

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 868**

51 Int. Cl.:

A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
C07D 498/04 (2006.01)
C07D 265/22 (2006.01)
A61K 31/536 (2006.01)
A61K 31/539 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2015** **PCT/SE2015/050062**
87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015** **WO15112081**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2015** **E 15740572 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020** **EP 3097085**

54 Título: **Derivados de benzoxazinona para el tratamiento de enfermedades cutáneas**

30 Prioridad:

23.01.2014 SE 1430003

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2021

73 Titular/es:

SIXERA PHARMA AB (100.0%)
Fogdevreten 2A
171 65 Solna, SE

72 Inventor/es:

WÅGBERG, FREDRIK y
LEONARDSSON, GÖRAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 820 868 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

Derivados de benzoxazinona para el tratamiento de enfermedades cutáneas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para inhibir la actividad de las proteasas cutáneas, especialmente calicreína 7 humana (KLK7), calicreína 5 humana (KLK5), y calicreína 14 humana (KLK 14). Más específicamente, la invención se refiere al uso de 3,1 -benzoxacin-4-onas sustituidas que son inhibidores selectivos de calicreínas de la piel humana para el tratamiento de enfermedades cutáneas, más específicamente para el tratamiento de enfermedades cutáneas inflamatorias, especialmente, el síndrome de Netherton.

Antecedentes

KLK 7 (hK7, o stratum corneum chymotryptic enzyme (enzima quimotriptica del estrato córneo - SCCE), Swissprot P49862) es una serina proteasa S1 del gen de la familia de la calicreína que presenta una actividad de tipo quimotripsina. KLK7 se expresa principalmente en la piel y parece desempeñar un papel importante en la fisiología de la piel (Egelrud. 1993. *Purification and preliminary characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase that may be involved in desquamation*. *J. Invest. Dermatol.* 101, 200-204; Skytt y col. 1995. *Primary substrate specificity of recombinant human stratum corneum chymotryptic enzyme*. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 586-589; Yousef y col. 2000. *The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation*. *Gene* 254, 119-1281).

KLK7 está implicada en la degradación de la estructura intercelular cohesiva en el epitelio escamoso cornificado durante el proceso de descamación. El proceso de descamación está bien regulado y está delicadamente equilibrado con la producción *de novo* de los corneocitos para mantener un espesor constante del estrato córneo. En este sentido, se ha notificado que KLK 7 puede escindir las proteínas corneodesmosomales, concretamente, corneodesmosina y desmocolina 1 (Simón y col. 2001. *Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation*. *J. Biol. Chem.* 276, 20292-20299; Caubet y col. 2004. *Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7*. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1235-1244; Brattsand y col. 2005. *A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum*. *J. Invest. Dermatol.* 124, 198-203. Además, se ha comprobado que las dos enzimas de procesamiento de lípidos, concretamente β -glucocerebrosidasa y esfingomielinasa ácida, se pueden degradar mediante KLK 7 (Hachem y col. 2005. *Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity*. *J. Invest. Dermatol.* 125, 510-520). Ambas enzimas de procesamiento de lípidos se segregan simultáneamente con sus sustratos, concretamente glucosilceramidas y esfingomielina, y procesan estos precursores lípidos polares a sus productos más no polares, p. ej., ceramidas, que se incorporan posteriormente a las membranas de la matriz extracelular. La arquitectura de la membrana laminar es fundamental para tener una barrera cutánea funcional. Finalmente, se ha comprobado que KLK7 activa la citoquina proinflamatoria Pro-interleucina-1 β (IL-1 β) (Nylander-Lundqvist & Egelrud. 1997. *Formation of active IL-1 β from pro-IL-1 β catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro*. *Acta Derm. Venereol.* 77, 203-206).

Varios estudios relacionan una mayor actividad de KLK7 con enfermedades cutáneas inflamatorias tales como dermatitis atópica, psoriasis o síndrome de Netherton. Una mayor actividad de KLK7 puede dar lugar a una degradación incontrolada de corneodesmosomas que da como resultado en una descamación desregulada, una mayor degradación de enzimas de procesamiento de lípidos que da como resultado una arquitectura de la membrana laminar alterada o una (in)activación descontrolada de la citoquina proinflamatoria IL-1 β . Ya se había demostrado anteriormente que esto podría producir un funcionamiento alterado de la barrera de la piel e inflamación (documento WO 2004/108139).

La actividad de KLK7 se controla en varios niveles. Varios factores podrían ser los responsables de un aumento en la actividad de KLK7 en enfermedades inflamatorias cutáneas. En primer lugar, la cantidad de proteasa que se expresa se puede ver afectada por factores genéticos. Dicho vínculo genético, un polimorfismo en el 3'-UTR del gen KLK7, se ha descrito recientemente (Vasilopoulos y col. 2004. *Genetic association between an AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis*. *J. Invest. Dermatol.* 123, 62-66.). Los autores teorizan que la inserción de 4 pares de bases descrita en el 3'-UTR del gen de la calicreína 7 estabiliza el ARNm de KLK7 y da como resultado una expresión en exceso de KLK7. En segundo lugar, dado que KLK 7 se secreta mediante cuerpos laminares hacia el espacio celular del estrato córneo como zimógeno y no puede autoactivarse, debe ser activada por otra proteasa p. ej. KLK5 (Caubet y col., *supra*). La actividad descontrolada de dicha enzima activadora podría dar como resultado una sobreactivación de KLK7. En tercer lugar, la KLK7 activada se puede inhibir mediante inhibidores naturales de tipo LEKTI, ALP o elafina (Schechter y col. 2005. *Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI)*. *Biol. Chem.* 386, 1173-1184; Franzke y col. 1996. *Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme - Evidence for a regulative function in desquamation*. *J. Biol. Chem.* 271, 21886-21890). La menor expresión o falta de estos inhibidores podría dar como resultado una actividad potenciada de KLK7.

Se ha descubierto que las mutaciones en el gen *spink*, que codifica LEKTI, son causantes del síndrome de Netherton (Descargues y col. 2005. *Spink5- deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity*. Nat. Genet. 37, 56 - 65) y una única mutación puntual en el gen está vinculada a la dermatitis atópica (Walley y col. 2001. *Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease*. Nat. Genet. 29, 175-178; Nishio y col. 2003. *Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese*. Genes Immun. 4, 515-517). Finalmente, otro nivel de control de la actividad de KLK7 es el pH. La KLK7 tiene un pH óptimo de neutro a ligeramente alcalino y hay un gradiente de pH de neutro a ácido desde las capas más internas a las capas más externas en la piel. Factores ambientales como el jabón pueden dar lugar a un aumento del pH en las capas más externas del estrato córneo hacia el pH óptimo de KLK7, aumentando de esta forma la actividad de KLK7.

La hipótesis de que una mayor actividad de KLK7 está vinculada con enfermedades inflamatorias cutáneas está respaldada por los siguientes estudios: En primer lugar, los pacientes con síndrome de Netherton desarrollan un aumento dependiente del fenotipo en la actividad de la serina proteasa, una disminución en de corneodesmosomas, una disminución en las enzimas de procesamiento de lípidos β -glucocerebrosidasa y esfingomielinasa ácida, y una función de barrera alterada (Descargues y col. 2006. *Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome*. J. Invest. Dermatol. 126, 1622-1632; Hachem y col. 2006. *Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome*. J. Invest. Dermatol. 126, 1609-1621.). En segundo lugar, un ratón transgénico que expresa en exceso KLK7 muestra un fenotipo cutáneo similar al que se encuentra en pacientes con dermatitis atópica (Hansson y col. 2002. *Epidermal Overexpression of Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme in Mice: A Model for Chronic Itchy Dermatitis*. J. Invest. Dermatol. 118, 444-449; Ny & Egelrud. 2003. *Transgenic mice over-expressing a serine protease in the skin: evidence of interferon gamma-independent MHC II expression by epidermal keratinocytes*. Acta Derm. Venereol. 83, 322-327; Ny & Egelrud. 2004. *Epidermal hyperproliferation and decreased skin barrier function in mice overexpressing stratum corneum chymotryptic enzyme*. Acta Derm. Venereol. 84, 18-22). En tercer lugar, en la piel de pacientes con dermatitis atópica y psoriasis, se han descrito niveles elevados de KLK7 (Ekholm & Egelrud. 1999. *Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis*. Arch. Dermatol. Res. 291, 195-200). Por lo tanto, KLK 7 se considera una diana para el tratamiento de enfermedades cutáneas como dermatitis atópica, psoriasis o síndrome de Netherton y existe necesidad de inhibidores específicos de los mismos.

Cuando los pacientes que padecen un síndrome de Netherton tienen una barrera cutánea muy alterada, la administración tópica de compuestos terapéuticamente activos también dará como resultado la exposición sistémica de los compuestos al paciente. Por tanto, existe una necesidad de identificar inhibidores selectivos de las proteasas cutáneas que puedan utilizarse en el tratamiento del síndrome de Netherton sin riesgo de efectos sistémicos no deseados sistémica derivados de la inhibición de las proteasas.

Se cree que KLK7, KLK5 y KLK14 forman parte de una cascada proteolítica en la capa del estrato córneo de la piel humana (Brattsand y col. 2005. *A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum*. J Invest Dermatol 124, 198-203).

Por tanto, sería beneficioso identificar inhibidores activos no solo de KLK 7, sino también de KLK5 y KLK14.

En WO /2004108139 se describen ciertos compuestos sustituidos de benzoxazinona y tienoxazinona como inhibidores de KLK7, pero no informan de ningún dato de selectividad de los compuestos descritos.

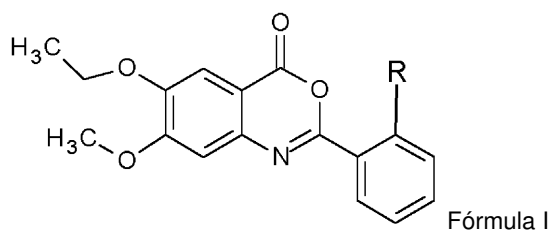
En US-2011/319611 se describen compuestos sustituidos de 2-fenil-4H-3,1-benzoxazin-4-ona activos como inhibidores de la neutrophil elastase (elastasa de neutrófilos - NE). Las respuestas de neutrófilos inadecuadas pueden dar como resultado trastornos inflamatorios y destrucción de tejidos. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la elastasa de neutrófilos puede ser una terapia importante para los trastornos inflamatorios.

En WO 99/48878 se describen compuestos heterocíclicos, tales como, p. ej. 4H-3,1-benzoxazin-4-onas, útiles como anticoagulantes. Los compuestos inhiben la actividad del factor VIIa (fVIIa) en complejos con el tissue factor (factor tisular - TF) y, como resultado, se inhibe la coagulación sanguínea iniciada por el factor de tejido.

Gilmore y col. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6: 679-682 describe 2-aril-4H-3,1-benzoxazin-4-onas activas como inhibidores de la serina proteasa C1r.

Descripción de la invención

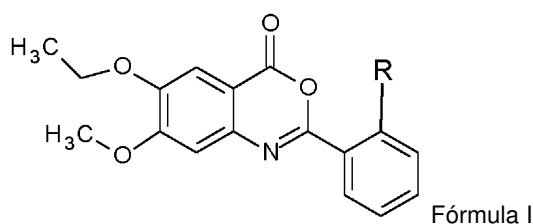
Los presentes inventores han podido identificar inhibidores que son selectivos de las proteasas cutáneas y han descubierto que la actividad de KLK7, KLK5 y KLK14 se pueden inhibir mediante compuestos según la Fórmula I,



en donde R es $-S-CH_3$ o $-Cl$.

- 5 Dichos compuestos presentan varias propiedades ventajosas, como la selectividad para las proteasas cutáneas KLK7, KLK5 y KLK14, que intervienen en la fisiopatología de enfermedades cutáneas inflamatorias tales como el síndrome de Netherton, que no tienen o que solo baja actividad inhibitoria sobre otras proteasas.

En consecuencia, la presente invención proporciona compuestos según la Fórmula I



en donde R es $-S-CH_3$ o $-Cl$, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos

- 15 La presente invención proporciona, además, compuestos según la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para usar en medicina.

El compuesto puede ser 6-etoxi-7-metoxi-2-(2-metilsulfanilfenil)-3,1-benzoxazin-4-ona, o 2-(2-clorofenil)-6-etoxi-7-metoxi-3,1-benzoxazin-4-ona

- 20 La presente invención proporciona, además, compuestos según la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para usar profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea.

- 25 La invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según la Fórmula I mezclado con adyuvantes, diluyentes y/o portadores farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona, además, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para usar en profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea.

- 30 La enfermedad cutánea puede ser una enfermedad cutánea inflamatoria. La enfermedad cutánea puede seleccionarse de síndrome de Netherton, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, eccema, psoriasis, acné, hiperqueratinosis epidérmica, acantosis, inflamación epidérmica, inflamación dérmica y prurito.

El sujeto a tratar puede ser un mamífero, tal como un ser humano, un perro, un gato o un caballo.

35 Definiciones

Como se utiliza en la presente descripción, el término “sales farmacéuticamente aceptables” incluye las sales de adición de ácido y las sales de adición de base. Estas sales pueden formarse por medios convencionales, por ejemplo, mediante la reacción de un ácido libre o una forma de base libre del compuesto de la invención con uno o más equivalentes de un ácido o base adecuado, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en el que la sal sea insoluble, seguida de la eliminación del dicho disolvente o dicho medio, usando técnicas estandarizadas (p.ej., al vacío o por liofilización). Las sales también se pueden preparar por intercambio de un contraión de un compuesto de la invención en forma de una sal con otro contraión con el uso de una resina de intercambio iónico adecuada.

45 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término “tratar” también incluye “profilaxis” salvo que haya indicaciones específicas en sentido contrario. El término “tratar” dentro del contexto de la presente invención abarca además administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención para mitigar una patología preexistente, aguda o crónica, o una dolencia recurrente. Esta definición también abarca terapias profilácticas para la prevención de dolencias recurrentes y la terapia continuada para trastornos crónicos.

El compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica convencional por cualquier vía que incluye vía oral, vía intramuscular, vía subcutánea, vía tópica, vía intranasal, vía intraperitoneal, vía intratorácica, vía epidural, vía intratecal, vía intracerebroventricular y por inyección en las articulaciones.

5 En una realización de la presente invención, la vía de administración puede ser tópica.

La dosificación dependerá de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad, la edad y el peso del paciente y otros factores que suele tener en cuenta el médico a cargo del paciente, cuando determina el régimen individual y el nivel de dosificación más apropiados para un paciente en concreto.

10 Para preparar las composiciones farmacéuticas del compuesto de la presente invención, los portadores inertes farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, sellos y supositorios.

15 Un portador sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes saborizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes o agentes disgregantes de comprimidos; también puede ser un material de encapsulación.

20 En polvos, el portador es un sólido finamente dividido, que está mezclado con el compuesto finamente dividido de la presente invención, o con el principio activo. En comprimidos, el principio activo se mezcla con el portador que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y se compactan a la forma y tamaño deseados.

25 Para preparar composiciones de supositorio, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso y manteca de cacao, y el ingrediente activo se dispersa en la misma mediante, por ejemplo, agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte a continuación en moldes de tamaño adecuado y se deja enfriar y solidificar.

Los portadores adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

30 El término composición también pretende incluir la formulación del componente activo con material de encapsulación como portador proporcionando una cápsula en la que el componente activo (con o sin otros portadores) está rodeado por un portador que por lo tanto está asociado con el mismo. De forma similar, se incluyen sellos.

35 Los comprimidos, polvos, sellos y cápsulas pueden utilizarse como formas de dosificación sólidas adecuadas para su administración oral.

40 Las composiciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Por ejemplo, las soluciones estériles de agua o propilenglicol de los compuestos activos pueden ser preparaciones líquidas adecuadas para la administración parenteral. Las composiciones líquidas también se pueden formular en solución como solución acuosa de polietilenglicol.

45 Las soluciones acuosas para administración oral pueden prepararse disolviendo el componente activo en agua y agregando colorantes, agentes saborizantes, estabilizantes y agentes espesantes adecuados según se desee. Las soluciones acuosas para uso oral se pueden preparar dispersando el componente activo finamente dividido en agua junto con un material viscoso como, por ejemplo, gomas naturales sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica.

50 Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica se según una realización de la presente invención incluirá de 0,05 % a 99 % en peso (por ciento en peso), según una realización alternativa de 0,10 a 50 % en peso, del compuesto de la presente invención, todos los porcentajes en peso se basan en la composición total.

55 Una cantidad terapéuticamente efectiva para la práctica de la presente invención puede determinarse mediante el uso de criterios conocidos que incluyen la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y se interpretan dentro del contexto de la enfermedad que se está tratando o que desea prevenir, por un experto en la materia.

El objeto anteriormente mencionado para una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención se aplica análogamente a una composición farmacéutica que comprende una combinación según la presente invención.

60 Se contempla que cualquier método o composición descrita en la presente descripción puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrita en la presente descripción.

65 El uso de la palabra “un” o “uno” cuando se usa junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar también “una”, pero es también consistente con el significado de “uno/una o más”, “al menos uno/una”, y “uno/una o más de uno/una”.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Selectividad de 3,1-benzoxazin-4-onas sustituidas como inhibidores de proteasas humanas

Se determinaron los valores CI_{50} de numerosas 3,1-benzoxazin-4-onas sustituidas en un panel de proteasas humanas.

Ensayo de KLK7

10 Materiales: KLK7, recombinante humana, sustrato S-2586 (Chromogenics, n.º cat. 820894) La actividad de KLK7 se determinó a 37 °C en fosfato Na 10 mM pH 7,2, NaCl 0,5 M, con concentraciones finales de 2,5 µg/ml (100 nM) de KLK7, sustrato 1,0 mM, DMSO al 5 % en presencia de 0 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1,0 µM y 5 µM de inhibidor, en placas de 96 pocillos midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Spectramax).

Ensayo de KLK5

20 Materiales: KLK5, recombinante humana, sustrato S-2288 (Chromogenics, n.º cat. 820852) La actividad de KLK5 se determinó a 37 °C en Tris 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,15 M, con concentraciones finales de 2,5 µg/ml de KLK5, sustrato 1 mM, DMSO al 5 % en presencia de 0 µM, 0,1 µM, 1,0 µM y 10 µM de inhibidor, en placas de 96 midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Spectramax).

Ensayo de KLK14

25 Materiales: KLK 14, recombinante humana, sustrato S- 2302 (Chromogenics, n.º cat. 820340). La actividad de KLK14 se determinó a 37 °C en Tris 0,1 mM, pH 8,0, NaCl 0,15 M, con concentraciones finales de 0,26 µg/ml (9,4 nM) de KLK14, sustrato 0,75 mM, DMSO al 5 %, en presencia de 0 µM, 0,1 µM, 1,0 µM y 10 µM de inhibidor, en placas de 96 pocillos midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Spectramax).

Ensayo de cathepsina G

30 Materiales: Cathepsina G, 100 mU (VWR, Calbiochem, n.º cat. 219373), sustrato cathepsina G sustrato (VWR, Calbiochem, n.º cat. 219407)

35 La actividad de cathepsina se determinó a 37 °C en Na fosfato 10 mM pH 7,2, 0,5 M NaCl, con concentraciones finales de 1,5 mU/ml (0,75 µg/ml, 32 nM) de Cathepsina G, sustrato 0,75 mM, DMSO al 5 %, en presencia de 0 µM, 0,1 µM, 1,0 µM y 10 µM de inhibidor, en placas de 96 pocillos, midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Spectramax).

Ensayo de quimotripsina

40 Materiales: Quimotripsina bovina, 25 µg (Roche, calidad de secuencia), sustrato S-2586 (Chromogenics, n.º cat. 82 08 94)

45 La actividad de quimotripsina se determinó a 37 °C en Na fosfato 10 mM pH 7,2, NaCl 0,5 M, con concentraciones finales de 0,2 µg/ml (6,8 nM) de quimotripsina, sustrato 1 mM, DMSO al 5 %, en presencia de 0 µM, 0,1 µM, 1,0 µM y 10 µM de inhibidor, en placas de 96 pocillos midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Spectramax).

Ensayo de tripsina

50 Materiales: Tripsina, 100 µg (Roche, calidad de secuencia, Mw 23500), Sustrato S-2288 (Chromogenics, n.º cat. 820852)

La actividad de tripsina se determinó a 37 °C en Na fosfato 10 mM pH 7,2, NaCl 0,5 M, con concentraciones finales de 0,8 µg/ml (34 nM) de tripsina, sustrato 1 mM, DMSO al 5 % en presencia de inhibidor 0 µM, 0,1 µM, 1,0 µM y 10 µM en placas de 96 pocillos midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Spectramax).

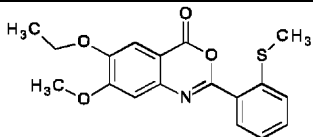
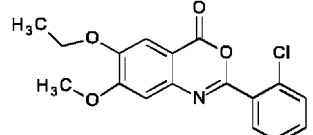
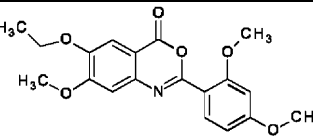
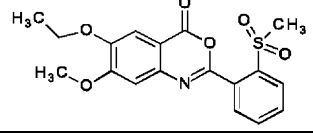
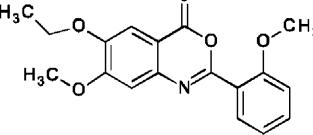
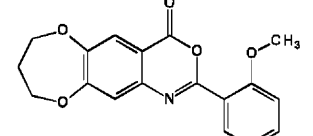
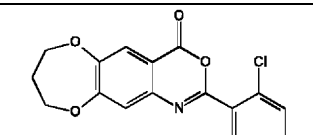
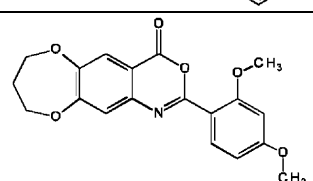
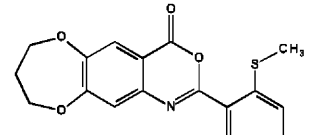
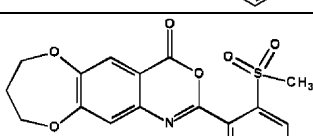
Ensayo de trombina

Materiales: Trombina (Chromogenics, n.º cat. 820712), Sustrato S-2288 (Chromogenics, n.º cat. 82 08 52)

60 La actividad de trombina se determinó a 37 °C en Tris 50 mM, pH 8,3, NaCl 130 mM, con concentraciones finales de 1 pkat/ml (0,03 µg/ml, 88 pM) de trombina, sustrato 0,5 mM, DMSO al 5 % en presencia de inhibidor 0 µM, 0,1 µM, 1,0 µM y 10 µM, en placas de 96 pocillos midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (Spectramax).

65

Tabla 1. Selectividad de las 3,1-benzoxazin-4-onas sustituidas- Cl_{50} (μM)

Compuesto	KLK7	KLK5	KLK14	Catepsina G	Quimotripsina	Tripsina	Trombina
1 	0,048	0,2	0,1	>> 10	>> 10	>> 10	> 10
2 	0,073	0,5	0,1	> 10	>> 10	>> 10	> 10
3 	0,116	0,6	0,5	1,1	>> 10	>> 10	> 10
4 	0,230	1,0	1,0	2,8	>> 10	>> 10	> 10
5 	0,085	0,5	0,3	1,2	> 10	>> 10	> 10
6 	0,080	1,0	1,4	0,7	< 0,1	>> 10	0,6
7 	0,090	2,2	2,7	1,9	< 0,1	>> 10	0,5
8 	0,065	1,0	2,3	0,6	< 0,1	>> 10	> 10
9 	0,228	1,3	1,5	1,3	0,4	>> 10	0,9
10 	0,188	1,9	5,2	0,5	0,2	>> 10	0,5

11		1,370	> 10	> 10	>> 10	1,0	>> 10	> 10
12		0,147	1,0	1,1	0,7	0,6	>> 10	>> 10
13		0,155	0,6	0,8	0,7	< 0,1	1,8	3,0
14		0,183	0,6	1,5	0,2	< 0,1	1,8	3,0
15		0,105	0,5	0,5	0,5	< 0,1	3,7	0,6
16		0,149	1,0	1,3	0,4	< 0,1	3,7	0,6
17		0,175	1,0	1,1	0,1	1,2	>> 10	>> 10
18		0,10	4,5	2,1	1,9	> 10	>> 10	> 10

Como se puede observar en la Tabla 1, solamente el compuesto 1 (6-etoxi-7-metoxi-2-(2-metilsulfanilfenil)-3,1-benzoxazin-4-ona) y el compuesto 2 (2-(2-clorofenil)-6-etoxi-7-metoxi-3,1-benzoxazin-4-ona) tuvieron la selectividad deseada, es decir, una Cl_{50} menor de 0,1 μ M para KLK7, y una Cl_{50} menor de 1 μ M para KLK5 y KLK14, y una Cl_{50} mayor de 10 μ M para el resto de proteasas analizadas.

Cabe señalar que aunque se ha descubierto que varios de los compuestos tienen un intenso efecto inhibitor sobre KLK7, así como sobre KLK5 y sobre KLK14, solamente los compuestos 1 y 2, es decir, los compuestos según la invención, pudieron demostrar tener una actividad inhibitora suficientemente baja para otras proteasas.

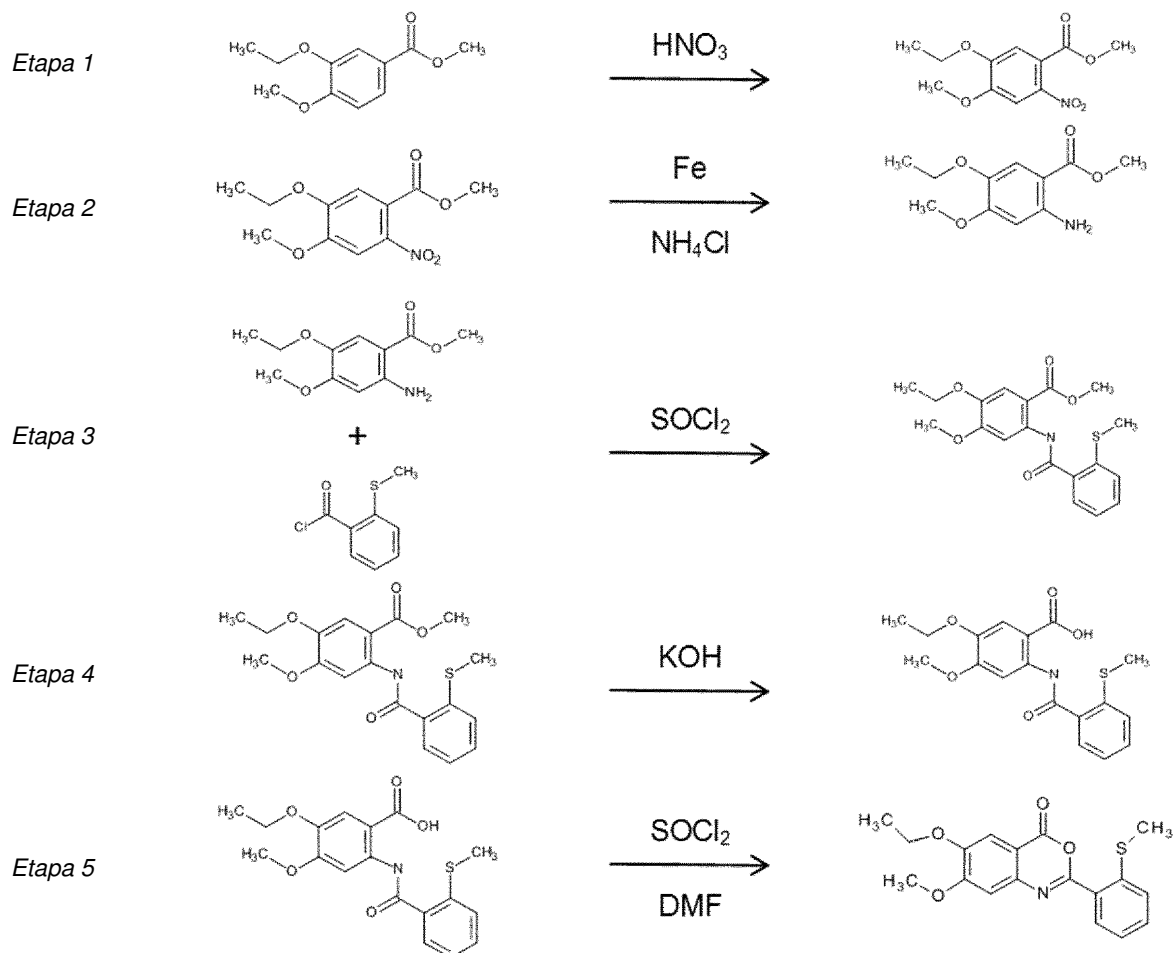
Incluso cambios pequeños en el patrón de sostenimiento de los compuestos tienen un efecto importante sobre la selectividad de los compuestos. Por ejemplo, el compuesto 12 que está metoxisustituido en posición 6, en comparación con el compuesto 1 que está etoxisustituido en la posición 6, muestra una actividad inhibitora más de 10 veces mayor (observada con una Cl_{50} 10 veces menor) sobre catepsina G y quimotripsina en comparación con el compuesto 1, lo que convierte al compuesto 12 en inadecuado para usar en el tratamiento de enfermedades cutáneas.

En resumen, los datos presentados en la Tabla 1 demuestran que solamente los compuestos 1 y 2, es decir, los compuestos según la invención, son suficientemente selectivos teniendo una elevada actividad inhibitora de las

proteasas cutáneas KLK7, KLK5 y KLK14, a la vez que tiene una actividad inhibidora suficientemente baja para otras proteasas, convirtiéndolos en adecuados para usar en el tratamiento de enfermedades cutáneas.

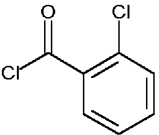
Ejemplo 2

5 Síntesis de 6-etoxi-7-metoxi-2-(2-metilsulfanilfenil)-3,1-benzoxazin-4-ona



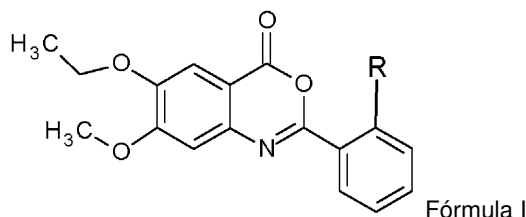
Ejemplo 3

10 Síntesis de 2-(2-clorofenil)-6-etoxi-7-metoxi-3,1-benzoxazin-4-ona.

Igual que en el Ejemplo 2 pero con el uso de  en la Etapa 3.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la Fórmula I



en donde R es $-S-CH_3$ o $-Cl$, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto 6-etoxi-7-metoxi-2-(2-metilsulfanilfenil)-3,1-benzoxazin-4-ona.
3. El compuesto 2-(2-clorofenil)-6-etoxi-7-metoxi-3,1-benzoxazin-4-ona.
4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en medicina.
5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea.
6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea inflamatoria.
7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en la profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea inflamatoria seleccionada de síndrome de Netherton, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, eccema, psoriasis, acné, hiperqueratosis epidérmica, acantosis, inflamación epidérmica, inflamación dérmica y prurito.
8. Un compuesto según la reivindicación 7 para usar en la profilaxis, prevención y/o tratamiento del síndrome de Netherton.
9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 mezclado con adyuvantes, diluyentes y/o portadores farmacéuticamente aceptables.
10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, para usar en profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea.
11. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, para usar en profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea inflamatoria.
12. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, para usar en profilaxis, prevención y/o tratamiento de una enfermedad cutánea inflamatoria seleccionada de síndrome de Netherton, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, eccema, psoriasis, acné, hiperqueratosis epidérmica, acantosis, inflamación epidérmica, inflamación dérmica y prurito.
13. La composición farmacéutica según la reivindicación 12 para usar en profilaxis, prevención y/o tratamiento del síndrome de Netherton.