

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6448651号  
(P6448651)

(45) 発行日 平成31年1月9日 (2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日 (2018.12.14)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 265/22 (2006.01)  
A 6 1 K 31/536 (2006.01)  
A 6 1 P 17/00 (2006.01)  
A 6 1 P 17/06 (2006.01)  
A 6 1 P 17/04 (2006.01)

C O 7 D 265/22 C S P  
A 6 1 K 31/536  
A 6 1 P 17/00  
A 6 1 P 17/06  
A 6 1 P 17/04

請求項の数 14 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-544672 (P2016-544672)  
(86) (22) 出願日 平成27年1月22日 (2015.1.22)  
(65) 公表番号 特表2017-503798 (P2017-503798A)  
(43) 公表日 平成29年2月2日 (2017.2.2)  
(86) 国際出願番号 PCT/SE2015/050062  
(87) 国際公開番号 W02015/112081  
(87) 国際公開日 平成27年7月30日 (2015.7.30)  
審査請求日 平成29年12月25日 (2017.12.25)  
(31) 優先権主張番号 1430003-2  
(32) 優先日 平成26年1月23日 (2014.1.23)  
(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(73) 特許権者 516199201  
シクセラ ファーマ エービー  
スウェーデン エスイー-411 26  
ヨーテボリ エリク・ダールベルグスガタ  
ン 11エー シー/オー ジーユー ホ  
ールディングス  
(74) 代理人 100082072  
弁理士 清原 義博  
(72) 発明者 ヴォーグベルグ, フレドリック  
スウェーデン エス-443 35 リラ  
ム ヘア・エスゲルス・ヴェーグ 3  
(72) 発明者 レオナルドソン, ヨーラン  
スウェーデン エス-434 31 クン  
グスバッカ ムニンス・ヴェーグ 11

最終頁に続く

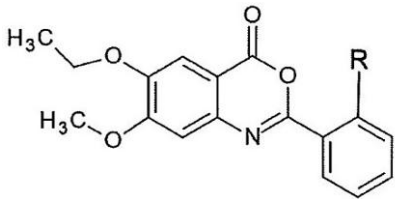
(54) 【発明の名称】 皮膚病の処置のためのベンゾオキサジノン誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I による化合物、またはその薬学的に許容可能な塩であって、

【化 1】



式 I

10

式中、R が、- S - C H <sub>3</sub> または - C l である、化合物。

【請求項 2】

6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 2 - ( 2 - メチルスルファニルフェニル ) - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

2 - ( 2 - クロロフェニル ) - 6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

医療における使用のための、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 5】

20

皮膚病の予防法、予防及び／又は処置に使用するための、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 6】

薬学的に許容可能なアジュバント、希釈剤及び／又は担体と組み合わせた請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 7】

皮膚病の予防法、予防及び／又は処置に使用するための、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

皮膚病が炎症性皮膚疾患である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 9】

皮膚病が、ネザートン症候群、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、湿疹、乾癬、ざ瘡、表皮過角化症、表皮肥厚症、表皮炎症、皮膚炎症およびそう痒症から選択される、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

皮膚病がネザートン症候群である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

皮膚病の処置のための薬剤の製造のための請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 12】

皮膚病が炎症性皮膚疾患である、請求項 11 に記載の使用。

20

【請求項 13】

皮膚病が、ネザートン症候群、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、湿疹、乾癬、ざ瘡、表皮過角化症、表皮肥厚症、表皮炎症、皮膚炎症およびそう痒症から選択される、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 14】

皮膚病がネザートン症候群である、請求項 11 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、皮膚プロテアーゼ、特にヒトのカリクレイン 7 (KLK7)、ヒトのカリクレイン 5 (KLK5)、およびヒトのカリクレイン 14 (KLK14) の活性を阻害するための方法および組成物に関する。より具体的には、本発明は、皮膚病の処置のための、より具体的には、炎症性皮膚疾患、特にネザートン症候群の処置のための、ヒトの皮膚カリクレインの選択的阻害剤である、置換された 3, 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

KLK7 (hK7、または角質層キモトリプシン酵素 (SCCE)、Swissprot P49862) は、キモトリプシンのような活性を示すカリクレイン遺伝子ファミリーのSIセリンプロテアーゼである。KLK7 は、主に皮膚において発現され、皮膚生理学において重要な役割を果たすように見える (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; Skytte et al., 1995, Primary substrate specificity of recombinant human stratum corneum chymotryptic enzyme. Biochem Biophys Res Commun 211, 586-589; Yousef et al., 2000, The KLK

40

50

7 (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)。

【0003】

KLK7は、落屑(desquamation)のプロセスにおける角質化した扁平上皮中の細胞間の凝集構造の分解に関係する。落屑プロセスは、十分に調節され、角質層の一定の厚さを維持するために角質細胞のデノボ生成と微妙に均衡を保っている。この点で、KLK7は、コルネオデスモソームの(corneodesmosomal)タンパク質、コルネオデスモシン(corneodesmosin)およびデスモコリン1を開裂することができる(Simon et al. 2001. Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. J. Biol. Chem. 276, 20292-20299; Caubet et al. 2004. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SC TE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. J. Invest. Dermatol. 122, 1235-1244; Brattsand et al. 2005. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. J. Invest. Dermatol. 124, 198-203)。さらに、2つの脂質プロセシング酵素、 $\alpha$ -グルコセレブロシダーゼおよび酸性スフィンゴミエリナーゼは、KLK7によって分解され得ることが示された(Hachem et al. 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)。両方の脂質プロセシング酵素は、それらの基質、グルコシルセラミドおよびスフィンゴミエリンで同時分泌され(co-secreted)、これらの極性脂質前駆体を、それらのより非極性の生成物、例えばセラミドへと処理し、続いて細胞外のラメラ膜へと組み込まれる。ラメラ膜構造は、機能的な皮膚バリアにとって重要である。最終的に、KLK7は、炎症促進性サイトカインのPro-インターロイキン-1(IL-1)を活性化することが示された(Nylander-Lundqvist & Egelrud. 1997. Formation of active IL-1 from pro-IL-1 catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. Acta Derm. Venereol. 77, 203-206)。

【0004】

幾つかの研究は、KLK7の活性の増加を、アトピー性皮膚炎、乾癬またはネザートン症候群などの、炎症性皮膚疾患に関連付けている。KLK7活性の増加は、結果として落屑の誤調節(miss-regulated)をもたらすコルネオデスモソームの制御されていない分解、結果としてラメラ膜構造の妨害(disturbed)をもたらす脂質プロセシング酵素の増強された分解、または炎症促進性サイトカインIL-1の制御されていない(不)活性化につながる恐れがある。これが皮膚バリア機能および炎症の低下(impaired)につながり得ることが以前に実証された(WO 2004/108139)。

10

20

30

40

50

## 【0005】

KLK7 活性は、幾つかのレベルで制御される。様々な因子が炎症性皮膚疾患における KLK7 活性の増加の原因であるかもしれない。第1に、発現されているプロテアーゼの量は、遺伝因子による影響を受けるかもしれない。このような遺伝的つながり (KLK7 遺伝子における 3' - UTR 中の多型性) が最近記載された (Vasilopoulos et al. 2004. Genetic association between a n AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopi c dermatitis. J. Invest. Dermatol. 123, 62 - 66.)。著者は、カリクレイン7 遺伝子の 3' - UTR 中の記載された4回の塩基対の挿入が、KLK7 mRNAを安定させ、結果としてKLK7の過剰発現をもたらすと仮説した。第2に、KLK7は、ラメラ体を介して酵素前駆体として角質層細胞外空間へと分泌されて、自己活性化することができないため、別のプロテアーゼ、例えばKLK5によって活性化される必要がある(上記のCaubet et al.)。そのような活性化酵素の制御されない活性は、結果としてKLK7の過剰活性化をもたらすかもしれない。第3に、活性化したKLK7は、LEKTI、ALPまたはエラフィンのような天然阻害剤によって阻害され得る (Schechter et al. 2005. Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial K azal-type inhibitor (LEKTI). Biol. Chem. 386, 1173 - 1184; Franzke et al. 1996. Antile iikoprotease inhibits stratum corneiim chy motryptic enzyme - Evidence for a regulativ e function in desquamation. J. Biol. Chem. 271, 21886 - 21890)。発現の減少またはそのような阻害剤の欠如は、結果としてKLK7活性の増強をもたらすかもしれない。

## 【0006】

LEKTIをコード化するスピנקの遺伝子中の突然変異がネザートン症候群の原因であること (Descargues et al. 2005. Spink5 - deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. Nat - Genet. 37, 56 - 65) および遺伝子中の単一点突然変異がアトピー性皮膚炎に関連していること (Wall ey et al. 2001. Gene polymorphism in Nether ton and common atopic disease. Nat. Genet. 29, 175 - 178; Nishio et al. 2003. Associatio n between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. Gene s Immun. 4, 515 - 517) が分かった。最後に、KLK7の活性を制御する別のレベルは、pHである。KLK7は、中性からわずかにアルカリ性の至適pHを有し、皮膚の最内側層から最外層まで中性から酸性のpH勾配がある。石鹸のような環境要因は、KLK7の至適pHへの角質層の最外層におけるpH増加を結果としてもたらすかもしれない、それによってKLK7活性を増加させる。

## 【0007】

KLK7の活性の増加が炎症性皮膚疾患に関連するという仮説は、以下の研究によって支持されている：第1に、ネザートン症候群の患者は、セリンプロテアーゼ活性の表現型依存性の増加、コルネオデスモソームの減少、脂質プロセッシング酵素、 - グルコセレブロシダーゼおよび酸性スフィンゴミエリナーゼの減少、およびバリア機能の低下を示す (Descargues et al. 2006. Corneodesmosomal c adherins are preferential targets of strat

10

20

30

40

50

um corneum trypsin - and chymotrypsin - like hyperactivity in Netherton syndrome. J. Invest. Dermatol. 126, 1622 - 1632; Hachem et al. 2006. Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. J. Invest. Dermatol. 126, 1609 - 1621. )。第2に、KLK7を過剰発現する遺伝子組み換えマウスは、アトピー性皮膚炎の患者に見られる皮膚表現型に類似した皮膚表現型を示す ( Hansson et al. 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 )。第3に、アトピー性皮膚炎および乾癬の患者の皮膚におけるKLK7のレベルの上昇が記載された ( Ekholm & Egelrud. 1999. Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. Arch. Dermatol. Res. 291, 195 - 200 )。それ故、KLK7は、アトピー性皮膚炎、乾癬またはネザートン症候群のような炎症性皮膚疾患の処置の標的であると考えられ、その特異的阻害剤が必要とされている。

#### 【0008】

ネザートン症候群を患う患者が重度に損傷した皮膚バリアを有しているため、治療上活性な化合物の局所投与もまた、結果として、患者への化合物の全身曝露をもたらすだろう。したがって、プロテアーゼの望まれない全身阻害による全身作用のリスクなしに、ネザートン症候群の処置に使用することができる皮膚プロテアーゼに選択的な阻害剤を特定する必要がある。

#### 【0009】

KLK7、KLK5、およびKLK14は、ヒトの皮膚の角質層中のタンパク質分解カスケードの一部であると考えられる ( Brattsand et al. 2005. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. J Invest Dermatol 124, 198 - 203 )。

#### 【0010】

したがって、KLK7だけでなくKLK5およびKLK14に対しても活性である阻害剤を特定することが有用であろう。

#### 【0011】

WO 2004 / 108139は、特定の置換されたベンゾオキサジノンおよびチエノオキサジノンの化合物をKLK7の阻害剤として記載しているが、記載された化合物に対する選択性のデータについては報告していない。

#### 【発明の概要】

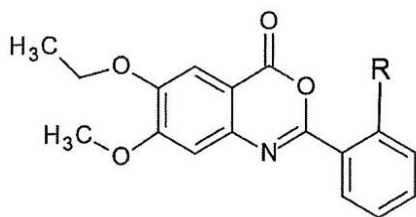
#### 【0012】

本発明者は、皮膚プロテアーゼに選択的な阻害剤を特定することができ、KLK7、KLK5、およびKLK14の活性が、以下の式Iによる化合物によって選択的に阻害され

得ることを発見した：

【 0 0 1 3 】

【 化 1 】



式 I

10

式中、R は、 $-S-CH_3$  または  $-Cl$  である。

【 0 0 1 4 】

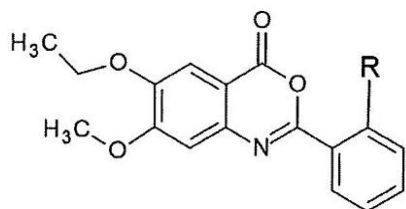
前記化合物は、ネザートン症候群などの炎症性皮膚疾患の病態生理に関係する、皮膚プロテアーゼ K L K 7、K L K 5、および K L K 1 4 に対する選択性などの、幾つかの好適な特性を示し、他のプロテアーゼに対する阻害活性を有していないか、または低い阻害活性しか有していない。

【 0 0 1 5 】

したがって、本発明は、以下の式 1 による化合物を提供し；

【 0 0 1 6 】

【 化 2 】



式 I

20

式中、R は、 $-S-CH_3$  または  $-Cl$ 、あるいはその薬学的に許容可能な塩である。

【 0 0 1 7 】

本発明はさらに、医療における使用のための、式 I による化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

30

【 0 0 1 8 】

化合物は、

6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 2 - ( 2 - メチルスルファニルフェニル ) - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オン、または

2 - ( 2 - クロロフェニル ) - 6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンであり得る。

【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、皮膚病の予防法、予防及び / 又は処置に使用するための、式 I による化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

40

【 0 0 2 0 】

本発明はさらに、薬学的に許容可能なアジュバント、希釈剤及び / 又は担体と組み合わせた式 I による化合物を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明はさらに、皮膚病の予防法、予防及び / 又は処置に使用するための、本発明による医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、皮膚病の処置のための薬剤の製造のための、式 I による化合物またはその薬学的に許容可能な塩の使用に関する。

【 0 0 2 3 】

50

本発明はさらに、必要としている被験体に対する式Ⅰによる治療上活性な量の化合物の投与を含む、皮膚病の予防法、予防及び／又は処置のための方法を提供する。

【0024】

皮膚病は、炎症性皮膚疾患であり得る。皮膚病は、ネザートン症候群、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、湿疹、乾癬、ざ瘡、表皮過角化症、表皮肥厚症、表皮炎症、皮膚炎症およびそう痒症から選択され得る。処置される被験体は、ヒト、イヌ、ネコまたはウマなどの哺乳動物であり得る。

【0025】

定義

本明細書で使用されるように、用語「薬学的に許容可能な塩」は、酸付加塩および塩基付加塩を含む。そのような塩は、例えば、随意に溶媒中で、または塩が不溶性である培地中で、本発明の化合物の遊離酸または遊離塩基の形態を適切な酸または塩基の1つ以上の同等物と反応させ、その後、標準技術を使用して（例えば真空内で又は凍結乾燥によって）、前記溶媒、または前記培地を除去することによって、従来の手段によって形成され得る。塩はまた、適切なイオン交換樹脂を使用して、塩形態の本発明の化合物の対イオンを別の対イオンと交換することによって調製されてもよい。

【0026】

本明細書の文脈において、用語「処置する (treat)」はまた、他に特定の指示がない限り、さらに「予防 (prophylaxis)」を含む。本発明の文脈内の用語「処置する」はさらに、包含する、急性または慢性の先行する疾患状態、あるいは再発性の疾病のいずれかを緩和するために、本発明の有効な量の化合物を投与することを包含する。この定義はまた、再発性の疾病の予防のための予防的治療および慢性障害のための継続的治療を包含する。

【0027】

本発明の化合物は、経口、筋肉内、皮下、局所、鼻腔内、腹腔内、胸腔内、静脈内、硬膜外、鞘内、脳室内を含む任意の経路によって、および関節への注入によって、従来の医薬組成物の形態で投与されてもよい。

【0028】

本発明の一実施形態では、投与経路は局所であってもよい。

【0029】

投与量は、投与経路、疾患の重症度、患者の年齢および体重、および特別の患者のための最も適切な個々のレジメンおよび投与量レベルを決定するときに主治医によって通常考慮される、他の因子に依存するだろう。

【0030】

本発明の化合物から医薬組成物を調製するために、不活性の、薬学的に許容可能な担体は、固体または液体のいずれかであり得る。固形製剤 (Solid form preparations) は、粉末剤、錠剤、分散可能な果粒剤、カプセル剤、カシエ剤、および坐剤を含む。

【0031】

固体担体は、1つ以上の物質であり得、希釈剤、香味剤、可溶化剤、滑沢剤、懸濁化剤、結合剤、または錠剤崩壊剤としても作用し得、また封入材料 (encapsulating material) でもあり得る。

【0032】

粉末剤では、担体は、微粉固体であり、これは、本発明の微粉化合物、または有効成分と混合している。錠剤では、有効成分は、適切な比率で必要な結着性を有している担体と混合され、所望の形状およびサイズに圧縮される。

【0033】

坐剤組成物の調製のために、脂肪酸グリセリドとココアバターの混合物などの低融点ワックスは、最初に溶かされ、有効成分が例えば攪拌によってそこに分散される。その後、溶かされた均質の混合物は、好適にサイズが合わされた鋳型へと注がれ、冷却されて、凝

10

20

30

40

50

固される。

【0034】

適切な担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ラクトース、糖、ペクチン、デキストリン、デンプン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、ココアバターなどである。

【0035】

用語「組成」は、有効成分が（他の担体の有無に関わらず）担体に包まれ、それ故それと関連性を持つカプセルを提供する担体として、封入材料を用いる有効成分の製剤も含むように意図される。同様に、カシエ剤も含まれる。

【0036】

錠剤、粉末剤、カシエ剤、およびカプセル剤は、経口投与に適した固体剤形として使用され得る。

【0037】

液状組成物は、溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む。例えば、活性化合物の滅菌水またはプロピレングリコール溶液は、非経口投与に適した液状製剤であり得る。液状組成物はまた、水性のポリエチレングリコール溶液中で製剤され得る。

【0038】

経口投与のための水溶液は、有効成分を水中に溶解し、必要に応じて適切な着色剤、香味剤、安定剤、および増粘剤を加えることによって調製され得る。経口用途のための水溶液は、天然合成ゴム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および医薬製剤の技術分野に既知の他の懸濁化剤などの粘着性物質とともに、微粉有効成分を水中に分散することによって作られ得る。

【0039】

投与の様式によって、医薬組成物は、本発明の一実施形態に従う本発明の化合物の0.05重量%乃至99重量%（重量パーセント）、他の実施形態に従う0.10重量%乃至50重量%を含み、すべての重量パーセントは、全組成に基づいている。

【0040】

本発明の実施のための治療上有効な量は、個々の患者の年齢、体重および反応を含む既知の基準の使用によって決定され得、当業者によって、処置されている又は予防されている疾患の文脈内で解釈され得る。

【0041】

本発明による化合物を含む医薬組成物のための前述の主題は、本発明による組み合わせを含む医薬組成物についても同様に適用される。

【0042】

本明細書に記載されるあらゆる方法または組成が、本明細書に記載される他の方法または組成に関して実施され得ることが熟慮される。

【0043】

請求項及び／又は明細書における用語「含む（comprising）」とともに使用されるとき単語「a」または「an」の使用は、「1つ（one）」を意味し得るが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つ又は1つを超える」の意味とも一致している。

【0044】

本発明のこれらの及び他の実施形態は、以下の記載および添付の図面とともに考慮されたときに一層よく認識される且つ理解されるだろう。しかしながら、以下の記載が、本発明の様々な実施形態およびそれらの多数の具体的な詳細を示しながら、制限することなく実例によって与えられていることを理解されたい。多くの置換、変更、追加分及び／又は改変が、本発明の精神から逸脱することなく、本発明の範囲内でなされてもよく、本発明はそのような置換、変更、追加分及び／又は改変をすべて含んでいる。

【実施例】

【0045】

10

20

30

40

50



## &lt; 実施例 1 &gt;

ヒトのプロテアーゼの阻害剤としての置換された 3, 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンの選択性

ヒトのプロテアーゼのパネル上の多くの置換された 3, 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンに対する  $IC_{50}$  値を測定した。

## 【0046】

## KLK7 のアッセイ

材料：組換えのヒトの KLK7、Substrate S - 2586 (Chromogenics, cat. no. 820894) の KLK7 活性を、プレートリーダー (Spectramax) において 405 nm で吸光度を測定することによって、96 ウェルのプレートにおいて、0  $\mu$ 、0.1  $\mu$ 、0.5  $\mu$ 、1.0  $\mu$  および 5  $\mu$  の阻害剤の存在下で、終末濃度の 2.5  $\mu$ g/ml (100 nM) の KLK7、1.0 mM の基質、5 % の DMSO を用いて、10 mM の Naリン酸塩、pH 7.2、0.5 M の NaCl において 37 °C で測定した。

10

## 【0047】

## KLK5 のアッセイ

材料：組換えのヒトの KLK5、Substrate S - 2288 (Chromogenics, cat. no. 820852) の KLK5 活性を、プレートリーダー (Spectramax) において 405 nm で吸光度を測定することによって、96 ウェルのプレートにおいて、0  $\mu$ 、0.1  $\mu$ 、1.0  $\mu$  および 10  $\mu$  の阻害剤の存在下で、終末濃度の 2.5  $\mu$ g/ml の KLK5、1 mM の基質、5 % の DMSO を用いて、0.1 M の Tris、pH 8.0、0.15 M の NaCl において 37 °C で測定した。

20

## 【0048】

## KLK14 のアッセイ

材料：組換えのヒトの KLK14、Substrate S - 2302 (Chromogenics, cat. no. 820340) の KLK14 活性を、プレートリーダー (Spectramax) において 405 nm で吸光度を測定することによって、96 ウェルのプレートにおいて、0  $\mu$ 、0.1  $\mu$ 、1.0  $\mu$  および 10  $\mu$  の阻害剤の存在下で、終末濃度の 0.26  $\mu$ g/ml (94 nM) の KLK14、0.75 mM の基質、5 % の DMSO を用いて、0.1 mM の Tris、pH 8.0、0.15 M の NaCl において 37 °C で測定した。

30

## 【0049】

## カテプシン G のアッセイ

材料：カテプシン G、100 mU (VWR, Calbiochem, cat. no. 219373)、Substrate カテプシン G 基質 (VWR, Calbiochem, cat. no. 219407) のカテプシン活性を、プレートリーダー (Spectramax) において 405 nm で吸光度を測定することによって、96 ウェルのプレートにおいて、0  $\mu$ 、0.1  $\mu$ 、1.0  $\mu$  および 10  $\mu$  の阻害剤の存在下で、終末濃度の 1.5 mU/ml (0.75  $\mu$ g/ml、32 nM) のカテプシン G、0.75 mM の基質、5 % の DMSO を用いて、10 mM の Naリン酸塩、pH 7.2、0.5 M の NaCl において 37 °C で測定した。

40

## 【0050】

## キモトリプシンのアッセイ

材料：キモトリプシン、ウシ、25  $\mu$ g (Roche、シークエンスグレード)、Substrate S - 2586 (Chromogenics, cat. no. 820894) のキモトリプシン活性を、プレートリーダー (Spectramax) において 405 nm で吸光度を測定することによって、96 ウェルのプレートにおいて、0  $\mu$ 、0.1  $\mu$ 、1.0  $\mu$  および 10  $\mu$  の阻害剤の存在下で、終末濃度の 0.2  $\mu$ g/ml (6.8 nM) のキモトリプシン、1 mM の基質、5 % の DMSO を用いて、10 mM の Naリン酸塩、pH 7.2、0.5 M の NaCl において 37 °C で測定した。

50

## 【0051】

## トリプシンのアッセイ

材料：トリプシン、100  $\mu$ g (Roche、シークエンスグレード、Mw 23500)、Substrate S-2288 (Chromogenics, cat. no. 820852) のトリプシン活性を、プレートリーダー (Spectramax) において405 nmで吸光度を測定することによって、96ウェルのプレートにおいて、0  $\mu$ 、0.1  $\mu$ 、1.0  $\mu$  および10  $\mu$  の阻害剤の存在下で、終末濃度の0.8  $\mu$ g/ml (34 nM) のトリプシン、1 mMの基質、5 %のDMSOを用いて、10 mMのNaリン酸塩、pH 7.2、0.5 MのNaClにおいて37 で測定した。

## 【0052】

10

## トロンビンのアッセイ

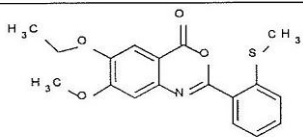
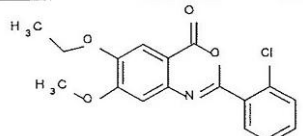
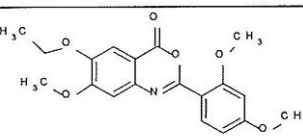
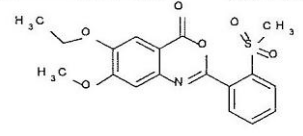
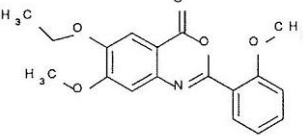
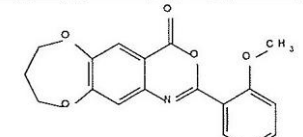
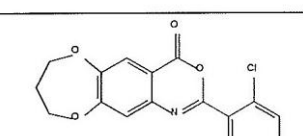
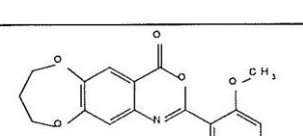
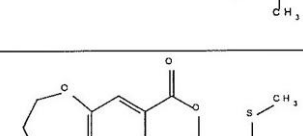
材料：トロンビン (Chromogenics, cat. no. 820712)、Substrate S-2288 (Chromogenics, cat. no. 820852) のトロンビン活性を、プレートリーダー (Spectramax) において405 nmで吸光度を測定することによって、96ウェルのプレートにおいて、0  $\mu$ 、0.1  $\mu$ 、1.0  $\mu$  および10  $\mu$  の阻害剤の存在下で、終末濃度の1 pkat/ml (0.03  $\mu$ g/ml、88 pM) のトロンビン、0.5 mMの基質、5 %のDMSOを用いて、50 mMのTris、pH 8.3、130 mMのNaClにおいて37 で測定した。

## 【0053】

20

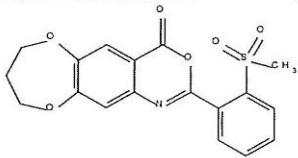
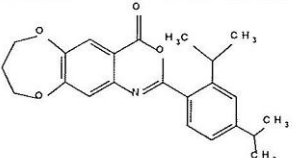
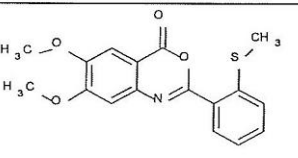
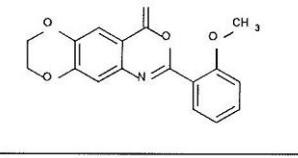
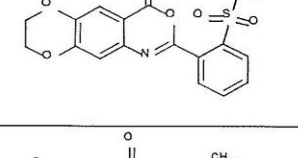
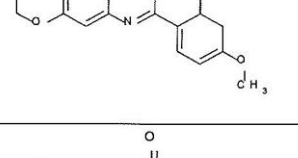
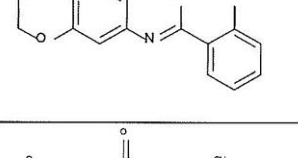
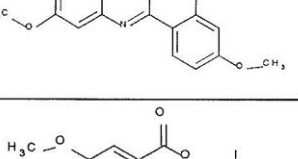
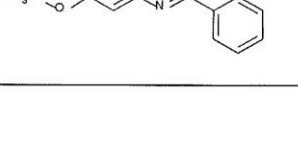
【表 1 - 1】

表 1. 置換された 3, 1-ベンゾキサジン-4-オンの選択性 - IC<sub>50</sub> (μM)

化合物	KLK7	KLK5	KLK14	カテプシン G	キモトリプシン	トリプシン	トロンビン
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

【 0 0 5 4 】

【表 1 - 2】

化合物	KLK7	KLK5	KLK14	カテプ シンG	キモトリ プシン	トリプシン	トロンビン
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

【 0 0 5 5 】

表1で見られるように、化合物1（6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 2 - （2 - メチルスルファニルフェニル） - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オン）および化合物2（2 - （2 - クロロフェニル） - 6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オン）のみが、望ましい選択性、即ち、KLK7に対して0.1 μより下のIC<sub>50</sub>、KL

10

20

30

40

50

K 5 および K L K 1 4 に対して  $1 \mu$  より下の  $IC_{50}$ 、および試験される他のプロテアーゼに対して  $10 \mu$  を超える  $IC_{50}$  を有していることが分かった。

【 0 0 5 6 】

幾つかの化合物は、K L K 5 および K L K 1 4 と同様に K L K 7 に対して強い阻害効果を有していることが分かったが、化合物 1 および 2、即ち、本発明による化合物のみが、他のプロテアーゼに対して十分に低い阻害活性を有していることが実証可能であることに留意されるべきである。

【 0 0 5 7 】

化合物の置換 ( s u b s t a t i o n ) パターンの小さな変化でさえ、化合物の選択性に劇的に影響する。例えば、位置 6 でメトキシ置換されている化合物 1 2 は、位置 6 でエトキシ置換されている化合物 1 と比較して、カテプシン G およびキモトリプシンに対して 10 倍以上高い阻害活性 ( 10 倍低い  $IC_{50}$  として見られる ) を示し、そのため化合物 1 2 は、皮膚病の処置における使用に適していない。

10

【 0 0 5 8 】

要約すると、表 1 に示されたデータは、化合物 1 および 2、即ち、本発明による化合物のみが、皮膚プロテアーゼ K L K 7、K L K 5、および K L K 1 4 に対して高い阻害活性を有して十分に選択的であり、一方で他のプロテアーゼに対して十分に低い阻害活性を有しており、そのため、これらは皮膚病の処置における使用に適していることを実証している。

【 0 0 5 9 】

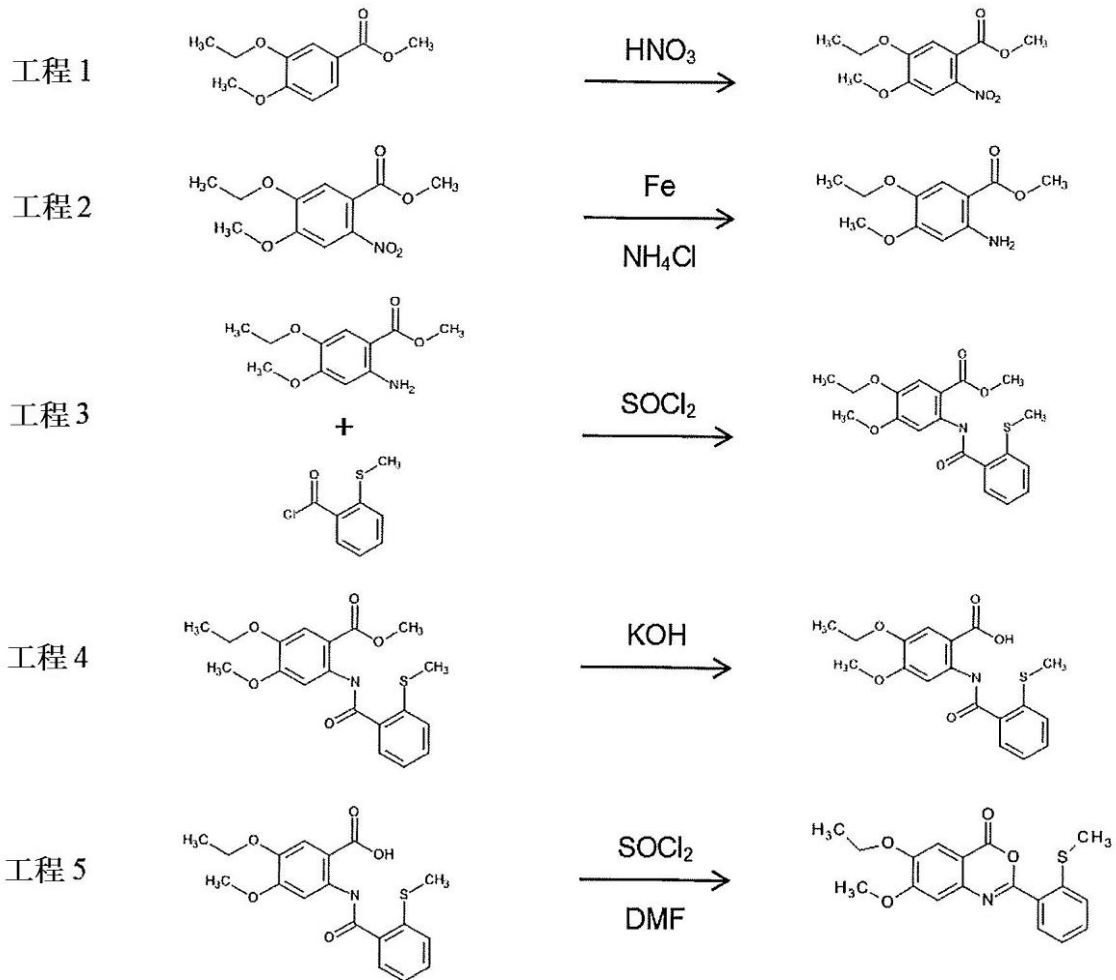
20

< 実施例 2 >

6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 2 - ( 2 - メチルスルファニルフェニル ) - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンの合成

【 0 0 6 0 】

## 【化 3】



10

20

## 【 0 0 6 1 】

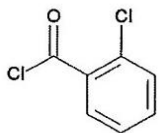
&lt; 実施例 3 &gt;

2 - ( 2 - クロロフェニル ) - 6 - エトキシ - 7 - メトキシ - 3 , 1 - ベンゾキサジン - 4 - オンの合成。

実施例 2 と同じであるが、工程 3 において以下を用いている：

## 【 0 0 6 2 】

## 【化 4】



30

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02	
C 0 7 D 498/04	(2006.01)	C 0 7 D 498/04	1 1 1
A 6 1 K 31/5365	(2006.01)	A 6 1 K 31/5365	

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 2 6 5 8 1 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 D 2 0 1 / 0 0 - 5 2 1 / 0 0  
 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4  
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0  
 C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )