del ácido 2-hidroxibenzoico o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-hidroxi-5-fenetilamino-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(2-nitro-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-difluoro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(4-fluoro-2-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(2-fluoro-4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-metoxi-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(2-o-tolil-etilamino)-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-fenil-propilamino)-benzoico, ácido 5-[3-(4-fluoro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[3-(3,4-dicloro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-p-tolil-propilamino)-benzoico y ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en gastritis, colitis, pancreatitis, artritis, inflamación y dolor diabéticos, arteriosclerosis, nefritis, hepatitis, enfermedad intestinal inflamatoria, úlcera gástrica e hiperalgesia asociada con artritis o artritis reumatoide.

Los autores de la presente invención han preparado y evaluado muchos compuestos, y han tenido éxito en la invención del hecho de que el uso del derivado de ácido 2-hidroxibenzoico o sus sal farmacéuticamente aceptable es muy útil para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria, así como seguro.

En lo sucesivo, se describirá con más detalle la composición farmacéutica para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende derivado del ácido 2-hidroxibenzoico o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-hidroxi-5-fenilamino-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(2-nitro-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-difluoro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(4-fluoro-2-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(2-fluoro-4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-metoxi-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(2-o-tolil-etilamino)-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-fenil-propilamino)-benzoico, ácido 5-[3-(4-fluoro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[3-(3,4-dicloro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-p-tolil-propilamino)-benzoico y ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, para usar en el tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en gastritis, colitis, pancreatitis, artritis, inflamación diabética y dolor, arteriosclerosis, nefritis, hepatitis, enfermedad intestinal inflamatoria, úlcera gástrica e hiperalgesia asociada con artritis o artritis reumatoide.

Entre los compuestos anteriores, son más preferibles el ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 2) y el ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 18) como agente terapéutico para tratar la enfermedad inflamatoria que otros derivados del ácido 2-hidroxibenzoico.

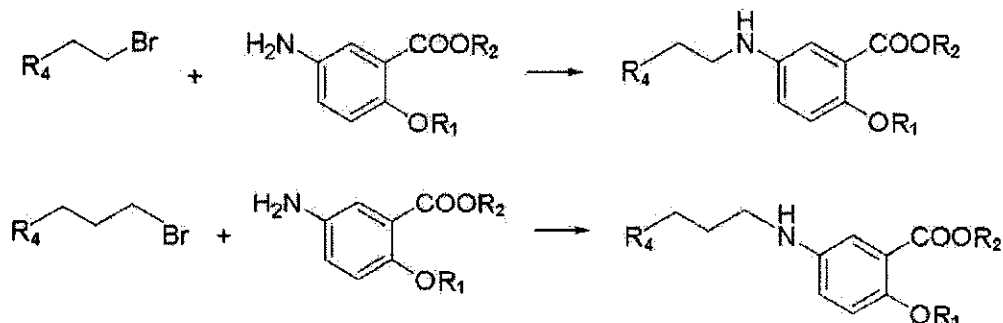
Se describe en la presente memoria que el compuesto 2 es más preferido que otros derivados del ácido 2-hidroxibenzoico cuando se usa para tratar daño celular e inflamación de enfermedades cerebrales degenerativas.

Se describe en la presente memoria que el compuesto 2 mostraba efecto antiinflamatorio superior y efecto supresor superior sobre la producción de beta-amiloide comparado con algunos compuestos que tienen estructura química similar. Incluso si hay compuestos que mostraban mejor efecto que el compuesto 2 cuando se considera solo un ensayo tal como el efecto de supresión en la producción de NO, los compuestos no eran mejores como agente terapéutico para tratar enfermedades cerebrales degenerativas que el compuesto 2 porque los compuestos mostraban efectos relativamente peores en los otros ensayos (por ejemplo, algunos compuestos mostraban mejores efectos supresores sobre la producción de NO que el compuesto 2, pero los compuestos mostraban efecto supresor muy débil sobre la producción de beta-amiloide, que es un factor muy importante en el tratamiento de enfermedades cerebrales degenerativas). Además, algunos compuestos mostraban buena eficacia terapéutica en todos los ensayos de eficacia, pero mostraban malos resultados de seguridad comparados con el compuesto 2, tal como en el siguiente ensayo de toxicidad.

Igualmente, entre los compuestos preferidos, el compuesto 18 es más preferido en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria que otros derivados del ácido 2-hidroxibenzoico. El compuesto 18 mostraba efecto muy superior en los ensayos de eficacia antiinflamatoria comparado con compuestos que tienen estructura similar, y es menos preferido que el compuesto 2 en el siguiente ensayo de toxicidad.

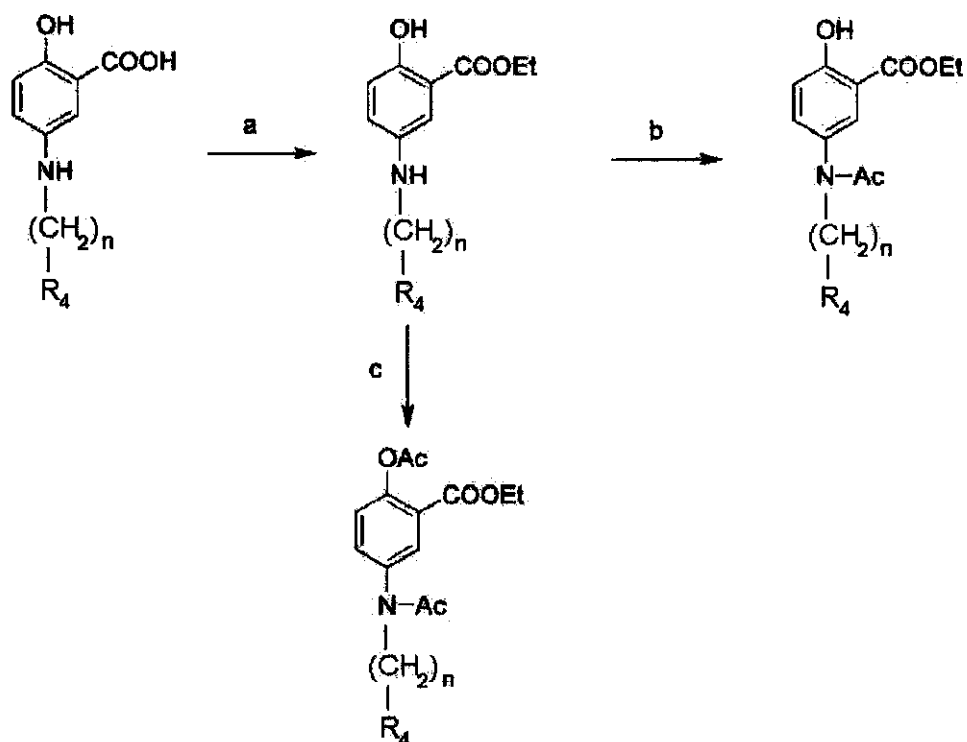
El derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención se puede preparar por, pero no se limita, el siguiente esquema de reacción. El derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención se puede preparar por el método de síntesis convencional bien conocido en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Esquema de reacción 1



Condiciones de reacción: trietilamina, yoduro de tetrabutilamonio, N,N-dimetilformamida, temperatura ambiente, 3 horas

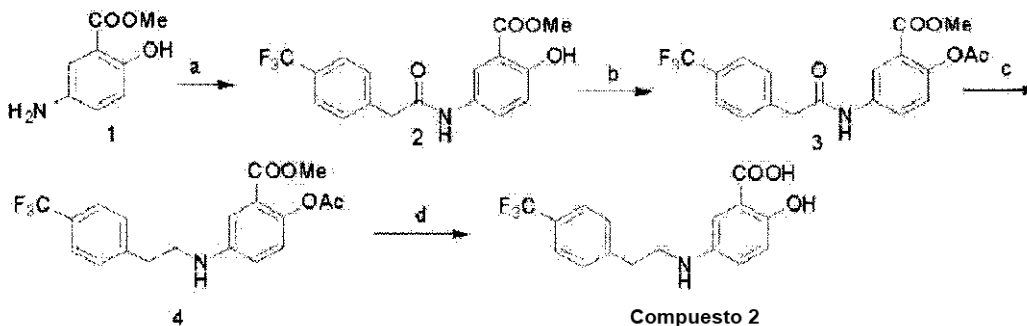
Esquema de reacción 2



Condiciones de reacción: (a) etanol, H₂SO₄, reflujo, 6 horas; (b) anhídrido acético, metanol, 0°C, 30 minutos; (c) anhídrido acético, H₂SO₄, 0°C, 30 minutos

5 Además el ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 2), un ejemplo preferido de la presente invención, se puede preparar por, pero no se limita al siguiente esquema de reacción 3.

Esquema de reacción 3



10 Condiciones de reacción: (a) ácido 4-(trifluorometil)hidrocínámico, PCl₅, xileno, reflujo, 12 horas; (b) cloruro de acetilo, DMF/K₂CO₃, temperatura ambiente, 2 horas; (c) NaBH₄, ácido acético/1,4-dioxano, 95°C, 50 minutos; (d) HCl/H₂O, ácido acético

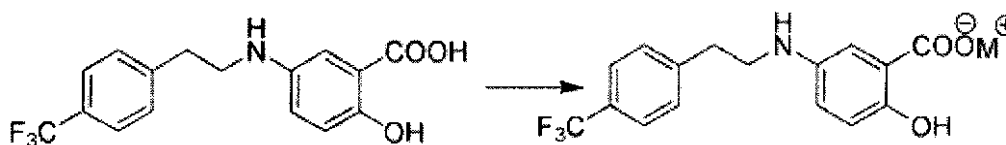
15 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" de la presente invención significa sales producidas por base no tóxica o poco tóxica. En el caso de que el compuesto de la presente invención sea ácido, las sales de adición de base del compuesto de la presente invención se pueden hacer haciendo reaccionar la base libre del compuesto con suficiente cantidad de la base deseable y disolvente inerte adecuado. La sal de adición de base farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a sal de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio o hecha con amino orgánico.

20 En el caso de que el compuesto de la presente invención sea básico, las sales de adición de ácido del compuesto se pueden hacer haciendo reaccionar la base libre del compuesto con cantidad suficiente del ácido deseable y disolvente inerte adecuado. La sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a ácido propiónico, ácido isobutílico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido subérico, ácido fumárico, ácido mandélico, ácido ftálico, ácido bencenosulfónico, ácido p-tolilsulfónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido clorhídrico, ácido brómico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido monohidrogenocarbónico, ácido fosfórico, ácido monohidrógenofosfórico, ácido dihidrógenofosfórico, ácido sulfúrico, ácido monohidrógenosulfúrico, yoduro de hidrógeno y ácido fosforoso. Además, la sal farmacéuticamente aceptable

de la presente invención incluye, pero no se limita a una sal de aminoácido como de arginato y un análogo de ácido orgánico como glucurónico o galacturónico.

5 Por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable del ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 2), un ejemplo preferido de la presente invención, se puede preparar por el siguiente esquema de reacción 4. Sin embargo, los siguientes métodos de reacción se ofrecen a modo de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Esquema de reacción 4



10 En el esquema M es un metal farmacéuticamente aceptable o compuesto orgánico básico tal como dietilamina, litio, sodio y potasio.

Con más detalle, la sal de dietilamina se puede preparar disolviendo un compuesto en alcohol, añadiendo gota a gota dietilamina, agitando la mezcla, destilando a vacío, y cristalizando el residuo por adición de éter. La sal de metal alcalino se puede hacer preparando la sal deseable con reactivo inorgánico tal como hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio en disolvente como alcohol, acetona, acetonitrilo y después liofilizando. Además, de acuerdo con un método similar, la sal de litio se puede hacer con acetato de litio, la sal de sodio se puede hacer con 2-etilhexanoto de sodio o acetato de sodio, y la sal de potasio se puede hacer con acetato potásico.

Algunos de los compuestos de la presente invención pueden estar en forma hidratada, y pueden existir como forma solvatada o no solvatada. Una parte de los compuestos según la presente invención existen como forma cristalina o forma amorfa, y cualquier forma física está incluida en el alcance de la presente invención. Además, algunos compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos o doble enlace, y por lo tanto existen en dos o más formas estereoisómeras como racemato, enantiómeros, diastereoisómeros, isómeros geométricos, etc. La presente invención incluye estos estereoisómeros individuales de los compuestos de la presente invención.

La presente invención también proporciona el ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico y sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención se puede administrar solo o con cualquier vehículo, diluyente etc. conveniente, y una formulación para la administración puede ser una sola dosis o múltiples dosis.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una forma sólida o líquida. La formulación sólida incluye, pero no se limita a un polvo, un gránulo, un comprimido, una cápsula, un supositorio, etc. Además, la formulación sólida puede incluir además, pero no se limita a un diluyente, un agente de sabor, un aglutinante, un conservante, un agente disgregante, un lubricante, una carga, etc. La formulación líquida incluye, pero no se limita a una solución tal como solución en agua y solución en propilenglicol, una suspensión, una emulsión, etc., y se puede preparar añadiendo derivados adecuados tales como un agente colorante, un agente de sabor, un estabilizante, espesante, etc.

35 Por ejemplo, un polvo se puede hacer mezclando simplemente el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención y excipientes farmacéuticamente aceptables tales como lactosa, almidón, celulosa microcristalina. Un gránulo se puede preparar como sigue: mezclamiento del compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable y un aglutinante farmacéuticamente aceptable tal como polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, etc.; y granulación en húmedo con disolvente adecuado tal como agua, etanol, isopropanol, etc., o compresión directa con polvo de compresión. Además, un comprimido se puede hacer mezclando el gránulo con un lubricante farmacéuticamente aceptable tal como estearato magnésico y formando el comprimido con la mezcla.

45 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en forma de, pero no se limita a formulación oral, formulación inyectable (por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, infusión, subcutánea, implante), inhalable, intranasal, vaginal, rectal, sublingual, transdérmica, tópica, etc., dependiendo de los trastornos que se van a tratar y las condiciones del paciente. La composición de la presente invención se puede formular en una unidad de dosificación adecuada que comprende un excipiente, aditivo y/o vehículo no tóxico y farmacéuticamente aceptable, los cuales se usan todos en general en la técnica, dependiendo de las vías de administración. También está incluida la formulación de tipo depósito que se puede liberar de forma continua durante el tiempo conveniente, en el alcance de la presente invención.

Para tratar la enfermedad inflamatoria, el compuesto de la presente invención se puede administrar diariamente en una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 g/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1

mg/kg a aproximadamente 10 g/kg. Sin embargo, la dosis puede variar según las condiciones del paciente (edad, sexo, peso corporal, etc.), la gravedad de los pacientes que lo necesitan, los componentes efectivos usados, dietas, etc. El compuesto de la presente invención se puede administrar una vez al día o varias veces al día en dosis divididas, si es necesario.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra que el compuesto 2 no causa daño a la membrana de la mucosa gástrica, lo que significa que el compuesto 2 es seguro. Las muestras de ensayo se administraron por vía oral en diferentes dosis para evaluar el grado de daño de la membrana de la mucosa gástrica. Se usó aspirina como control.

10 La figura 2 es el resultado que muestra el grado de daño de la membrana de la mucosa gástrica. Las muestras de ensayo se administraron por vía oral en la dosis indicada. El compuesto 18 no causaba daño a la membrana de la mucosa gástrica en dosis alta. Se usaron como control indometacina, ibuprofeno y celecoxib.

15 La figura 3 es el resultado que muestra el efecto de protección celular del compuesto 2 en el daño de la membrana de la mucosa gástrica inducido por Helicobacter. Se administró Helicobacter (43504, 5×10^8 ufc/ml) a células AGS (cáncer gástrico humano) cultivadas, solo o con muestra que tenía la concentración indicada. Se usó el método de análisis de MTT para evaluar la tasa de supervivencia de las células de la membrana de la mucosa gástrica 24 horas después de la administración.

20 La figura 4 es el resultado que muestra el efecto de protección celular del compuesto 2 en el daño de la membrana de la mucosa gástrica inducido por sulindac, un AINE. Se administró sulindac $100 \mu\text{M}$ a células AGS cultivadas, solo o con muestra que tenía la concentración indicada. Se usó el método de análisis de MTT para evaluar la tasa de supervivencia de las células de la membrana de la mucosa gástrica 16 horas después de la administración.

25 La figura 5 es el resultado que muestra el efecto de protección celular del compuesto 2 en el daño de la membrana de la mucosa gástrica inducido por H_2O_2 , estrés oxidativo. Células AGS cultivadas se trataron con H_2O_2 $100 \mu\text{M}$ durante 8 horas, solo o con muestra que tenía la concentración indicada, y se lavaron con medio de cultivo. Se usó el método de análisis de MTT para evaluar la tasa de supervivencia de las células de la membrana de la mucosa gástrica 24 horas más tarde.

La figura 6 es el resultado que muestra el efecto de protección celular del compuesto 2 en el daño de la membrana de la mucosa gástrica inducido por alcohol (etanol). Células AGS cultivadas se trataron con alcohol 25 mM durante 24 horas, solo o con muestra que tenía la concentración indicada. Después, se usó el método de análisis de MTT para evaluar la tasa de supervivencia de las células de la membrana de la mucosa gástrica.

30 La figura 7 es una imagen que muestra el grado de expresión del ARNm del TNF- α . Células AGS cultivadas se trataron con alcohol 25 mM durante 24 horas, solo o con compuesto 2 que tenía la concentración indicada. Después, se extrajo el ARNm y se evaluó por el método de RT-PCR

35 La figura 8 es el resultado que muestra el efecto de protección celular del compuesto 2 en la hemorragia gastrointestinal causada por alcohol/ácido clorhídrico (EtOH/HCl). A es una imagen del estómago de rata normal. B es una imagen del estómago de rata, en donde se produjo hemorragia gastrointestinal por la administración oral de EtOH al 60%/HCl 150 mM después de mantener en ayunas durante 24 horas ratas de $200\text{--}250 \text{ g}$. C es una imagen del estómago de rata, en donde la rata se trató previamente con compuesto 2 30 minutos antes de la administración de alcohol/HCl y el estómago se sacó 90 minutos después de la hemorragia gastrointestinal. D es una gráfica que cuantifica la superficie dañada para evaluar el grado de lesión del estómago.

40 La figura 9 es el resultado que muestra el efecto protector del compuesto 2 en la gastritis alcohólica. A es una imagen del estómago normal de rata. B es una imagen del estómago de rata, en donde se produjo hemorragia gastrointestinal por la administración oral de etanol (4 ml/kg) después de mantener en ayunas durante 24 horas ratas de 250 g . C es una imagen del estómago de rata, en donde la rata se trató previamente con compuesto 2 1 hora antes de la inducción de hemorragia gastrointestinal y el estómago se sacó 90 minutos después de la hemorragia gastrointestinal. D es una gráfica que cuantifica el grado de lesión del estómago.

45 La figura 10 es el resultado que muestra el efecto protector del compuesto 2 en la gastritis inducida por AINE. Ratas de 250 g se mantuvieron en ayunas durante 24 horas y se administró por vía oral indometacina para producir hemorragia gastrointestinal (A y C). El compuesto 2 se administró 1 hora antes de la administración de AINE (B y D), y el estómago se sacó 6 horas (A y B) o 12 horas (C y D) después de la hemorragia gastrointestinal.

50 La figura 11 es el resultado que muestra la eficacia del compuesto 2 en la hiperalgesia térmica inducida por carragenano, uno de los modelos animales de artritis. Se inyectó por vía intradérmica carragenina al 2% en la pata trasera de la rata para inducir la hiperalgesia térmica. El compuesto 2 se administró por vía oral, y se usó ibuprofeno como ejemplo comparativo.

55 La figura 12 es el resultado que muestra la eficacia del compuesto 2 en los niveles de TNF-alfa inducidos por zimósán, uno de los modelos animales de artritis. Se administró zimósán al 1% con bolsa de aire, y el compuesto 2

se administró una vez por vía oral según la dosis indicada 1 hora antes de la administración de zimosán. Se evaluó el nivel de TNF-alfa en una exudación de la bolsa de aire por el método de ELISA 4 horas más tarde.

5 La figura 13 es una gráfica que muestra cuánto disminuye el compuesto 2 el nivel de IL-1alfa inducido por zimosán, uno de los modelos animales de artritis. Se administró zimosán al 1% con bolsa de aire, y el compuesto 2 se administró una vez por vía oral según la dosis indicada 1 hora antes de la administración de zimosán. Se evaluó el nivel de IL-1alfa en una exudación de la bolsa de aire por el método de ELISA 4 horas más tarde.

La figura 14 es el resultado que muestra la eficacia en el modelo animal de artritis inducida por colágeno. La figura 14 muestra el edema de la pata por el colágeno.

Simulado: ratón normal

10 Colágeno: se administró colágeno al ratón

Compuesto 18: se inyectó al ratón por vía intraperitoneal 25 mg/kg del compuesto 18.

15 La figura 15 es el resultado que muestra la eficacia en el modelo animal de artritis inducida por colágeno. Se inyectaron por vía intraperitoneal 25 mg/kg de compuesto 2, 3 o 18, o metotrexato (control, MTX, 1 mg/kg/semana) después de administración de colágeno. Después los ratones se observaron a simple vista durante 4 semanas y los resultados se evaluaron por el índice de artritis.

La figura 16 es el resultado que muestra la eficacia del compuesto 6 y 11 en el modelo animal de artritis inducida por colágeno. El colágeno se inyectó por vía intradérmica dos veces con intervalo de 2 semanas. Una semana más tarde, se inyectaron por vía intraperitoneal el compuesto 6, compuesto 11 y metotrexato (control). Después los animales se observaron cada día durante 2~3 semanas, y los resultados se evaluaron por el índice de artritis.

20 La figura 17 es el resultado que muestra la eficacia en el modelo de dextrano-sulfato sódico (DSS) al 5%, modelo animal de enfermedad intestinal inflamatoria. Después de tratamiento con DSS, se administraron por vía oral 10, 25 o 50 mg/kg de compuesto 18 suspendido en vehículo al 10%.

Simulado significa colon del ratón normal, DSS significa colon de ratón tratado con DSS al 5%. Las otras son imágenes del colon de ratones a los que se administró el compuesto 18 en la dosis indicada.

25 La figura 18 y 19 son gráficas que cuantifican los resultados de la figura 17. La figura 18 es la longitud del colon y la figura 19 es la anchura del colon.

30 La figura 20 es el resultado de un ensayo de eficacia del compuesto 18 usando DSS. Después de tratamiento con DSS, se administró por vía oral el compuesto 18 (25 mg/kg) suspendido en vehículo al 10%. Después de esto, se evaluaron como puntuación de las heces el excremento con sangre por lesión del colon, diarrea y el grado de suciedad.

La figura 21 es el resultado del ensayo de eficacia usando el modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Se administraron 50 ug/kg de ceruleína. Dos horas después se indujo edema por administración de LPS. A-C son imágenes de resultados y D es una gráfica que muestra el peso del páncreas.

A: rata Wistar normal

35 B: rata Wistar a la que se ha administrado ceruleína

C: rata Wistar a la que se ha administrado compuesto 18 (25 mg/kg)

40 La figura 22 es el resultado del ensayo de eficacia usando el modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína. Se administraron 50 ug/kg de ceruleína. Dos horas después se indujo edema por administración de LPS. Se administraron 25 mg/kg de compuesto 18, y se cuantificaron los cambios de amilasa y lipasa, enzimas digestivas pancreáticas.

Las figuras 23 y 24 son resultados del ensayo de eficacia usando el modelo de pancreatitis inducida por ceruleína. Se evaluaron los efectos del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención en los marcadores inflamatorios TNF- α , IL-1 β y PGE₂.

45 La figura 25 son gráficas que muestran los niveles de TNF- α , IL-1 β o IL-6 en el cerebro de ratones con demencia APP/PS1 (Tg+) de 10,5 meses de edad. Los niveles se evaluaron por el método ELISA. Se administró el compuesto 2 (25 mg/kg/día) o ibuprofeno (62,5 mg/kg/día) mezclado con comida durante 7 meses desde los 3 meses de edad.

La figura 26 son imágenes (aumentos bajos y altos) que muestran el efecto protector del compuesto 2 en la barrera hematoencefálica.

A: ratón normal

B/F: ratón con demencia APP/PS1

C/G: ratón al que se ha administrado el compuesto 2 (25 mg/kg/día)

D/H: ratón al que se ha administrado ibuprofeno (62,5 mg/kg/día)

5 La figura 27 son imágenes de placa amiloide producida en el cerebro de ratón normal de 10,5 meses de edad (A), ratón con demencia APP/PS1 de 10,5 meses de edad (B, Tg+), ratón con demencia APP/PS1 alimentado con comida que contiene compuesto 2 (25 mg/kg/d, C) o ibuprofeno (62,5 mg/kg/d, D), durante 7 meses desde los 3,5 meses de edad. Se usó pigmento de tioflavina-S para la tinción. E es una gráfica que cuantifica los resultados de A-D.

10 La figura 28 es el resultado el ensayo del laberinto en cruz elevado realizado con ratón normal de 10,5 meses de edad, ratón con demencia APP/PS1 de 10,5 meses de edad, y ratón con demencia APP/PS1 al que se le ha administrado comida con compuesto 2 (25 mg/kg/d) durante 7 meses desde los 3,5 meses de edad. El tiempo que está en el brazo abierto se registró como resultado de eficacia.

La figura 29 son imágenes que muestran la actividad de la microglía, un marcador de inflamación, en ratón G93A. Los resultados se inmunotifieron con lectina de tomate.

15 A: ratón normal

B: ratón G93A

C: ratón G93A al que se administraron 5 mg/kg/día de compuesto 2

20 La figura 30 es el resultado que muestra los niveles de ARNm de citoquinas inflamatorias (TNF- α e IL-1 β), marcadores de inflamación, en el ratón G93A. Se usó RT-PCR (Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa).

La figura 31 son imágenes que muestran el efecto de supresión del compuesto 2 en el modelo animal de enfermedad de Parkinson. Los resultado se inmunotifieron con CD11b.

A: ratón al que se administró MPTP

B: ratón al que se administraron 50 mg/kg/d de compuesto 2

25 La figura 32 es el resultado del ensayo de toxicidad de una sola dosis de algunos derivados de ácido 2-hidroxibenzoico según la presente invención.

Modos de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describe con un detalle considerable para ayudar a los expertos en la técnica a entender la presente invención.

30 Ejemplo de síntesis 1. Preparación del ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 2)

35 Se añadió ácido 5-aminosalicílico (0,51 g, 3,90 mmol) a N,N-dimetilformamida (20,0 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno, y la mezcla de reacción se agitó. Se añadieron trietilamina (0,50 ml) y yoduro de tetrabutilamonio (10,1 mg), y se agitó durante 30 minutos. Después, se añadió 1-(2-(bromoetil)-4-trifluorometil)benzeno, y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió hielo para inactivar la reacción. Los cristales producidos se filtraron, se agitaron de nuevo con acetona y hexano y se volvieron a filtrar. El sólido filtrado se disolvió en acetato de etilo, se lavó con ácido clorhídrico 0,5 N y salmuera, se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se destiló a vacío para dar 0,54 g (21% de rendimiento) de ácido 2-hidroxi-5-(4-(trifluorometil)feniletilamino)benzoico.

RMN ¹H (DMSO-d₆): 7,62 (d, 2H), 7,48 (d, 2H), 6,98 (d, 1H), 6,88 (q, 1H), 6,76 (d, 1H), 3,24 (t, 2H), 2,91 (t, 2H)

40 Ejemplo de síntesis 2. Preparación de la sal de potasio del ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico

45 Se añadió ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (10 g, 30,7 mmol) producido en el ejemplo de síntesis 1 a etanol anhidro (100 ml), y se calentó hasta 50°C para disolverlo completamente. Después, la disolución se enfrió a 0°C. El pH se ajustó a 6,8~7,0 con disolución de hidróxido potásico al 85% (2,03 g, 30,7 mmol) y etanol anhidro (20 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los cristales precipitados se filtraron para dar 10,4 g (93% de rendimiento) de la sal de potasio del ácido 2-hidroxi-5-(4-(trifluorometil)feniletilamino)benzoico.

RMN ¹H (DMSO-d₆): 7,62 (d, 2H), 7,48 (d, 2H), 6,98 (d, 1H), 6,90 (q, 1H), 6,84 (d, 1H), 3,24 (t, 2H), 2,91 (t, 2H)

Ejemplo de síntesis 3. Preparación del ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-nitrofenil)etilamino]-benzoico

De acuerdo con un procedimiento similar al ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-aminosalicílico (500 mg, 3,26 mmol) y bromuro de 4-nitrofeniletilo (900 mg, 3,92 mmol), se obtuvieron 890 mg (50% de rendimiento) de ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-nitrofenil)etilamino]-benzoico en forma de un sólido amarillo pálido. Punto de fusión 234-236°C.

5

Tabla 1

	% C	% H	% N
Calculado	59,60	4,67	9,27
Encontrado	59,77	4,79	9,24

Ejemplo de síntesis 4. Preparación del ácido 2-hidroxi-5-[3-(4-nitrofenil)-n-propilamino]-benzoico

De acuerdo con un procedimiento similar al ejemplo de síntesis 1, usando ácido 5-aminosalicílico (500 mg, 3,26 mmol) y bromuro de 3-(4-nitrofenil)propilo (950 mg, 3,92 mmol), se obtuvieron 520 mg (50% de rendimiento) de ácido 2-hidroxi-5-[3-(4-nitrofenil)-n-propilamino]-benzoico en forma de un sólido amarillo pálido. Punto de fusión 229-231°C.

10

Análisis elemental de C₁₆H₁₆N₂O₅

Tabla 2

	% C	% H	% N
Calculado	60,75	5,10	8,86
Encontrado	60,77	5,07	8,89

15

Ejemplo de síntesis 5

De acuerdo con un procedimiento similar al ejemplo de síntesis 1, se prepararon los otros compuestos. Los resultados de los análisis se mostraron en la siguiente tabla 3.

Tabla 3

Nº	RMN ¹ H (δ)
compuesto 3	7,54 (m, 4H), 7,20 (s, 1H), 6,59 (d, 1H), 6,47 (d, 1H), 3,19 (t, 2H), 2,90 (t, 2H)
compuesto 4	7,97 (s, 2H), 7,88 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,15 (t, 1H), 6,82 (d, 1H), 3,42 (t, 2H), 3,09 (t, 2H)
compuesto 5	7,91 (d, 1H), 7,58 (t, 1H), 7,51 (d, 1H), 7,43 (t, 1H), 7,10 (d, 1H), 6,64 (q, 1H), 6,51 (d, 1H), 3,21 (t, 2H), 3,04 (t, 2H)
compuesto 6	7,31 (d, 2H), 7,26 (d, 2H), 7,05 (s, 1H), 6,58 (d, 1H), 6,49 (d, 1H), 3,18 (t, 2H), 2,81 (t, 2H)
compuesto 7	7,31 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,94 (d, 1H), 6,87 (d, 1H), 6,74 (d, 1H), 3,17 (t, 2H), 2,87 (t, 2H)
compuesto 8	7,51 (q, 2H), 7,19 (d, 1H), 6,97 (t, 1H), 6,75 (t, 1H), 6,44 (d, 1H), 3,22 (t, 2H), 2,91 (t, 2H)
compuesto 9	7,94 (s, 1H), 7,64 (q, 2H), 7,45 (q, 2H), 7,10 (d, 1H), 3,48 (t, 2H), 3,21 (t, 2H)
compuesto 10	7,83 (t, 1H), 7,64 (d, 1H), 7,35 (t, 1H), 6,96 (q, 1H), 6,52 (t, 1H), 3,20 (t, 2H), 3,11 (t, 2H)
compuesto 11	7,32 (d, 1H), 7,14 (d, 2H), 6,82 (d, 2H), 6,78 (q, 1H), 6,64 (d, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,24 (t, 2H), 2,80 (t, 2H)
compuesto 12	7,21-7,11 (m, 5H), 6,93 (d, 1H), 6,78 (d, 1H), 3,17 (t, 2H), 2,82 (t, 2H)
compuesto 13	7,27-7,11 (m, 5H), 6,95 (d, 1H), 6,81 (q, 1H), 6,70 (m, 1H), 2,97 (t, 2H), 2,64 (t, 2H), 1,82 (m, 2H)
compuesto 14	7,61 (d, 2H), 7,43 (d, 2H), 6,97 (s, 1H), 6,85 (t, 1H), 6,78 (d, 1H), 3,04 (t, 2H), 2,78 (t, 2H), 1,87 (m, 2H)
compuesto 15	7,17 (t, 3H), 7,02 (t, 2H), 6,94 (d, 1H), 6,78 (d, 1H), 2,99 (t, 2H), 2,63 (t, 2H), 1,82 (m, 2H)
compuesto 16	7,45 (q, 2H), 7,15 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,92 (q, 1H), 6,77 (d, 1H), 2,96 (t, 2H), 2,66 (t, 2H), 1,82 (m, 2H)
compuesto 17	7,32 (s, 1H), 7,18 (d, 1H), 7,06 (s, 4H), 6,84 (d, 1H), 3,01 (t, 2H), 2,61 (t, 2H), 2,20 (s, 3H), 1,83 (m, 2H)

20

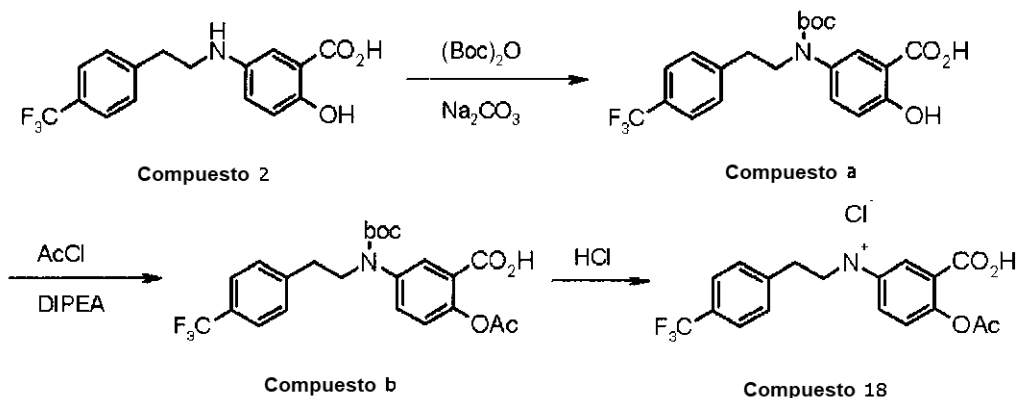
En la siguiente lista se menciona explícitamente el nombre químico de los compuestos: ácido 2-hidroxi-5-[2-(3-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 3), ácido 5-[2-(3,5-bis-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 4), ácido 2-hidroxi-5-[2-(2-nitro-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 5), ácido 5-[2-(4-cloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 6), ácido 5-[2-(3,4-difluoro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 7), ácido 5-[2-(3,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 8), ácido 5-[2-(4-fluoro-2-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 9), ácido 5-[2-(2-fluoro-4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 10), ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-metoxi-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 11), ácido 2-

25

hidroxi-5-(2-*o*-tolil-etilamino)-benzoico (compuesto 12), ácido 2-hidroxi-5-(3-fenil-propilamino)-benzoico (compuesto 13), ácido 2-hidroxi-5-[3-(4-trifluorometil-fenil)-propilamino]-benzoico (compuesto 14), ácido 5-[3-(4-fluoro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 15), ácido 5-[3-(3,4-dicloro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico (compuesto 16), ácido 2-hidroxi-5-(3-*p*-tolil-propilamino)-benzoico (compuesto 17).

5 Ejemplo de síntesis 6. Preparación del ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico (compuesto 18)

El compuesto 18 se preparó por el siguiente esquema de reacción.



10 Compuesto a: A una disolución del compuesto 2 (50,0 g, 154 mmol) en 200 ml de H₂O:1,4-dioxano (1:1) a temperatura ambiente se añadieron Na₂CO₃ (32,6 g, 307 mmol), dicarbonato de di-*tert*-butilo (40,3 g, 185 mmol). Después de 8 horas de agitación, se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo adicional (16,8 g, 76,9 mmol). Después de 8 horas adicionales de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se neutralizó (pH ~6) con disolución acuosa de HCl 2 N. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (2 X 200 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron. La concentración dio el compuesto en forma de una espuma amarilla. El producto bruto se usó sin purificación adicional.

15 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10,52 (1H, S ancho), 7,53 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,53 (ancho, 1H), 7,28 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,26 (ancho, 1H), 6,94 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 3,85 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 2,94 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 1,43 (s ancho, 9H).

20 Compuesto b: A una disolución del compuesto a obtenido antes en diclorometano (200 ml) se añadieron *N,N*-diisopropiletilamina (80,3 ml, 461 mmol) y cloruro de acetilo (21,9 ml, 307 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 5 horas. Se añadió disolución acuosa de HCl 1 N (100 ml) a la mezcla de reacción. Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. La recrystalización del producto bruto en éter dietílico dio 22 (51,5 g, 71,7% para 2 etapas) en forma de un sólido blanco.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,82 (s ancho, 1H), 7,54 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,38-7,24 (m, 1H), 7,28 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,08 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 3,91 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 2,98 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 2,34 (s, 3H), 1,42 (s ancho, 9H).

25 Compuesto 18: Una disolución del compuesto b (51,5 g, 110 mmol) en diclorometano (200 ml) a 0°C se trató con HCl 4 N en 1,4-dioxano (200 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. Después de 5 horas de agitación, la suspensión se concentró. El residuo se trituró con éter dietílico (500 ml). La filtración y lavado con diclorometano (500 ml) y éter dietílico (500 ml) dio el compuesto 18 (46,0 g, 82,5 mmol, 92,3%) en forma de un sólido blanco.

30 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,66 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 7,52 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 7,15 (s, 1H), 6,91 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 6,85 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 3,32 (t, 2H, J = 1 Hz), 2,95 (t, 2H, J = 7 Hz), 2,18 (s, 3H); LCMS calc. para C₁₈H₁₆F₃NO₄ (M+H⁺): 368, encontrado 368.

Compuesto 1: ácido 2-hidroxi-5-fenetilamino-benzoico.

Compuesto 19: ácido 5-[2-(2-cloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico

35 Los compuestos 3, 4, 6, 14 y 19 no forman parte de la invención.

Ejemplo 1. Efecto antiinflamatorio en células

1-1. Efecto de supresión en la producción de NO

40 Se evaluó el efecto inhibitor del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de acuerdo con la presente invención en el NO, factor inflamatorio que interviene en la reacción de inflamación. La línea celular de microglía BV2 se trató con lipopolisacárido (LPS), un material de toxina bacteriana que induce inflamación, con inclusión del presente

compuesto 10 uM, 30 uM o 100 uM. Después de 24 horas de incubación, se recogieron 50 ul de medio de cultivo en una placa de 96 pocillos. Después, se añadieron 50 ul de reactivo de Griess y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se evaluó mediante un lector de ELISA a 540 nm. Se calculó el valor de CI_{50} de cada compuesto y se muestra en la siguiente tabla 4 ("NO en BV").

5 Como se muestra en la siguiente tabla 4, los valores de CI_{50} del compuesto 9 y 14 eran 1,79 uM y 6,7 uM, respectivamente, que están en el nivel más alto. Cuando el efecto de inhibición de la producción de NO se evaluó como el valor de CI_{50} , la mayoría de los compuestos tenían valores menores que 100 uM. Como se muestra en los resultados, el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención se cree que es útil como agente antiinflamatorio porque el compuesto suprime la actividad del NO que interviene en la reacción de inflamación.

10 1-2. Efecto de supresión en la expresión génica

Se evaluaron los efectos de los derivados del ácido 2-hidroxibenzoico en la expresión génica de iNOS en la línea celular BV2. Se inocularon en una placa de 100 mm 1×10^6 células de la línea celular BV2, y se trataron tanto con LPS, material que induce inflamación, como con el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico 1~100 uM de la presente invención, juntos, en un intervalo de concentración normal. Después de 24 horas de incubación, se extrajo el ARN. El ARN extraído se usó en transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa, y se compararon los patrones de expresión de TNF-alfa, IL-1beta e iNOS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 4.

Como se muestra en la tabla 4, cuando se comparan las expresiones de genes de citoquinas inflamatorias con el control (tratamiento con LPS), la expresión del gen de TNFalfa disminuyó 63,24% con el compuesto 2, 77,05 % con el compuesto 8, y 61,67 % con el compuesto 9. Se evaluó que la expresión del gen de IL-1beta disminuyó 75,1% con el compuesto 2, 67,7% con el compuesto 5, y más de 50% con los compuestos 8, 9, 10 y 14. Además, los compuestos 2, 5, 8, 10, 15 y 17 suprimían la expresión del gen de iNOS en más de 50%.

Tabla 4

Compuesto N°	CI_{50} (uM)	% de Inhibición (en 100 uM)		
	NO en BV	TNF-alfa	IL-1beta	iNOS
1	182,99	ND	ND	ND
2	24,26	63,2	75,1	105,5
3	26,14	ND	ND	ND
4	6,25	ND	ND	ND
5	12,45	38,7	67,7	108,5
6	>100	ND	ND	ND
7	23,69	ND	ND	ND
8	63,25	77,1	56,9	113,8
9	1,79	61,7	76,7	17,8
10	20,67	ND	83,6	88,9
11	132,15	ND	ND	ND
12	18,62	ND	41,8	43,7
13	85,43	43	ND	15,5
14	6,7	38,9	80,4	44,3
15	20,34	37,4	35,1	86,2
16	51,78	ND	ND	ND
17	26,5	20,8	ND	111,1
18	21,63	ND	ND	ND

En la tabla 4, el término "ND" significa "no determinado".

25 1-3. Efecto de supresión en la producción de citoquinas

Se evaluaron los efectos de los derivados del ácido 2-hidroxibenzoico en la expresión de citoquinas en la línea celular BV2. Se inocularon en una placa de 24 pocillos 1×10^6 células de la línea celular BV2, y se trataron tanto con LPS, material que induce inflamación, como con muestra 100 uM (el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico o fármaco comparativo), juntos. Después de 24 horas de incubación, se recogió el medio de cultivo. Los niveles de las citoquinas, TNF-a e IL-6, se evaluaron por el método ELISA. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 5.

Como se muestra en la tabla 5, cuando se comparan con el control (tratamiento con LPS), el nivel de TNF- α producido por LPS disminuyó 62,26% con el compuesto 2, 31,90 % con el compuesto 3, y 62,6 % con el compuesto 14. Sin embargo, los fármacos comparativos (ibuprofeno y aspirina) no mostraron efecto de reducción a la misma concentración. De forma similar, el nivel de IL-6 aparentemente disminuyó con el compuesto, pero el nivel de IL-6 se redujo poco con el ibuprofeno y la aspirina.

Tabla 5

compuesto N°	TNF- α	IL-6
	% de Inhibición	% de Inhibición
2	62,26	70,31
3	31,90	33,06
4	18,71	ND
14	62,60	ND
Ibuprofeno	Sin efecto	Sin efecto
Aspirina	Sin efecto	22,18

En la tabla 5, el término "ND" significa "no determinado".

Ejemplo 2. Ensayo de toxicidad básico

5 Se evaluaron las toxicidades de una sola dosis de derivados del ácido 2-hidroxibenzoico. Los resultados se muestran en la figura 32.

10 Como se muestra en la figura 32, la DL₅₀ de los compuestos 2 y 18, ejemplos preferidos de la presente invención, era más de 3 g/kg, lo que significa que los compuestos tienen buena seguridad. El compuesto químico 19 tenía una DL₅₀ de 0,5-1 g/kg, es decir, el compuesto químico 19 mostraba una seguridad relativamente peor. Además, el compuesto 4 mostraba un efecto mucho mejor en el ensayo antiinflamatorio, etc., pero el compuesto 4 no mostraba un resultado dependiente de la dosis en el ensayo de toxicidad ya que el compuesto causaba la muerte repentina del ratón con 3 g/kg de dosis de ensayo. Los compuestos 3 y 14 tienen la estructura química similar al compuesto 2, y muestran efectos terapéuticos similares al compuesto 2 en el ensayo antiinflamatorio, pero los compuestos muestran toxicidad alta o toxicidad dependiente de la dosis.

Ejemplo 3. Ensayo de seguridad sobre la inducción de daño de la membrana de la mucosa gástrica

15 Los AINE convencionales tienen efectos secundarios que causan daños en la membrana de la mucosa gástrica. Por lo tanto, se evaluó si el compuesto 2 que tenía efecto antiinflamatorio causaba daño gástrico o no. Se administraron 30, 100 o 300 mg/kg de aspirina por vía oral como control. El compuesto 2 de la presente invención no causaba efectos secundarios gástricos incluso cuando se administraron por vía oral 1.000 mg/kg del compuesto 2. A partir de este resultado, se cree que el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención es muy seguro (figura 1).

20 Además, se evaluó la seguridad del compuesto 18 en comparación con la indometacina y el ibuprofeno (otros AINE) y celecoxib (un inhibidor selectivo de la COX-2). El compuesto 18 no causó daño en la membrana de la mucosa gástrica incluso con una dosis alta de administración oral (figura 2).

Ejemplo 4. Efecto de protección celular

25 Se evaluó el efecto de protección celular del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención. Se inoculó la línea celular AGS (células de cáncer gástrico humano, 1x10⁵ células) en placas de 96 pocillos. Después, se causó la muerte de membranas de la mucosa gástrica mediante 24 horas de tratamiento con Helicobacter (figura 3), 16 horas de tratamiento con sulindoc (figura 4), 8 horas de tratamiento con H₂O₂ (figura 5) o 24 horas de tratamiento con etanol (figura 6). Además, algunas de las líneas celulares AGS se trataron junto con el compuesto 2 10 uM, 30 uM o 100 uM. Las líneas celulares se incubaron durante 24 horas. Se añadió disolución de MTT a cada pocillo, y se incubaron 4 horas a 37°C. Después de esto, se analizó la absorbancia mediante el lector de ELISA a 540 nm, y se calculó la tasa de supervivencia de las células de las membranas de las mucosas gástricas. Como resultado, el compuesto 2, 1 uM y 10 uM, mostró más de 50% de efecto de protección celular, y el compuesto 2 100 uM mostró más de 70% de efecto de protección celular en la mayoría de modelos de muerte celular.

35 Como un marcador de la inflamación, se evaluó el nivel de ARNm de TNF- α por el método de RT-PCR. Se usaron muestras tratadas con etanol durante 24 horas. El compuesto 2 1~100 uM suprimió completamente la expresión del ARNm del TNF- α (figura 7).

40 A partir de estos resultados, se cree que el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención se usa eficazmente para suprimir la enfermedad inflamatoria, en particular, protegiendo las células y suprimiendo la inflamación en la gastritis causada por varias razones. Además, el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención mostraba mejor efecto que mucosta y PPI, que son conocidos como agentes terapéuticos para tratar la inflamación.

Ejemplo 5. Efecto protector sobre la hemorragia gastrointestinal

5-1. Gastritis inducida por alcohol y ácido clorhídrico

45 Se evaluó el efecto del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico en la gastritis inducida por alcohol y ácido clorhídrico. Ratas SD macho de 200~250 g se mantuvieron en ayunas durante 24 horas, y se les administró por vía oral EtOH al

5 60%/HCl 150 mM para inducir hemorragia gástrica (lesión gástrica). El compuesto 2 se administró por vía oral de acuerdo con la dosis indicada, 30 minutos antes de la hemorragia gástrica, y se sacó el estómago 90 minutos después de la hemorragia gástrica para evaluar el grado de lesión gástrica. Como resultado, el compuesto 2 protegía al estómago frente a la inducción de hemorragia gástrica, y no mostraba ninguna toxicidad. Los resultados se mostraban en la figura 8.

5-2. Gastritis alcohólica

10 Se evaluó el efecto del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico en la gastritis alcohólica. Ratas de 250 g se mantuvieron en ayunas durante 24 horas, y se les administró alcohol por vía oral para producir hemorragia gástrica (B). Algunas ratas se trataron previamente con el compuesto 2, 1 hora antes de la administración de alcohol, y las ratas mostraron hemorragia gástrica significativamente reducida (C). Los resultados cuantificados se mostraban en la figura 9 (D). A partir de estos resultados, se cree que el compuesto 2 de la presente invención tiene un efecto protector fuerte sobre la gastritis alcohólica.

15 Se sabe que el tratamiento de la gastritis alcohólica es más difícil que la gastritis causada por otras razones porque no es fácil tratarla incluso con inhibidor de la secreción del jugo gástrico o potenciador del factor de protección gástrico. Esto se debe a que el alcohol causa la enfermedad mediando directamente la toxicidad e inflamación, induciendo hemorragia, etc. Se cree que el compuesto 2 de la presente invención reduce significativamente este tipo de toxicidad directa del alcohol.

5-3. Gastritis causada por AINE

20 Se evaluó el efecto del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico en la gastritis inducida por AINE. El compuesto 2 mostró un excelente efecto protector en el estómago (B y D de la figura 10) tanto en el modelo de daño gástrico débil (A de la figura 10) inducido por 6 horas de administración de AINE (indometacina) como en el modelo de daño gástrico grave (C de la figura 10) inducido por 12 horas de administración de indometacina.

Ejemplo 6. Ensayo de eficacia en el modelo animal de artritis

6-1. Modelo de inflamación inducido por carragenina: evaluación del efecto analgésico

25 Se evaluó el efecto analgésico del compuesto 2, un ejemplo del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico, en el modelo de artritis. Se inyectó por vía intradérmica carragenina al 2% en la pata izquierda de las ratas, y se administraron 3-300 mg/kg del compuesto 2 por vía oral, para evaluar el efecto del compuesto 2 en la hiperalgesia térmica del modelo de artritis. Los resultados se mostraban en la figura 10.

30 El compuesto 2 disminuyó la hiperalgesia térmica de una forma dependiente de la dosis. 300 mg/kg del compuesto 2 redujeron la hiperalgesia térmica en más de 90%. Además, se mostró el nivel equivalente de efecto de disminución con 50 mg/kg de ibuprofeno, un agente antiinflamatorio conocido, en el grupo que tenía tratamiento con 100 mg de compuesto 2.

6-2. Modelo de inflamación inducido por zimosán: evaluación de citoquina

35 Se evaluó el efecto antiinflamatorio del compuesto 2 en el modelo de artritis con zimosán. Se administraron 0,5 ml de zimosán al 1% con bolsa de aire, y se administraron 3-300 mg/kg de compuesto 2 una vez por vía oral, 1 hora antes de la administración de zimosán. Se observó edema, un síntoma principal de la artritis, y el nivel de citoquina 4 horas más tarde. Como resultado, más de 30 mg/kg del compuesto 2 disminuyeron el nivel de TNF-alfa más que el control, y disminuyeron el nivel hasta 300 mg/kg de una forma dependiente de la dosis. Como ejemplo comparativo, se usó ibuprofeno (50 mg/kg), un fármaco antiinflamatorio bien conocido (figura 12). De forma similar, también disminuyó la IL-1alfa de una forma dependiente de la dosis (figura 13). A partir de estos resultados, se cree que el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención es útil para tratar la enfermedad inflamatoria, en particular la artritis.

6-3. Evaluación del modelo animal de artritis inducida por colágeno

45 Para evaluar la eficacia del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico, se usó el modelo de artritis inducida por colágeno (modelo animal de artritis reumatoide). Se mezcló colágeno bovino de tipo II con adyuvante completo de Freund para hacer una emulsión, y la emulsión se inyectó por vía intradérmica en el sitio de origen de la cola de ratones DBA/1LacJ de 8 ~ 10 semanas de edad. Se llevó a cabo un refuerzo intradérmico por el mismo método 2 semanas más tarde. Se inyectaron por vía intraperitoneal 25 mg/kg/día de los compuestos 2, 3 y 18, 1 mg/kg/semana de metotrexato (ejemplo comparativo) o 10% de vehículo (control) una semana después de la segunda inyección intradérmica de colágeno (figura 15). Se muestran imágenes del edema de la pata de rata normal (simulado), rata a la que se administró colágeno (colágeno) y rata a la que se administró el compuesto 18 (inyección de compuesto 18, 25 mg/kg/día) en la figura 14.

Además, se inyectaron por vía intraperitoneal 50 mg/kg/día de los compuestos 6 y 11, y 5 mg/kg/2 días de metotrexato (ejemplo comparativo). Se inyectó solución salina tamponada con fosfato como control (figura 16).

Durante 2 ~ 3 semanas, se observó cada día el grado de artritis, y el resultado se evaluó de acuerdo con el siguiente índice de artritis usando el edema. Como se muestra en los resultados del índice de artritis, los compuestos 2, 3 y 18, y los compuestos 6 y 11 mostraron un efecto de reducción evidente (figura 15 y 16).

- Índice de artritis -

5 Se evaluaron 4 patas desde 0 a 4 puntos, puntos totales: 16

0 puntos - pata normal

1 punto - edema leve y erupción limitada al hueso tarsal

2 puntos - edema leve y erupción que se extiende desde la articulación del tobillo al hueso tarsal

3 puntos - edema medio y erupción que se extiende desde la articulación del tobillo al hueso metatarsal

10 4 puntos - edema y erupción que se extiende desde la articulación del tobillo a todos los dedos

Ejemplo 7. Ensayo de eficacia en el modelo animal de enfermedad intestinal inflamatoria

15 Se usó el modelo de dextrano-sulfato sódico al 5% (DSS) como modelo animal de enfermedad intestinal inflamatoria. Se administró por vía oral DSS al 5% mezclado con agua. El modelo de DSS al 5% produce daño en las células epiteliales y en el modelo se observa principalmente úlcera en el colon izquierdo y la disminución de la longitud del colon. Este modelo es sencillo y reproducible, y puede regular el grado de inflamación según la dosis. Por lo tanto, este modelo se usa a menudo para evaluar candidatos a fármacos.

El DSS se administra de forma continua en la botella de agua. El derivado del ácido 2-hidroxibenzoico se suspendió en vehículo al 10%, y se administró por vía oral.

20 La administración de DSS cambiaba la longitud y anchura del colon. El tratamiento con el compuesto 18 cambió significativamente la longitud y anchura del colon (figura 17, 18 y 19). Este resultado significa que el compuesto de la presente invención tiene efecto protector en este modelo de colitis.

Además, se evaluaron los excrementos con sangre, diarrea y el grado de suciedad todos los días como estado de las heces. Tanto la sulfasalazina como el compuesto 18 disminuyeron significativamente la puntuación de las heces comparado con el grupo tratado solo con DSS (figura 20).

25 Ejemplo 8. Ensayo de eficacia en el modelo animal de pancreatitis aguda

30 Se usó el modelo de pancreatitis inducida por ceruleína como modelo de pancreatitis aguda. La ceruleína es un análogo de la colecistoquinina y una hormona que produce la secreción de enzimas digestivas pancreáticas en el páncreas. Se produjo un exceso de secreción de enzimas digestivas en el páncreas por inyección intraperitoneal de ceruleína (50 ug/kg). Se inyectó LPS 2 horas más tarde para inducir edema. Cuando se administró ceruleína, se observó edema masivo en la base del bazo. Además, cuando se administraron 25 mg/kg del compuesto 18, el edema disminuyó (figura 21). En la figura 21 D es el resultado que muestra el mayor peso del páncreas por el edema. El grupo tratado con compuesto 18 tenía un peso de páncreas significativamente reducido.

35 La figura 22 muestra los niveles de amilasa y lipasa, enzimas digestivas pancreáticas, en el plasma. En el modelo las enzimas digestivas aumentan excesivamente, y son liberadas en la sangre. Es decir, la disminución de la enzima digestiva en la sangre puede ser una prueba indirecta de que la muestra reduce la pancreatitis. Como se muestra en la figura 22, la amilasa y lipasa aumentaron en la sangre del modelo animal de pancreatitis, y la administración de 25 mg/kg de compuesto 18 disminuyó significativamente el aumento.

40 Para confirmar el efecto protector en la inflamación, se evaluaron los niveles de TNF- α e IL-1 β , citoquinas inflamatorias. PGE₂, el producto de la COX-2 (enzima de inflamación), se evaluaron por el método ELISA. El TNF- α , IL-1 β y PGE₂ aumentaron en exceso en el modelo de pancreatitis, y el compuesto 18 redujo significativamente estos marcadores de inflamación (figuras 23 y 24).

Ejemplo 9. Ensayo de eficacia del compuesto 2 en ratones con demencia transgénicos dobles APP_{swe}/PS1_{deltaE9}

(Ejemplo de referencia)

9-1. Evaluación de la reducción de citoquinas por el método ELISA

45 Ratones con demencia transgénicos APP/PS1 se alimentaron con comida que contenía 25 mg/kg/día de compuesto 2 o 62,5 mg/kg/día de ibuprofeno, durante 7 meses antes de ser sacrificados (3,5 ~ 10,5 meses). Después de la administración del fármaco durante 7 meses, se cuantificaron los niveles de TNF- α , IL-1 β , e IL-6 por ELISA (media \pm EEM, n=3-5). *, Diferencia significativa del control (ratón APP/PS1 alimentado solo con comida general), $p < 0,05$ usando ANOVA de una vía de acuerdo con la prueba de Student-Neuman-Keuls.

Como resultado, el tratamiento con el compuesto 2 redujo significativamente los niveles de TNF- α , IL-1 β , e IL-6 comparado con ratones APP/PS1 alimentados con comida general solo (figura 25).

9-2. Efecto protector del compuesto 2 en la barrera hematoencefálica

5 El daño de los vasos sanguíneos cerebrales es bien conocido en la enfermedad de Alzheimer. Se evaluaron los efectos protectores del compuesto 2 y el ibuprofeno (ejemplo comparativo) en el daño de la barrera hematoencefálica. Se administraron 3 ml/g de colorante azul de Evans al 2% en los vasos sanguíneos de ratones con demencia APP/PS1 de 5 meses de edad. Se les proporcionó comida que contenía 25 mg/kg/día de compuesto 2 o 62,5 mg/kg/día de ibuprofeno desde los 2 meses a los 5 meses de edad. Como resultado, como se muestra en la figura 26 en B y F, la permeabilidad del colorante azul de Evans aumentó en la corteza, hipocampo y tálamo, comparado con el ratón normal. Además, como se muestra en la figura 26, los efectos protectores en la barrera hematoencefálica se mostraron en el grupo tratado con compuesto 2 (C y G de la figura 26) y el grupo tratado con ibuprofeno (D y H de la figura 26).

9-3. Evaluación de la reducción por el compuesto 2 de la placa amiloide por análisis de tinción con tioflavina-S

15 Se evaluó el efecto del derivado del ácido 2-hidroxibenzoico en la demencia con el análisis de tinción con tioflavina-S. El tratamiento con 25 mg/kg/día de compuesto 2 durante 7 meses (de 3,5 a 10,5 meses de edad, APP/PS1) produjo una reducción significativa de 53% de la carga de placa amiloide comparado con el ratón con demencia APP/PS1 alimentado solo con comida general (figura 27). Además, el tratamiento con 25 mg/kg/día de compuesto 2 durante 4 meses (de 8,5 a 12,5 meses de edad, APP/PS1) produjo una reducción significativa de 49,3% de la carga de placa amiloide comparado con el ratón con demencia APP/PS1 alimentado solo con comida general.

20 9-4. Mejora del comportamiento por el compuesto 2 en la prueba del laberinto en cruz elevado

25 Los ratones transgénicos APP/PS1 se alimentaron con comida solo o comida que contenía 25 mg/kg/día de compuesto 2, durante 7 meses (3,5 ~ 10,5 meses). Después de la administración de 7 meses, se llevó a cabo la prueba del laberinto en cruz elevado para evaluar la mejora del comportamiento. El laberinto en cruz elevado tenía dos brazos abiertos (30 cm x 6 cm x 0,5 cm) y dos brazos cerrados (30 cm x 6 cm x 15 cm) y también tenía una plataforma central de 6 cm x 6 cm. En la prueba del laberinto en cruz elevado, el ratón se dejó con cuidado en el centro con la cabeza del ratón hacia el brazo abierto. Se registró durante 5 minutos el tiempo que el ratón estaba en el brazo abierto (media \pm EEM, n=3-5). *, Diferencia significativa del control (ratón APP/PS1 alimentado solo con comida general), $p < 0,05$ usando ANOVA de una vía de acuerdo con la prueba de Student-Neuman-Keuls.

30 Como resultado, el grupo tratado con 25 mg/kg/día de compuesto 2 durante 7 meses disminuyó el tiempo que el ratón permanecía en el brazo abierto en comparación con el grupo al que se proporcionó solo comida (figura 28).

Ejemplo 10. Ensayo de eficacia del compuesto 2 en el modelo animal de ELA de G93A

(Ejemplo de referencia)

10-1. Reducción de la activación de la microglía

35 Se usó el ratón transgénico G93A (Glicina \Rightarrow Alanina) que tiene características fisiopatológicas similares al paciente con ELA (esclerosis lateral amiotrófica), para evaluar el efecto terapéutico del fármaco en la ELA, una de las principales enfermedades cerebrales degenerativas.

40 El grado de activación de la microglía (un marcador de la inflamación en el modelo de enfermedad cerebral) expresado en el asta ventral lumbar del ratón G93A se evaluó con colorante lectina de tomate. En el ratón G93A la microglía estaba más activada comparada con el ratón de tipo natural. Además, el tratamiento con 5 mg/kg/día de compuesto 2 disminuyó el número y grado de activación de la microglía (figura 29).

10-2. Reducción de la expresión de citoquinas

45 Se extrajeron segmentos lumbares de ratones G93A de 16 semanas de edad alimentados con comida general solo, y de ratones G93A de 16 semanas de edad alimentados con comida que contenía 5 mg/kg/día de compuesto 2, y se separaron sus ARN. Los grados de expresión de TNF- α e IL-1 β , citoquinas inflamatorias, se evaluaron por RT-PCR. Como resultado, la administración de compuesto 2 redujo eficazmente las citoquinas inflamatorias (figura 30).

Ejemplo 12. Ensayo de eficacia del compuesto 2 en el modelo animal de enfermedad de Parkinson

(Ejemplo de referencia)

50 Se inyectó MPTP (40 mg/kg) por vía subcutánea a ratones C57/BL6 (macho/8 semanas de edad). A algunos de los ratones se les administró 50 mg/kg de compuesto 2 por inyección intraperitoneal 30 minutos antes de la inyección de MPTP cada día. Dos días después, se extrajo el tejido cerebral y se inmunotizó con CD11b. Después de reacción, se usó DAB (diaminobencidina) para el cromógrafo, y después se evaluó el grado de activación de la microglía (un marcador de la inflamación en el modelo de enfermedad cerebral) con microscopio óptico (figura 31)

Como resultado, la actividad de la microglía causada por MPTP disminuyó por la administración del compuesto 2.

Se describen a continuación las enfermedades concretas en las que se puede aplicar el compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de la presente invención.

Ejemplo de aplicación 1. Gastritis

5 El derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención suprimía eficazmente la muerte celular, en experimentos que usaban células cultivadas, inducida por alcohol, *Helicobacter Pylori*, AINE y H₂O₂. El compuesto de la presente invención mostraba mejor efecto que mucosta o PPI, fármacos conocidos que tienen efecto de protección celular en la gastritis. Además, el compuesto de la presente invención mostraba efecto terapéutico superior en la gastritis inducida por alcohol en el modelo animal, y aliviaba la gastritis inducida por AINE. El
10 compuesto de la presente invención también mostraba una buena seguridad en el experimento comparativo que usaba aspirina, porque el compuesto no producía ninguna hemorragia gástrica incluso con una dosis mucho mayor que la de la aspirina. Por lo tanto, se cree que el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención es útil para tratar o prevenir la gastritis.

Ejemplo de aplicación 2. Enfermedad intestinal inflamatoria (EII)

15 Se sabe que las prostaglandinas (el producto de la ciclooxigenasa (COX)) y los leucotrienos (el producto de la lipooxigenasa) tienen una función importante en la inflamación de enfermedades inflamatorias como el colon ulceroso. El zileuton, un inhibidor de la 5-lipooxigenasa (5-LOX) y la sulfasalazina disminuían la actividad de la MPO (mieloperoxidasa) que se usa como un marcador que muestra el grado de inflamación en el modelo animal de daño intestinal (Singh VP et al., *Indian J Exp Biol.* 2004; 42 (7):667-73). Además, la nimesulida (un inhibidor selectivo de la
20 COX-2) mostraba efecto protector en dos modelos animales de daño intestinal (EII inducida por ácido acético e III inducida por LTB₄). La nimesulida suprimía en exceso la actividad de la MPO en la reacción inflamatoria (Singh VP et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2003;71(3-4):163-75). Por lo tanto, el compuesto de la presente invención que tiene efecto antiinflamatorio se puede usar eficazmente para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria.

Ejemplo de aplicación 3. Artritis reumatoide

25 El derivado del ácido 2-hidroxibenzoico de la presente invención mostraba efecto terapéutico similar o superior en el modelo de artritis inducida por colágeno comparado con el metotrexato (control), que se usa para el tratamiento de la artritis, pero tiene efectos adversos. Además, el compuesto de la presente invención aliviaba el dolor de la hiperalgesia inducida por carragenina y suprimía la producción de citoquinas inflamatorias inducida por zimosán. Por lo tanto, el compuesto de la presente invención que tiene eficacia similar a los agentes antiinflamatorios conocidos y
30 buena seguridad, se puede usar como agente terapéutico para la artritis.

Ejemplo de aplicación 4. Pancreatitis

La pancreatitis aguda es una inflamación relacionada con la autodigestión del páncreas causada por el reflujo de enzimas digestivas del jugo pancreático o bilis de coledoclitiasis en el páncreas. La pancreatitis muestra diferentes síntomas como desde edema leve a hemorragia grave, que causa varios daños al páncreas. Hay muchas evidencias
35 que muestran que la pancreatitis está relacionada con la inflamación, y se ha descrito que el inhibidor de COX tiene un efecto protector en el modelo de pancreatitis y suprime la producción de marcadores inflamatorios, TNF- α y prostaglandinas. (Song AM et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(5):G1166-74). Por lo tanto, el compuesto de la presente invención se puede usar eficazmente para tratar la pancreatitis.

Ejemplo de aplicación 5. Inflamación y dolor diabéticos

40 Las funciones de la inflamación y el dolor se están volviendo importantes en la diabetes tipo II. Hay mucha bibliografía que describe que muchos fármacos que tienen efecto antiinflamatorio reducen signos de diabetes tipo II o retrasan la aparición de la diabetes tipo II (Deans KA et al., *Diabetes Technol Ther.* 2006; 8(1) :18-27). La lisofilina, un compuesto antiinflamatorio, reducía los síntomas diabéticos en 50% en ratones a los que se administraba estreptozotocina suprimiendo el IFN-gamma y el TNF-alfa (Yang Z et al., *Pancreas.* 2003 ;26(4):e99-104). Por lo tanto, el compuesto de la presente invención que tiene efecto antiinflamatorio se puede usar eficazmente para tratar
45 o prevenir la inflamación y dolor diabéticos.

Ejemplo de aplicación 6. Arteriosclerosis

En la formación temprana de la lesión aterosclerótica en el ratón deficiente en apolipoproteína E (apoE(-/-)), el inhibidor selectivo de COX-2 (por ejemplo, rofecoxib y NS-398) y el inhibidor no selectivo de COX (por ejemplo, indometacina) reducían la aterosclerosis en aproximadamente 35-38% y aproximadamente 38-51%, respectivamente (Burleigh ME *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Sep;39 (3) :443-52). Por lo tanto, el compuesto de la presente invención que tiene efecto antiinflamatorio se puede usar eficazmente para tratar la arteriosclerosis.

Ejemplo de aplicación 7. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia de aparición en el adulto. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de ovillos neurofibrilares, placas amiloides y muerte neuronal grave.

5 También hay mucha bibliografía que muestra que la enfermedad de Alzheimer está relacionada con la inflamación. Ha menudo se ha descrito que la microglía y las citoquinas inflamatorias aumentaban en el modelo animal de demencia (Minghetti L. *Current Opinion in Neurology* 2005, 18:315-321), y que una administración de fármaco que inhibe la inflamación puede tener un efecto protector en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (Townsend KP y Pratico D. *FASEB J.* 2005; 19(12): 1592-601).

Por lo tanto, el compuesto de la presente invención que tiene efecto de protección celular y efecto antiinflamatorio se puede usar eficazmente para tratar la enfermedad de Alzheimer, pero no forma parte de la invención reivindicada.

10 Ejemplo de aplicación 8. ELA

La enfermedad de Lou Gehrig se denomina esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de las neuronas motoras, y la degeneración progresiva de las neuronas motoras es la característica patológica de esta enfermedad.

15 Hay mucha bibliografía que muestra que la ELA está relacionada con la inflamación. Se ha descrito con frecuencia que la microglía y las citoquinas inflamatorias aumentaban en ratones G93A, modelo animal de ELA (Weydt P y Moller T. *Neuroreport.* 2005, 25; 16(6): 527-31), y una administración de fármaco que inhiba la inflamación puede tener un efecto protector en modelos animales de ELA (West M et al., *J Neurochem.* 2004; 91(1): 133-43).

Por lo tanto, el compuesto de la presente invención se puede usar de forma eficaz para tratar la ELA, pero no forma parte de la invención reivindicada.

Ejemplo de aplicación 9. Enfermedad de Parkinson

20 La enfermedad de Parkinson (EP), el trastorno del movimiento prototípico, se caracteriza por temblor, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural clínicamente caracterizados y patológicamente diagnosticada por una muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra.

25 Hay mucha bibliografía que muestra que la enfermedad de Parkinson está relacionada con la inflamación. Se ha descrito con frecuencia que la microglía y las citoquinas inflamatorias aumentaban en la enfermedad de Parkinson (Gao HM, *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24(8): 395-401; Minghetti L. *Curr Opin Neurol.* 2005;18(3):315-21), y una administración de fármaco que inhiba la inflamación puede tener un efecto protector en modelos animales de enfermedad de Parkinson (Gao HM, *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24(8): 395-401).

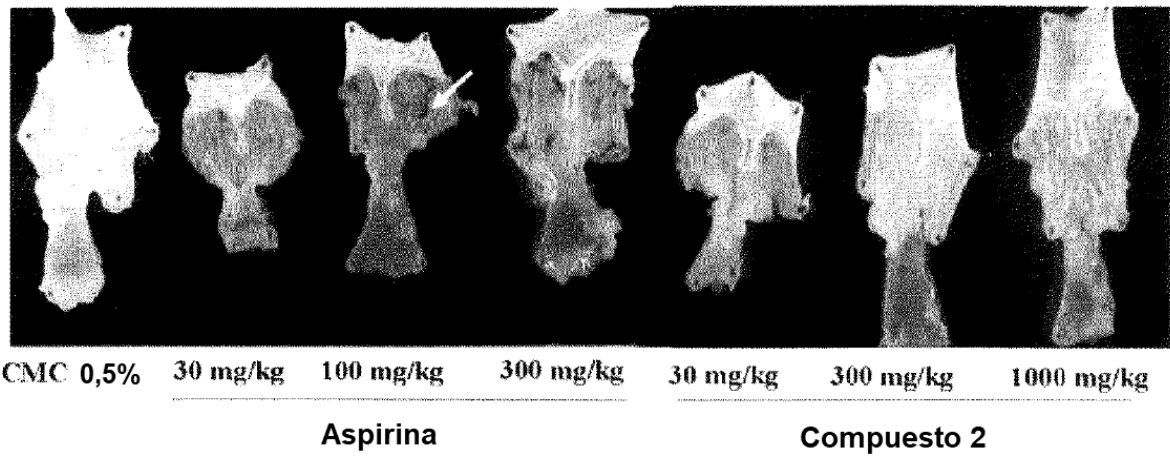
Por lo tanto, el compuesto de la presente invención que tiene efecto de protección celular y efecto antiinflamatorio se puede usar eficazmente para tratar la enfermedad de Parkinson, pero no forma parte de la invención reivindicada.

30

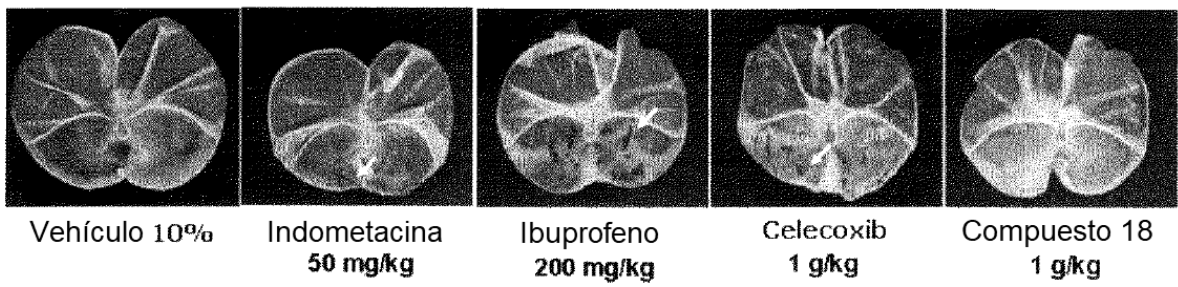
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende derivado del ácido 2-hidroxibenzoico o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-hidroxi-5-fenetilamino-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(2-nitro-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-difluoro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(4-fluoro-2-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(2-fluoro-4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-metoxi-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(2-o-tolil-etilamino)-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-fenil-propilamino)-benzoico, ácido 5-[3-(4-fluoro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[3-(3,4-dicloro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-p-tolil-propilamino)-benzoico y ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, para usar en el tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en gastritis, colitis, pancreatitis, artritis, inflamación y dolor diabéticos, arteriosclerosis, nefritis, hepatitis, enfermedad intestinal inflamatoria, úlcera gástrica e hiperalgesia asociada con artritis o artritis reumatoide.
2. Uso de un derivado del ácido 2-hidroxibenzoico o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde el derivado del ácido 2-hidroxibenzoico es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en ácido 2-hidroxi-5-fenetilamino-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(2-nitro-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-difluoro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(3,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(4-fluoro-2-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[2-(2-fluoro-4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-[2-(4-metoxi-fenil)-etilamino]-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(2-o-tolil-etilamino)-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-fenil-propilamino)-benzoico, ácido 5-[3-(4-fluoro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 5-[3-(3,4-dicloro-fenil)-propilamino]-2-hidroxi-benzoico, ácido 2-hidroxi-5-(3-p-tolil-propilamino)-benzoico y ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en gastritis, colitis, pancreatitis, artritis, inflamación y dolor diabéticos, arteriosclerosis, nefritis, hepatitis, enfermedad intestinal inflamatoria, úlcera gástrica e hiperalgesia asociada con artritis o artritis reumatoide.
3. Ácido 2-acetoxi-5-[2-(4-trifluorometil-fenil)-etilamino]-benzoico y sus sales farmacéuticamente aceptables.

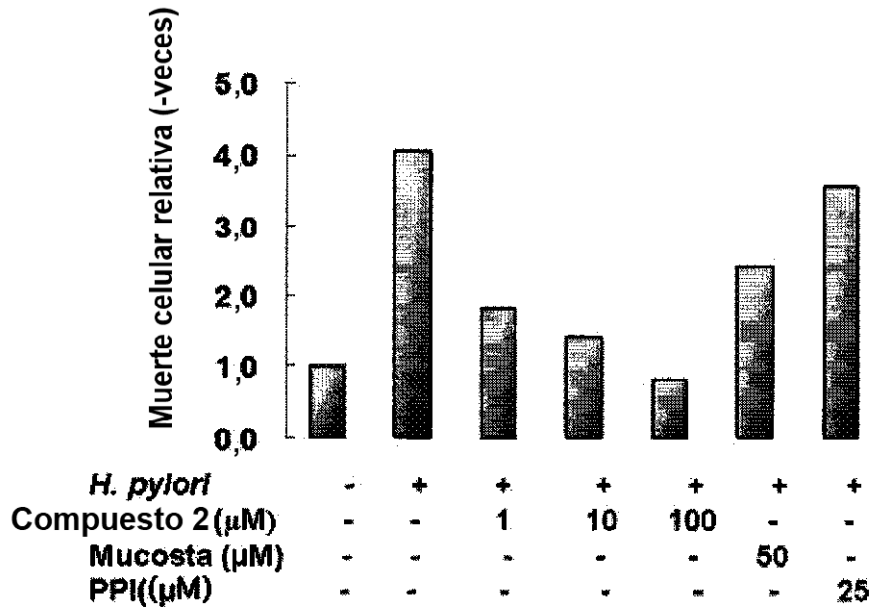
[Fig. 1]



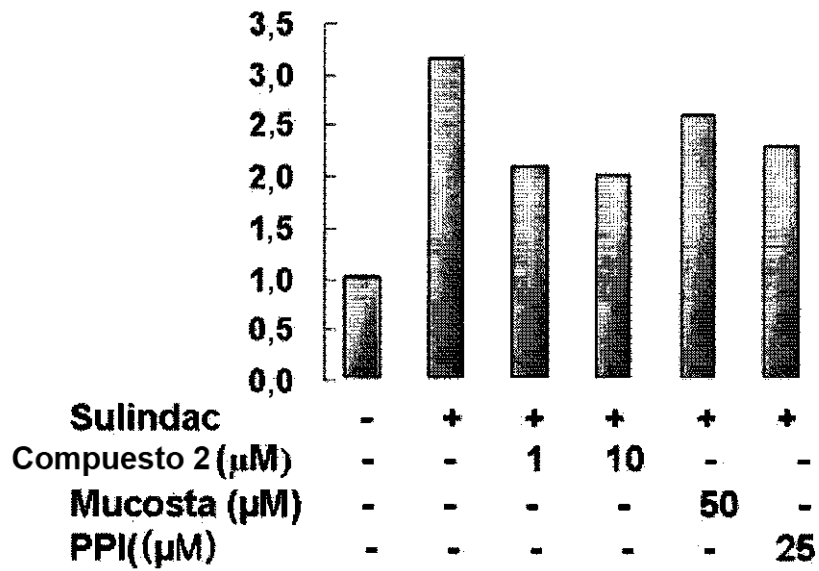
[Fig. 2]



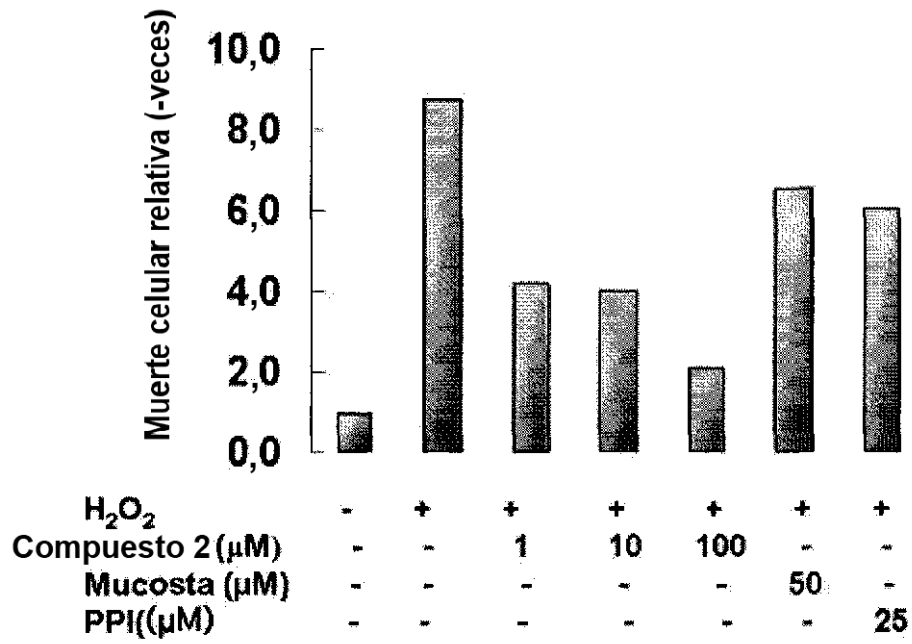
[Fig. 3]



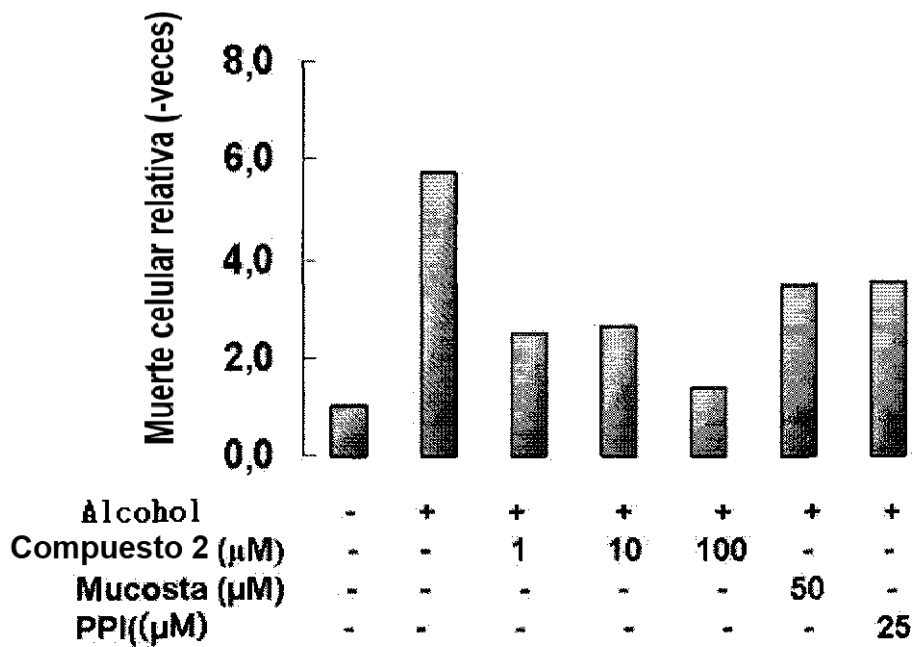
[Fig. 4]



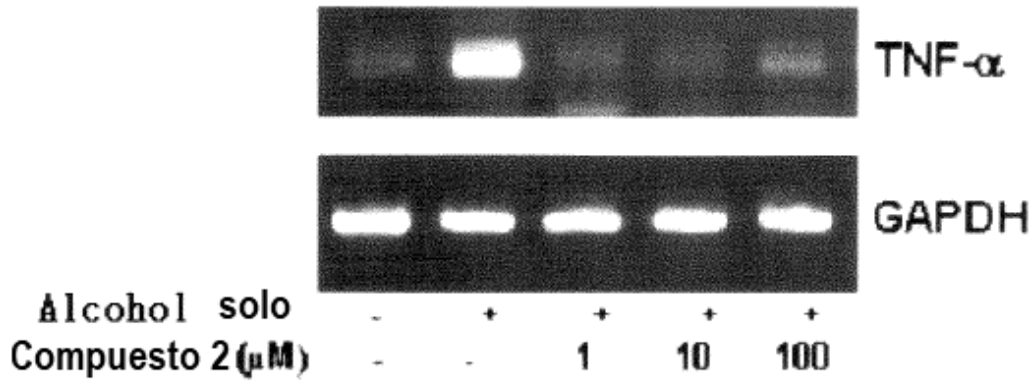
[Fig. 5]



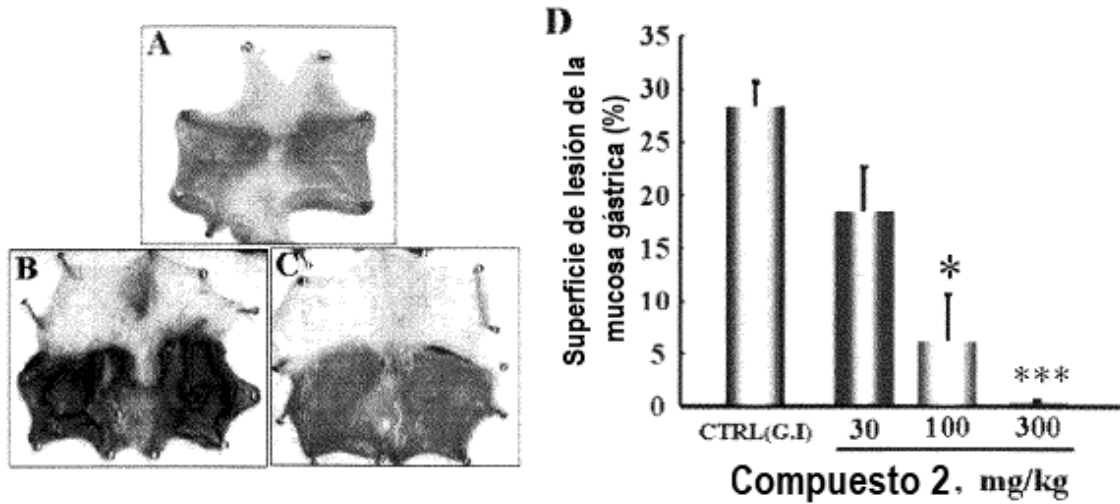
[Fig. 6]



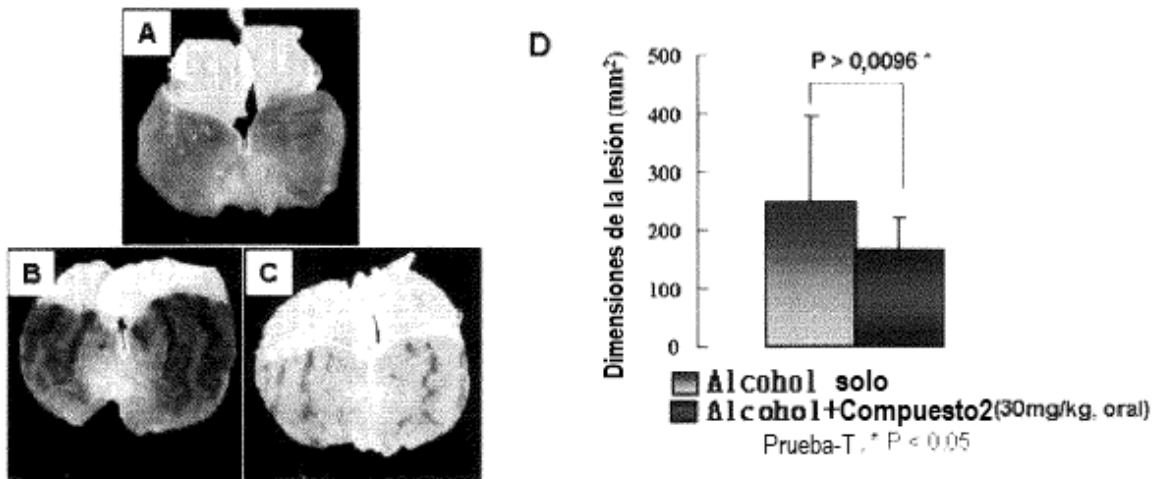
[Fig. 7]



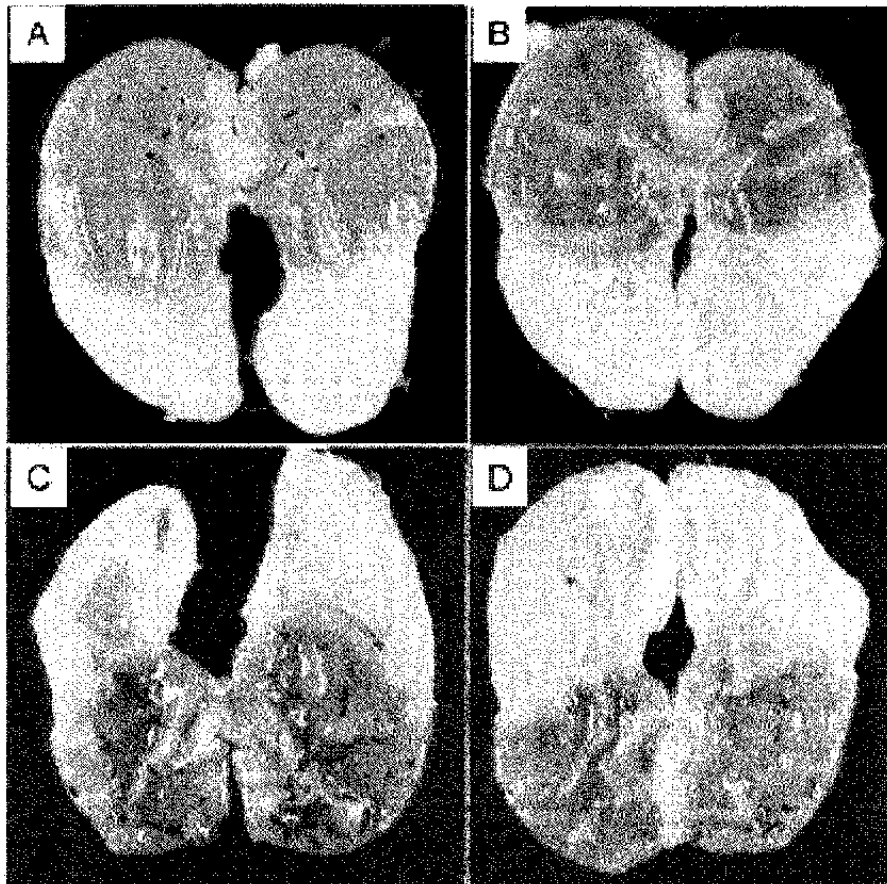
[Fig. 8]



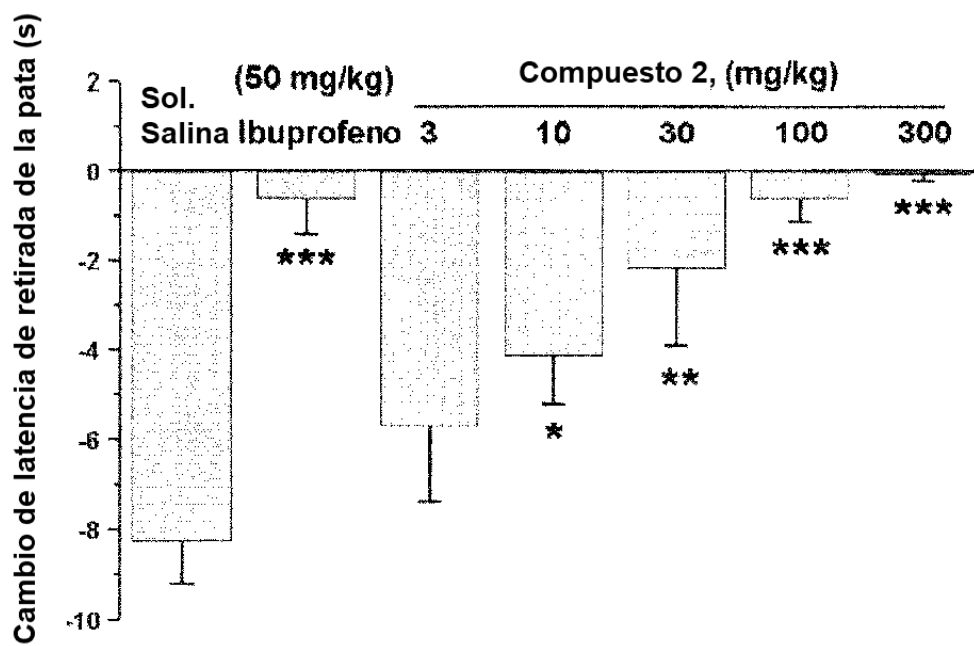
[Fig. 9]



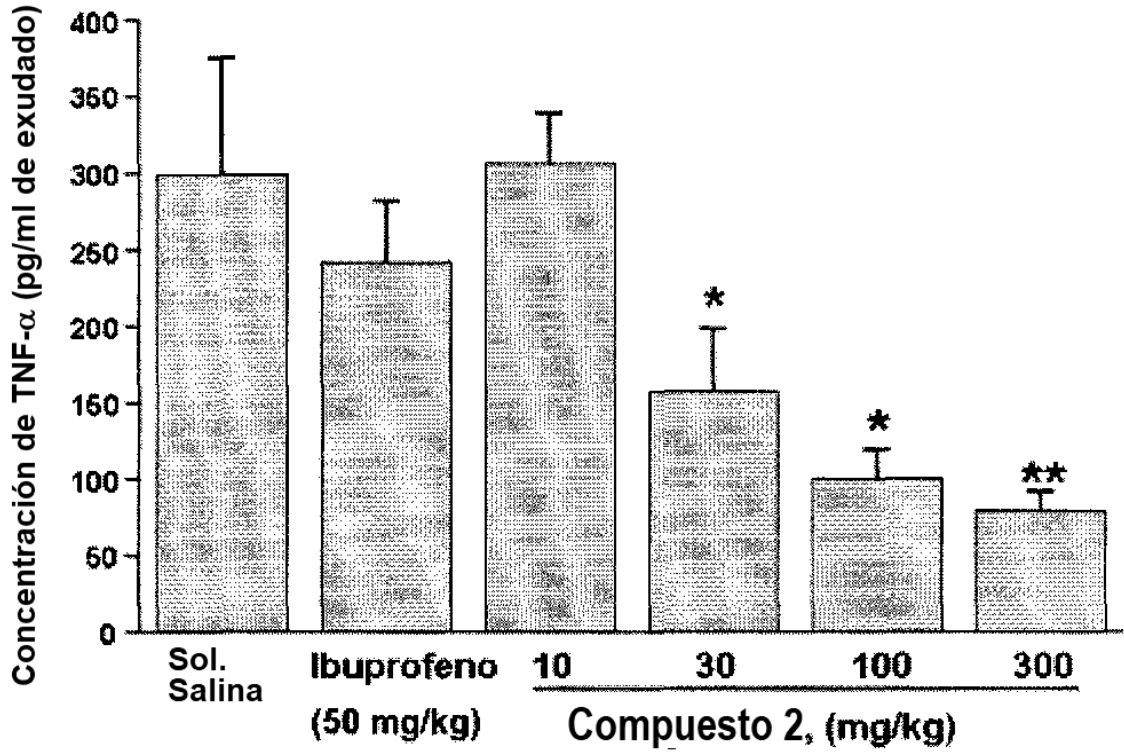
[Fig. 10]



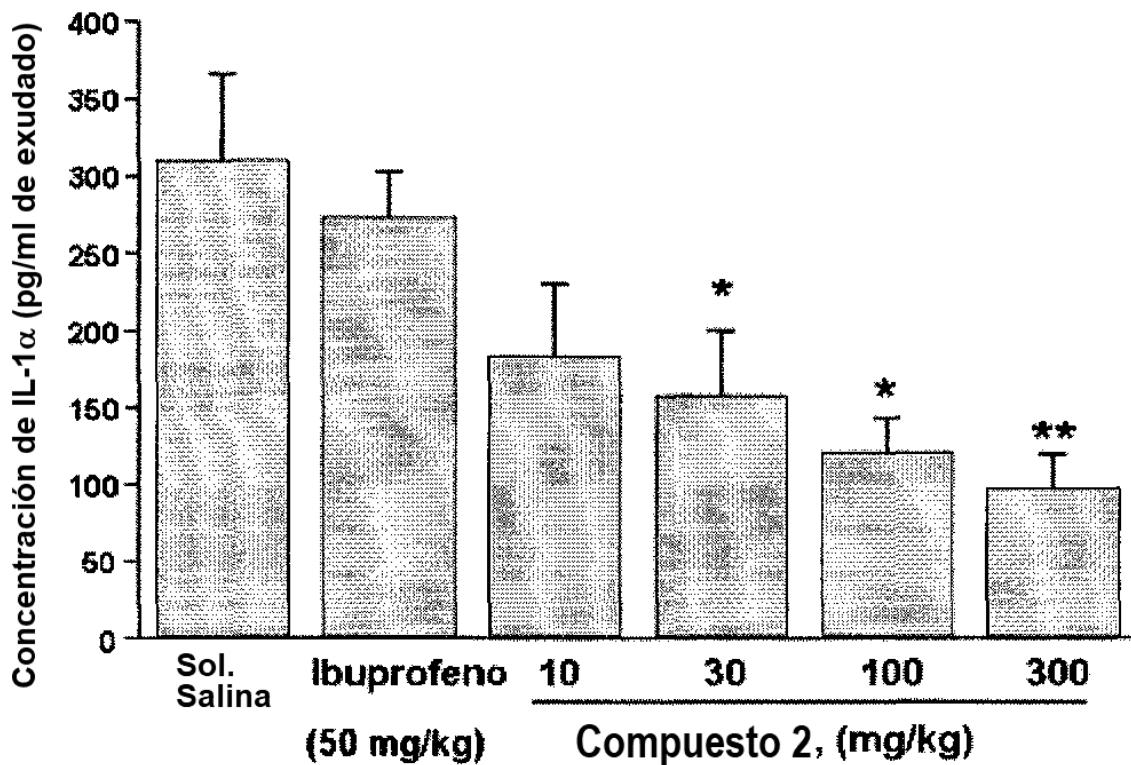
[Fig. 11]



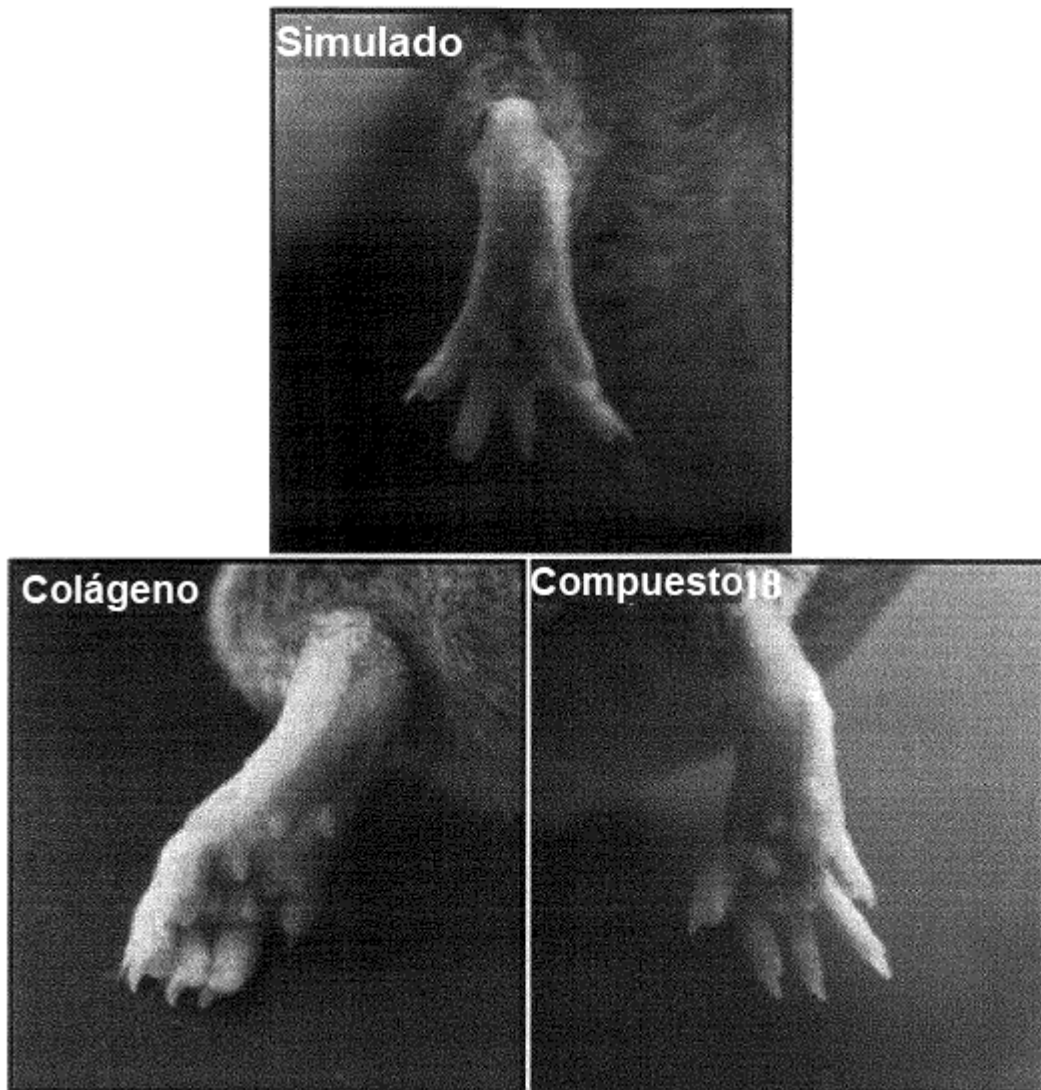
[Fig. 12]



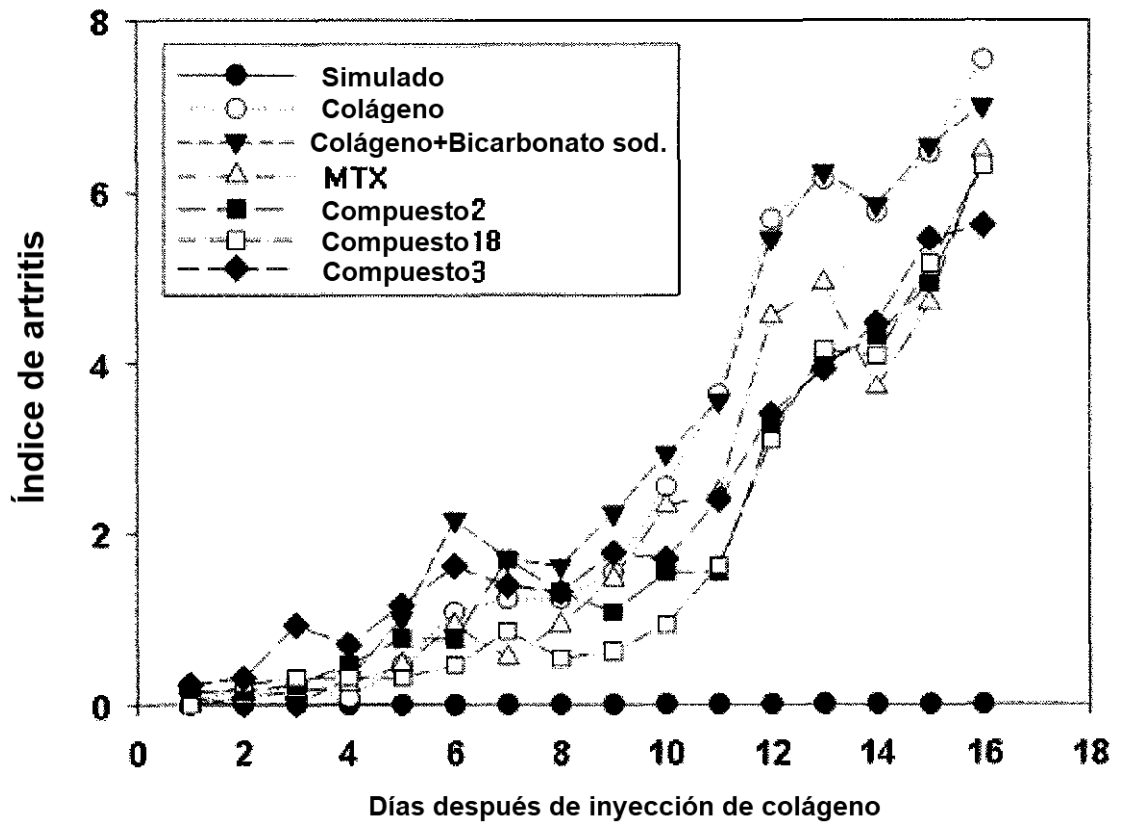
[Fig. 13]



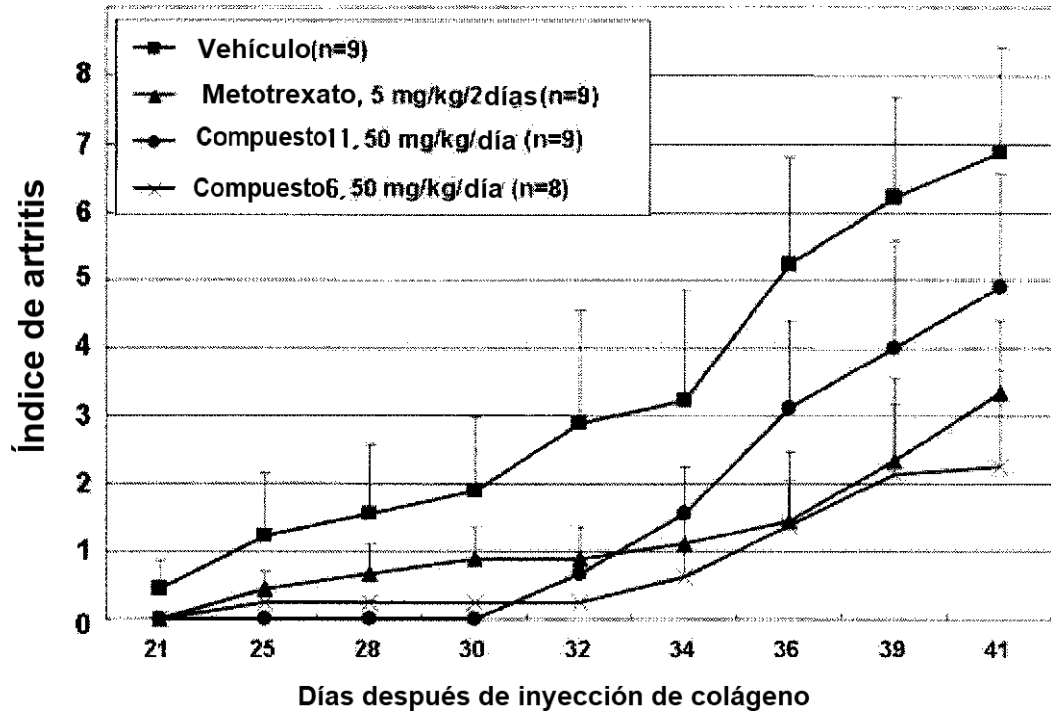
[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]

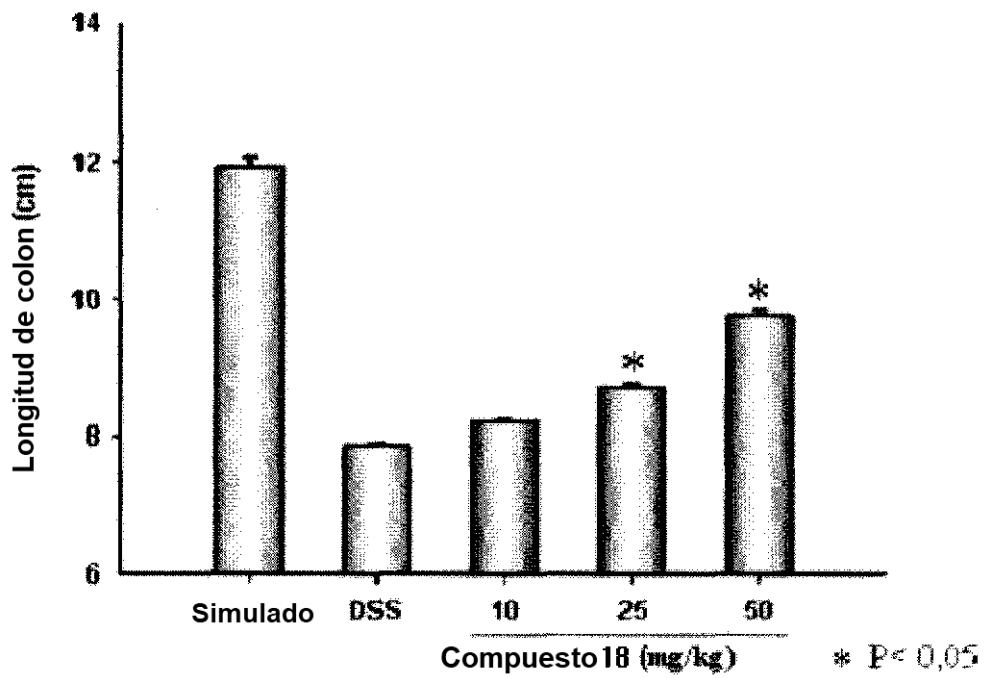


[Fig. 17]

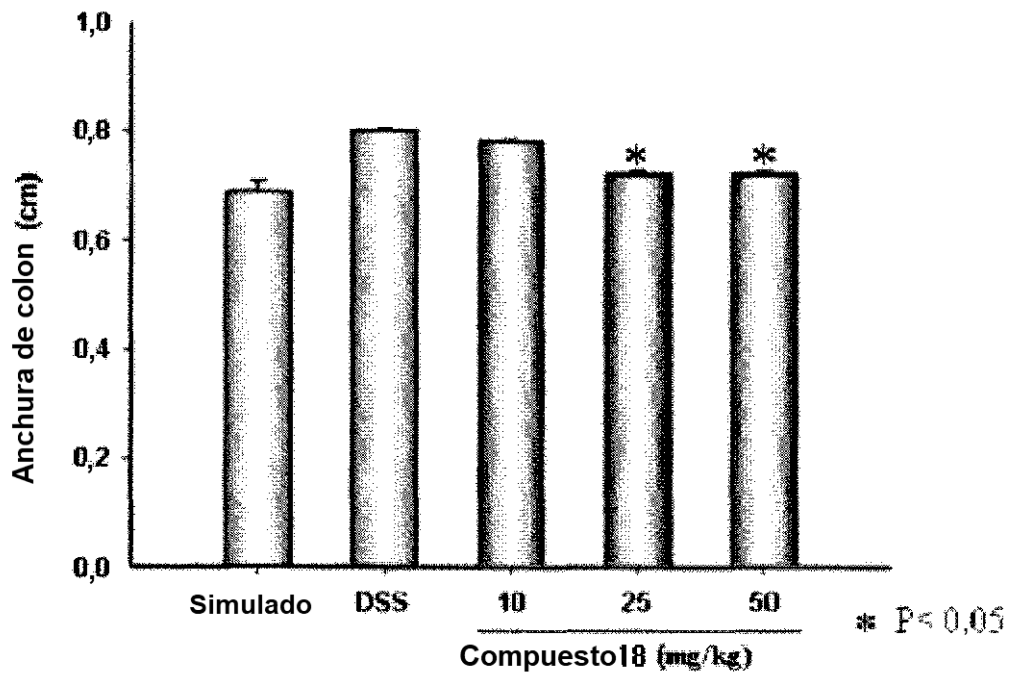


Simulado DSS 10 25 50
Compuesto 18 (mg/kg)

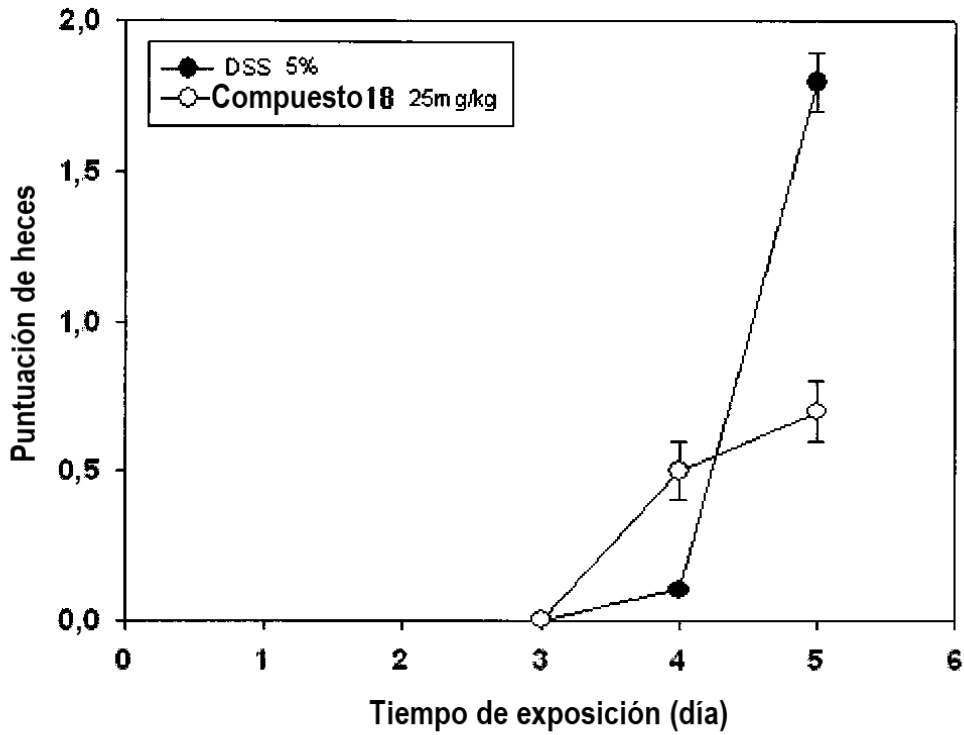
[Fig. 18]



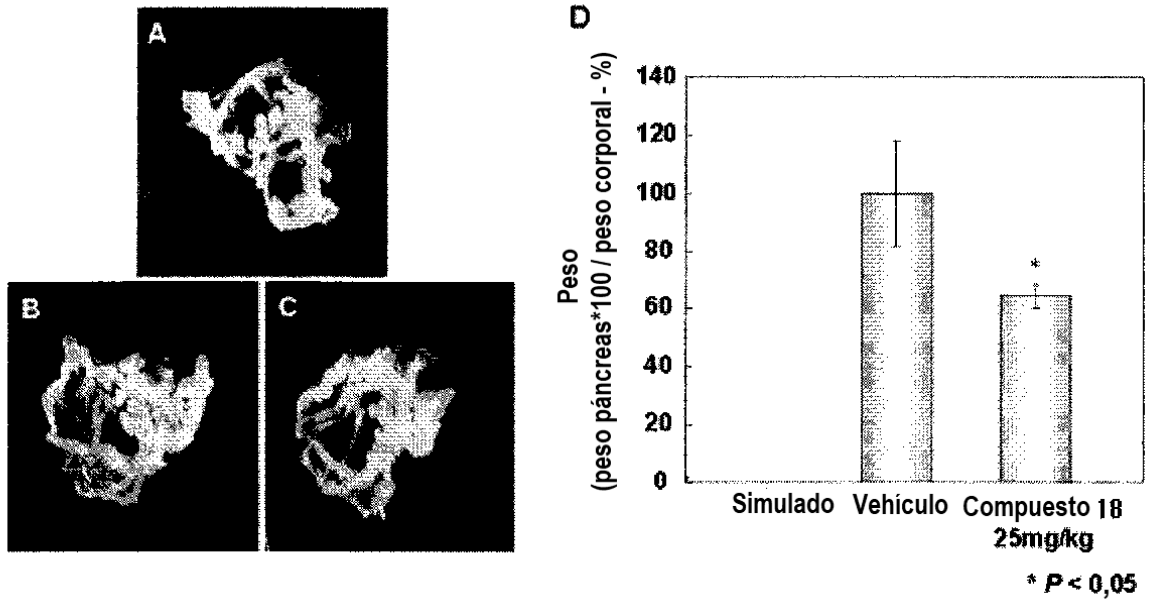
[Fig. 19]



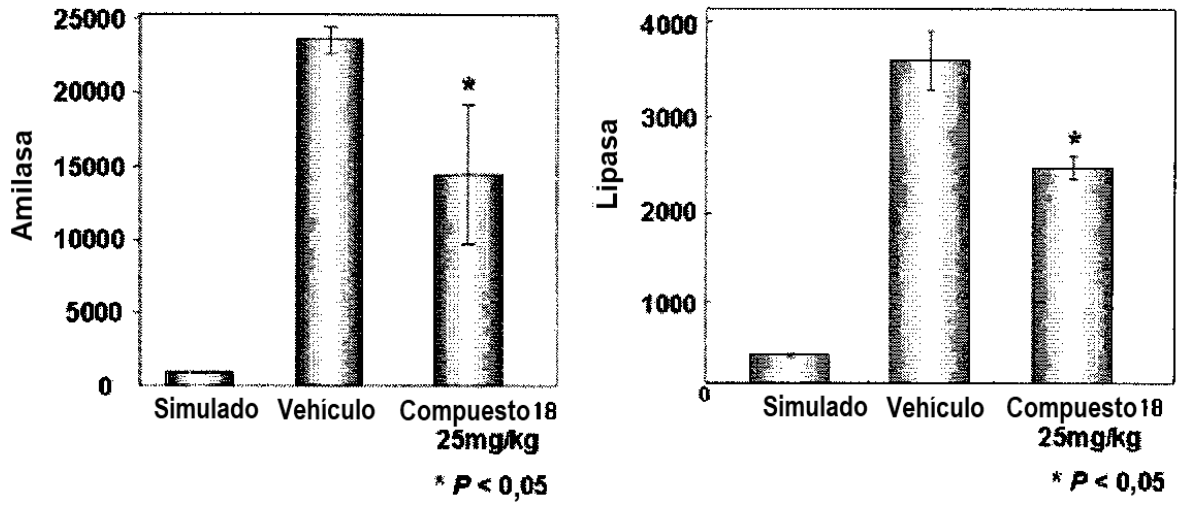
[Fig. 20]



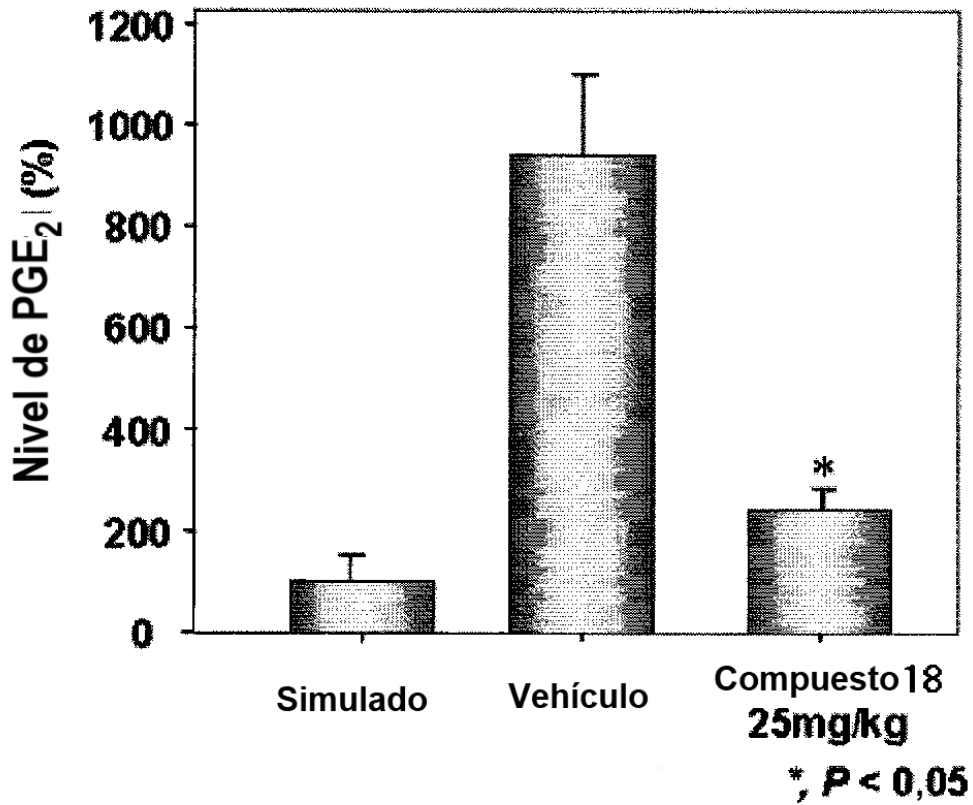
[Fig. 21]



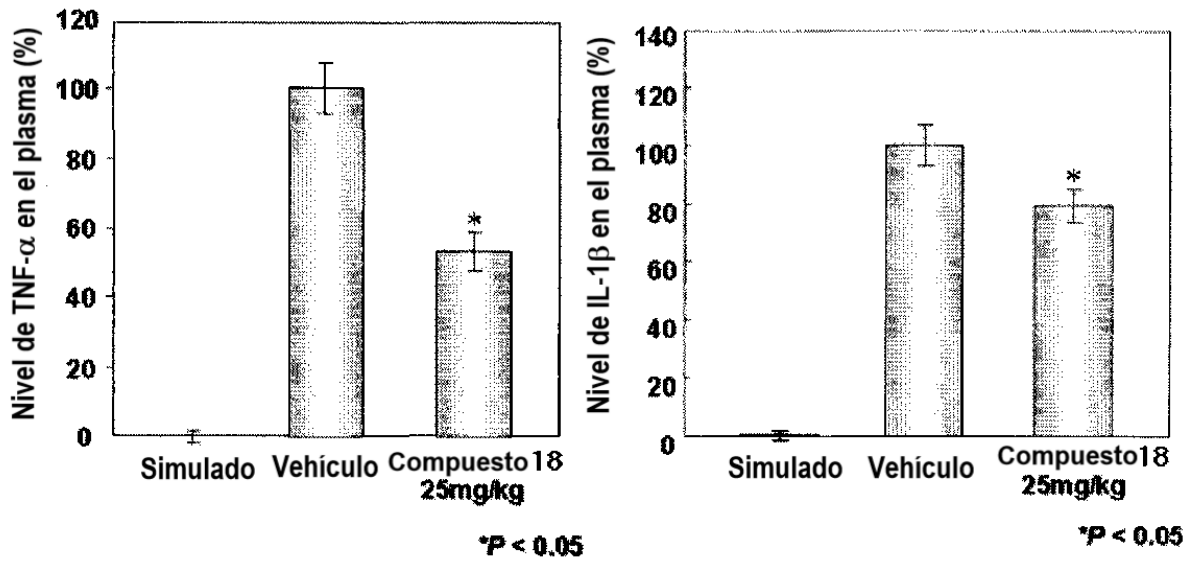
[Fig. 22]



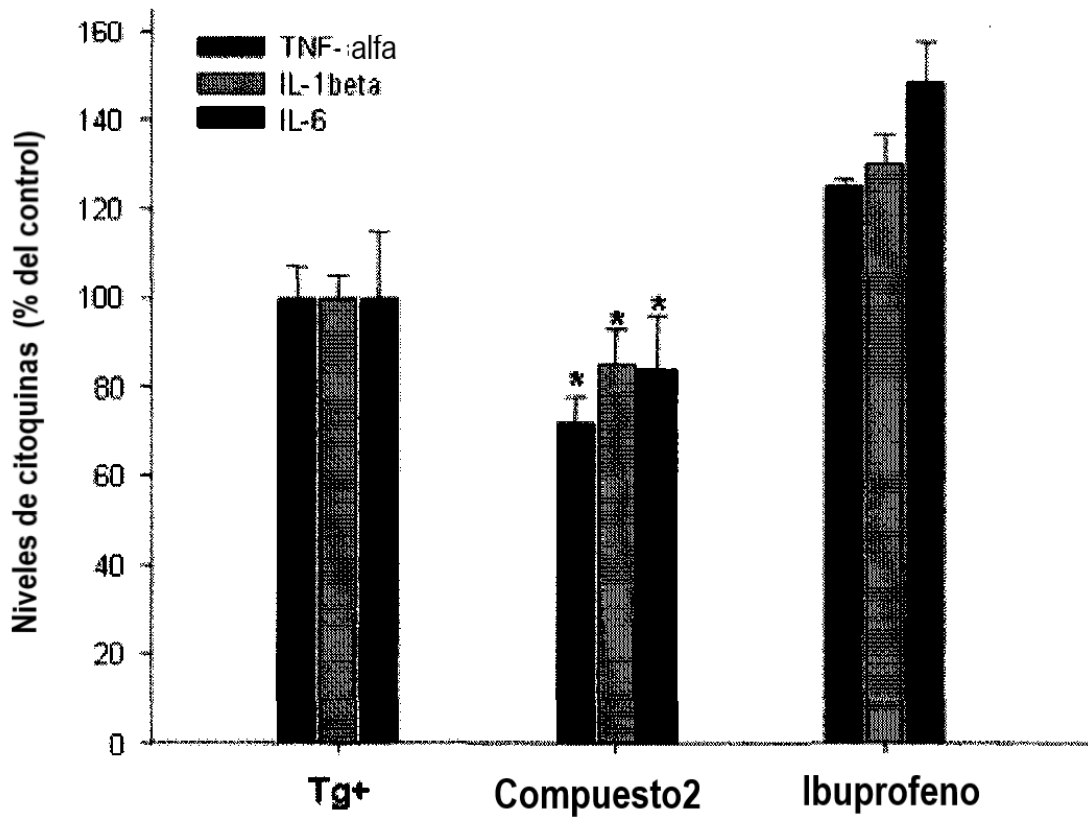
[Fig. 23]



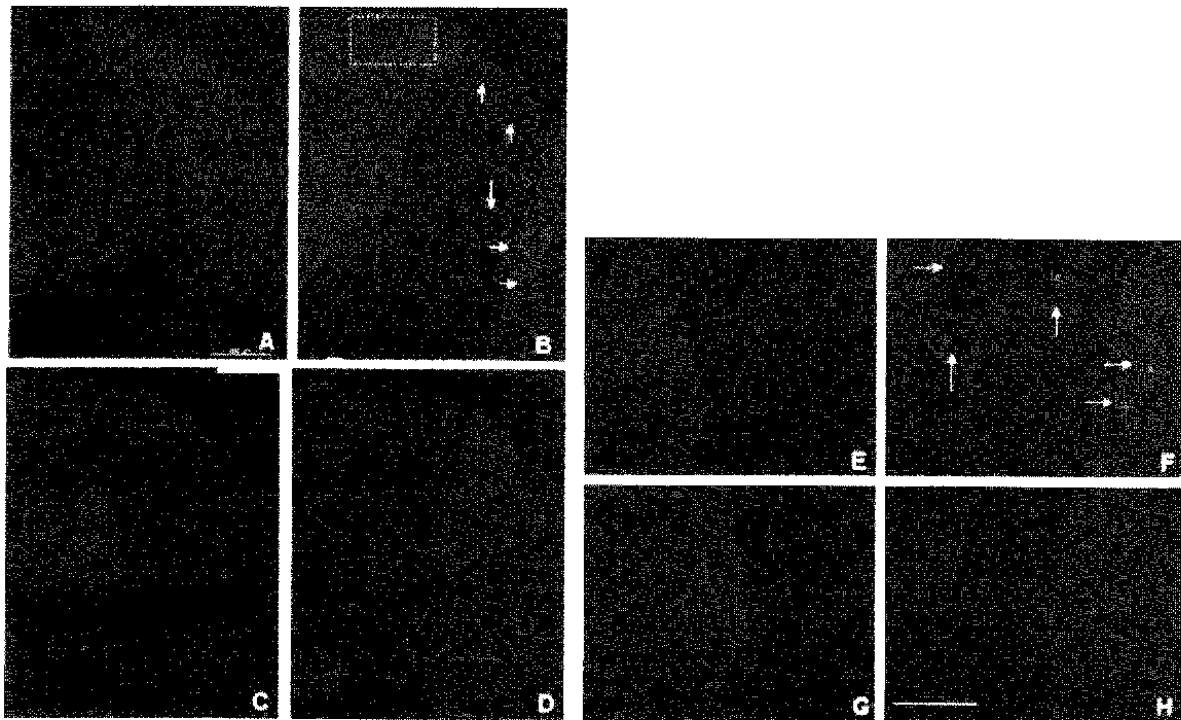
[Fig. 24]



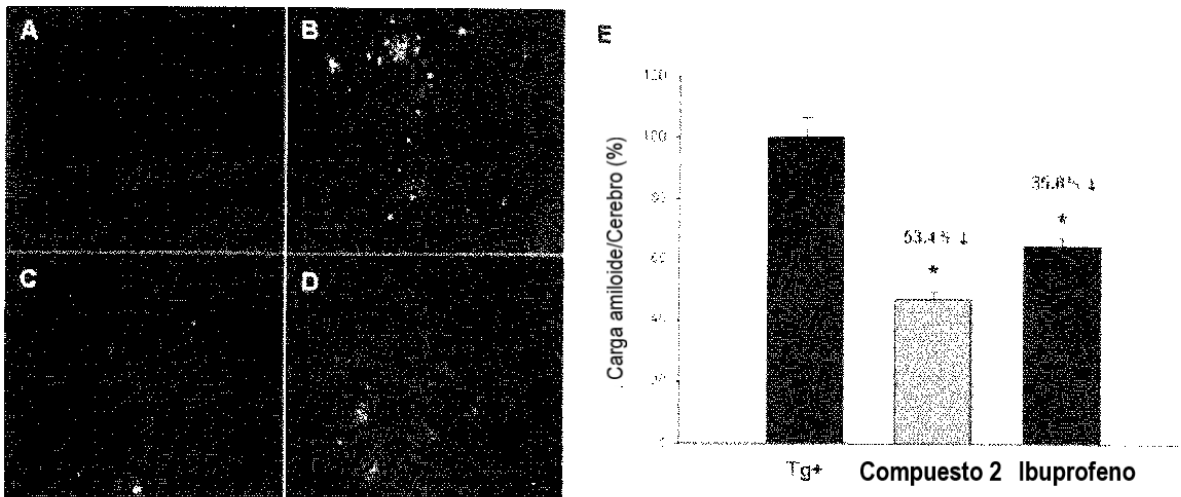
[Fig. 25]



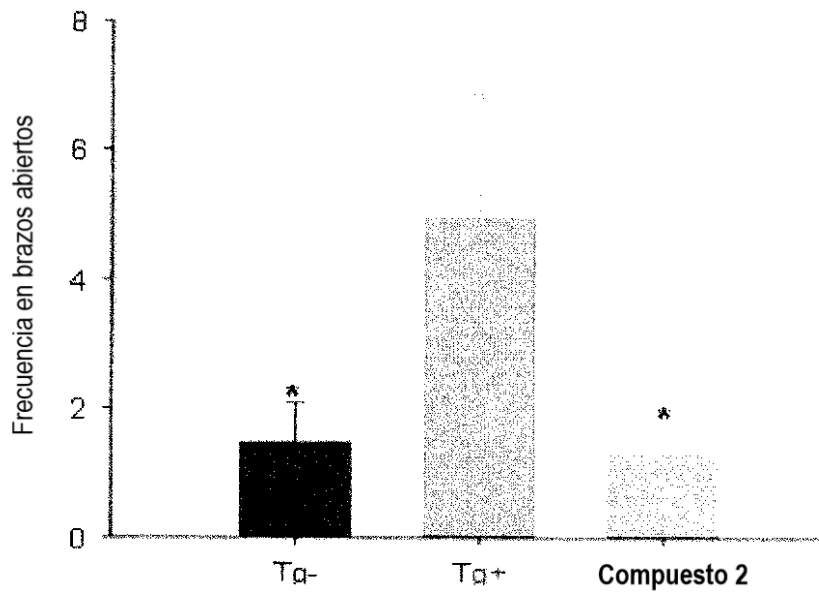
[Fig. 26]



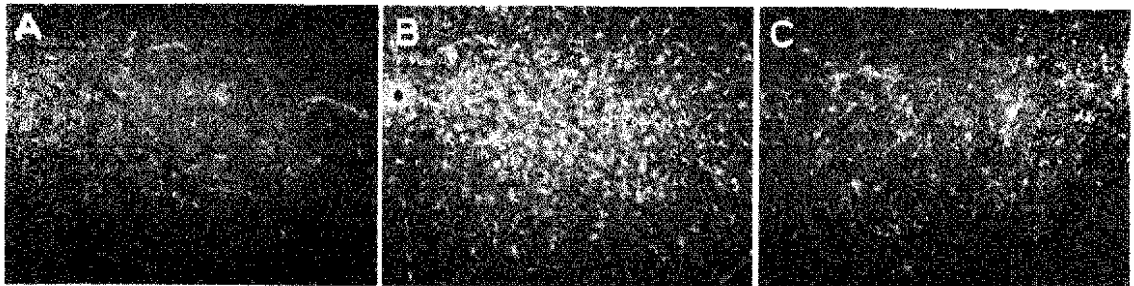
[Fig. 27]



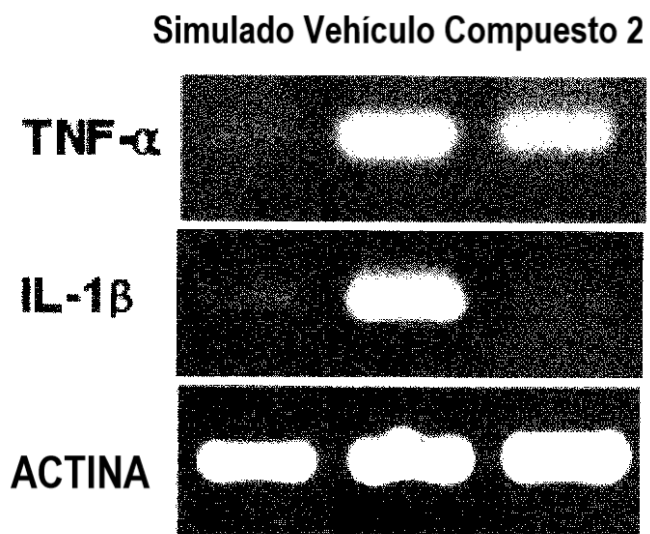
[Fig. 28]



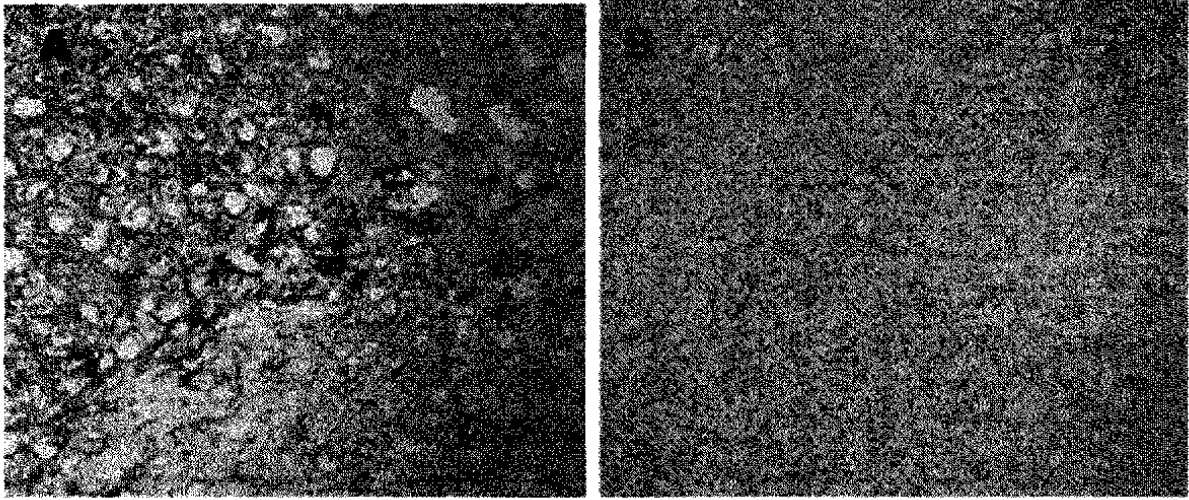
[Fig. 29]



[Fig. 30]



[Fig. 31]



[Fig. 32]

