

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 104**

51 Int. Cl.:

A61K 31/554 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2005 E 09013476 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **17.03.2010 EP 2163248**

54 Título: **Derivados de benzotiazepina como inhibidores del receptor de rianodina (RYR2) y su uso en el tratamiento de enfermedades cardiacas**

30 Prioridad:

25.03.2004 US 809089

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

21.01.2013

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
412 LOW LIBRARY, MAIL CODE 4308, 535 WEST
116TH STREET
NEW YORK, NY 10027, US**

72 Inventor/es:

**MARKS, ANDREW R.;
LANDRY, DONALD W.;
DENG, SHIXIAN y
CHENG, ZHEN ZHUANG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 104 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 benzotiazepina como inhibidores del receptor de rianodina (RYR2) y su uso en el tratamiento de enfermedades cardiacas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente de continuación en parte estadounidense con n.º de serie 10/809.089, presentada el 25 de marzo de 2004; que reivindica el beneficio de la solicitud de patente de continuación en parte estadounidense con n.º de serie 10/763.498 presentada el 22 de enero de 2004; que reivindica el beneficio de la solicitud de patente de continuación en parte estadounidense con n.º de serie 10/680.988, presentada el 7 de octubre de 2003; que reivindica el beneficio de la solicitud de patente de continuación en parte estadounidense con n.º de serie 10/608.723, presentada el 26 de junio de 2003; que reivindica el beneficio de la solicitud de patente de continuación estadounidense con n.º de serie 10/288.606, presentada el 5 de noviembre de 2002; que reivindica el beneficio de la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 09/568.474, presentada el 10 de mayo de 2000, ahora la patente estadounidense 6.489.125 B1, expedida el 3 de diciembre de 2002.

Declaración de interés para el gobierno

- 15 Esta invención se realizó con apoyo gubernamental con la subvención de los NIH n.º PO1 HL 67849-01. Como tal, el gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

- 20 A pesar de los avances en el tratamiento, la insuficiencia cardiaca congestiva sigue siendo una causa importante de mortalidad en los países occidentales. La insuficiencia cardiaca afecta a 5 millones de individuos sólo en los Estados Unidos, y se caracteriza por una tasa de mortalidad a los 5 años de ~50% (Levy *et al.*, Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 347: 1397-402, 2002).

- 25 Un distintivo importante de la insuficiencia cardiaca es la contractilidad miocárdica reducida (Gwathmey *et al.*, Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ. Res.*, 61: 70-76, 1987). En el músculo cardiaco sano, y en otro músculo estriado, los canales de liberación de calcio en el retículo sarcoplasmático (RS), incluyendo los receptores de rianodina (RyR), facilitan el acoplamiento de un potencial de acción con la contracción de una célula muscular (es decir, acoplamiento de excitación-contracción (EC)). La contracción se inicia cuando se libera calcio (Ca^{2+}) desde el RS al interior del citoplasma circundante. En la insuficiencia cardiaca, resultan anomalías contráctiles, en parte, por alteraciones en la cascada de señalización que permite al potencial de acción (PA) cardiaco desencadenar la contracción. En particular, en corazones con insuficiencia, la amplitud de los aumentos transitorios de Ca^{2+} de células completas disminuye (Beuckelmann *et al.*, Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ.*, 85: 1046-55, 1992; Gomez *et al.*, Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, 276: 800-06, 1997) y se prolonga la duración (Beuckelmann *et al.*, Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ.*, 85: 1046-55, 1992).

- 35 Se sabe que la arritmia cardiaca, una característica común de la insuficiencia cardiaca, está asociada con fugas de Ca^{2+} de RS en corazones estructuralmente normales. En estos casos, el mecanismo más común para la inducción y el mantenimiento de taquicardia ventricular es el automatismo anormal. Una forma de automatismo anormal, conocida como arritmia desencadenada, está asociada con la liberación aberrante de Ca^{2+} de RS, lo que inicia post-despolarizaciones tardías, o DAD (Fozzard, H.A., Afterdepolarizations and triggered activity. *Basic Res. Cardiol.*, 87: 105-13, 1992; Wit and Rosen, Pathophysiologic mechanisms of cardiac arrhythmias. *Am. Heart J.*, 106: 798-811, 1983). Las DAD son despolarizaciones anómalas en cardiomiocitos que se producen tras la repolarización de un potencial de acción cardiaco. La base molecular para la liberación anómala de Ca^{2+} de RS que da como resultado DAD no se ha aclarado completamente. Sin embargo, se sabe que las DAD se bloquean mediante rianodina, proporcionando evidencias de que RyR2 puede desempeñar un papel clave en la patogenia de esta liberación aberrante de Ca^{2+} (Marban *et al.*, Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *J. Clin. Invest.*, 78: 1185-92, 1986; Song y Belardinelli, ATP promotes development of afterdepolarizations and triggered activity in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, 267: H2005-11, 1994).

- 50 La arritmia cardiaca más común en seres humanos es la fibrilación auricular (FA). Representa una causa principal de morbimortalidad (Chugh *et al.*, Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37: 371-78, 2001; Falk, R.H., Atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.*, 344: 1067-78, 2001). Sin embargo, a pesar de su importancia clínica las opciones de tratamiento para la FA han sido limitadas (debido, en parte, al hecho de que sus mecanismos moleculares subyacentes se entienden escasamente).

- 55 Aproximadamente el 50% de todos los pacientes con enfermedad cardiaca mueren por arritmias cardiacas fatales. Tales arritmias cardiacas fatales son a menudo de naturaleza ventricular. En algunos casos, una arritmia ventricular en el corazón puede ser rápidamente fatal (un fenómeno denominado "muerte súbita cardiaca" (MSC). También pueden producirse arritmias ventriculares fatales (y MCS) en individuos jóvenes, por lo demás sanos, de los que no se sabe que tienen una enfermedad cardiaca estructural. De hecho, la arritmia ventricular es la causa más común de

muerte súbita en individuos por lo demás sanos.

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) es un trastorno heredado en individuos con corazones estructuralmente normales. Se caracteriza por taquicardia ventricular inducida por estrés (una arritmia letal que puede provocar MCS). En sujetos con TVPC, el ejercicio físico y/o estrés inducen taquicardias ventriculares polimórficas y/o bidireccionales que conducen a MCS en ausencia de enfermedad cardíaca estructural detectable (Laitinen *et al.*, Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 103: 485-90, 2001; Leenhardt *et al.*, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children: a 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation*, 91: 1512-19, 1995; Priori *et al.*, Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 106: 69-74, 2002; Priori *et al.*, Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 103: 196-200, 2001; Swan *et al.*, Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 34: 2035-42, 1999).

La TVPC se hereda predominantemente de un modo autosómico dominante. Los individuos con TVPC tienen arritmias ventriculares cuando se someten a ejercicio, pero no desarrollan arritmias en reposo. Estudios de ligamiento y la secuenciación directa han identificado mutaciones en el gen RyR2 humano, en el cromosoma 1q42-q43, en individuos con TVPC (Laitinen *et al.*, Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 103: 485-90, 2001; Priori *et al.*, Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 103: 196-200, 2001; Swan *et al.*, Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 34: 2035-42, 1999).

Existen tres tipos de receptores de rianodina, todos los cuales son canales de Ca^{2+} altamente relacionados. RyR1 se encuentra en el músculo esquelético, RyR2 se encuentra en el corazón y RyR3 está ubicado en el cerebro. El receptor de rianodina de tipo 2 (RyR2) es el principal canal de liberación de Ca^{2+} requerido para el acoplamiento de EC y la contracción muscular en músculo estriado cardíaco.

Los canales RyR2 están empaquetados en disposiciones densas en regiones especializadas del RS que liberan reservas intracelulares de Ca^{2+} y de ese modo desencadenan la contracción muscular (Marx *et al.*, Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281: 818-21, 1998). Durante el acoplamiento de EC, la despolarización de la membrana celular de músculo cardíaco, en fase cero del PA, activa los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje. A su vez, el flujo de entrada de Ca^{2+} a través de estos canales inicia la liberación de Ca^{2+} desde el RS a través de RyR2, en un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Fabiato, A., Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, 245: C1-C14, 1983; Nabauer *et al.*, Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science*, 244: 800-03, 1989). La liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mediada por RyR2 activa entonces las proteínas contráctiles que son responsables de la contracción del músculo cardíaco.

RyR2 es un complejo proteico que comprende cuatro polipéptidos de RyR2 de 565.000 Dalton en asociación con cuatro proteínas de unión a FK506 de 12.000 Dalton (FKBP), específicamente FKBP12.6 (calstabin). Las FKBP son cis-trans peptidil-prolil isomerasas que se expresan ampliamente y sirven para una variedad de funciones celulares (Marks, A.R., Cellular functions of immunophilins. *Physiol. Rev.*, 76:631-49, 1996). Las proteínas FKBP12 están unidas estrechamente a, y regulan la función de, el receptor de rianodina esquelético, RyR1 (Brillantes *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77: 513-23, 1994; Jayaraman *et al.*, FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.*, 267: 9474-77, 1992); el receptor de rianodina cardíaco, RyR2 (Kaftan *et al.*, Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78: 990-97, 1996); un canal de liberación de Ca^{2+} intracelular relacionado, conocido como el receptor de 1,4,5-trifosfato de inositol de tipo 1 (IP3R1) (Cameron *et al.*, FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J. Biol. Chem.*, 272: 27582-88, 1997); y el receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β) de tipo I (T β RI) (Chen *et al.*, Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.*, 16: 3866-76, 1997). FKBP12.6 se une al canal RyR2 (una molécula por subunidad de RyR2), estabiliza la función del canal RyR2 (Brillantes *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77: 513-23, 1994), y facilita la regulación acoplada entre canales RyR2 adyacentes (Marx *et al.*, Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281: 818-21, 1998), impidiendo de ese modo la activación aberrante del canal durante la fase de reposo del ciclo cardíaco.

Resulta evidente que las fugas en los canales RyR2 están asociadas con varios estados patológicos (tanto en corazones enfermos como en corazones estructuralmente normales). Por consiguiente, métodos para reparar las fugas en RyR2 podrían tratar o prevenir la insuficiencia cardíaca, arritmias cardíacas y muerte súbita cardíaca en millones de pacientes.

El derivado de 1,4-benzotiazepina, JTV-519, o monohidrato de 4-[3-(4-bencilpiperidin-1-il)propionil]-7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (también conocido como k201 o ICP-Calstan 100), es un modulador de los canales de ion calcio. Además de regular los niveles de Ca^{2+} en células miocárdicas, JTV-519 también modula la

corriente de Na⁺ y la corriente de K⁺ rectificadora de entrada en células ventriculares de cobaya, e inhibe la corriente de K⁺ rectificadora retardada en células auriculares de cobaya. Estudios han mostrado que JTV-519 tiene un fuerte efecto cardioprotector frente a lesión miocárdica inducida por catecolamina, contracción miofibrilar en exceso inducida por lesión miocárdica y lesión por isquemia/reperfusión. En modelos experimentales de contracción miofibrilar en exceso, JTV-519 demostró mayores efectos cardioprotectores que propranolol, verapamilo y diltiazem. Datos experimentales también han sugerido que JTV-519 previene de manera eficaz la isquemia/reperfusión ventricular reduciendo el nivel de sobrecarga de Ca²⁺ intracelular en modelos animales.

El documento US 2004/0048780 y Ann. N. Y. Acad. Sci 1015: 144-159 (2004) ya dan a conocer la actividad de JTV-519 sobre RyR2 y de ese modo su uso en el tratamiento de insuficiencia cardíaca y arritmias ventriculares.

10 Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que RyR2 es una diana para el tratamiento y la prevención de insuficiencia cardíaca y arritmias cardíacas, incluyendo fibrilaciones auriculares, arritmias ventriculares y arritmias cardíacas inducidas por ejercicio. Tal como se describe en el presente documento, los inventores prepararon canales RyR2 mutantes con 7 mutaciones de TVPC diferentes y estudiaron sus funciones. Los 7 mutantes tenían defectos funcionales que dieron como resultado canales que pasaron a tener fugas (una fuga de calcio) cuando se estimularon durante el ejercicio. El estudio de los inventores es el primero en identificar un mecanismo mediante el que la fuga de calcio del RS provoca DAD. De manera notable, el defecto en los canales mutantes para TVPC hizo que los canales parecieran los canales con fugas en los corazones de pacientes con insuficiencia cardíaca de fase terminal (un trastorno caracterizado por una alta incidencia de arritmias cardíacas fatales). Por tanto, los inventores han mostrado que el mecanismo para las TV en TVPC es el mismo que el mecanismo para las TV en insuficiencia cardíaca.

Los inventores también dan a conocer en el presente documento que JTV-519 (k201 o ICP-Calstan 100), y otros derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos, reparan la fuga en los canales RyR2. Como han mostrado los inventores, JTV-519 y los derivados relacionados potencian la unión de FKBP12.6 a RyR2 fosforilado por PKA, y a RyR2 mutantes que de lo contrario tiene una afinidad reducida por, o no se unen a, FKBP12.6. Esta acción arregla la fuga en RyR2 que desencadena arritmias cardíacas fatales (muerte súbita cardíaca (MSC)) y contribuye a fibrilaciones auriculares/ventriculares y la disfunción del músculo cardíaco en insuficiencia cardíaca.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto según la reivindicación 1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona la composición o el uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.

Aspectos adicionales de la presente invención resultarán evidentes en vista de la descripción que sigue.

Nota: JTV-519 debe considerarse un ejemplo de referencia en la siguiente descripción.

35 Breve descripción de las figuras

La figura 1 demuestra que JTV-519 previene arritmias ventriculares inducidas por ejercicio en ratones FKBP12.6^{+/-}. (A) Electrocardiogramas ambulatorios representativos de un ratón FKBP12.6^{+/-} sin tratar, un ratón FKBP12.6^{+/-} tratado con JTV-519 y un ratón FKBP12.6^{-/-} tratado con JTV-519. No hubo diferencias significativas en la frecuencia cardíaca, o en cualquiera de los parámetros de ECG medidos. (B) trazado superior: ejemplo de taquicardia ventricular polimórfica sostenida, registrada en un ratón FKBP12.6^{+/-} sin tratar sometido a pruebas de ejercicio e inyección con 1,0 mg/kg de epinefrina. trazado central: Electrocardiograma de un ratón FKBP12.6^{+/-} tratado con JTV-519 siguiendo el mismo protocolo; no se detectaron arritmias. trazado inferior: Taquicardia ventricular (TV) inducida por ejercicio en un ratón FKBP12.6^{-/-} tratado con JTV-519. La línea discontinua representa 16,31 segundos de TV que no se muestran en la figura. "P" indica una onda P, que es indicativa de ritmo sinusoidal tras taquicardia ventricular. (C) Gráfico de barras que muestra la cuantificación de muerte súbita cardíaca (izquierda), taquicardias ventriculares sostenidas (>10 latidos, centro) y taquicardias ventriculares no sostenidas (3-10 latidos anómalos, derecha) en ratones FKBP12.6^{+/-} y FKBP12.6^{-/-}, o bien tratados o bien sin tratar con JTV-519, respectivamente. Debe observarse que el tratamiento con JTV-519 previno completamente las arritmias inducidas por ejercicio y por epinefrina en ratones FKBP12.6^{+/-} tratados con JTV-519 (n = 9), en comparación con ratones FKBP12.6^{+/-} sin tratar (n = 10) o ratones FKBP12.6^{-/-} tratados con JTV-519 (n = 5), lo que sugiere que JTV-519 previene arritmias y la muerte súbita en ratones FKBP12.6^{+/-} mediante una nueva unión de FKBP12.6 a RyR2.

La figura 2 muestra que JTV-519 previene la muerte súbita cardíaca (MSC) inducida por ejercicio aumentando la afinidad de FKBP12.6 por RyR2 en ratones FKBP12.6^{+/-}. (A-B) Se sometieron a inmunoprecipitación receptores de rianodina cardíacos (RyR2) usando anticuerpo anti-RyR2-5029. Se muestran inmunotransferencias (A) y gráficos de barras (B) que representan las cantidades cuantificadas de RyR2, RyR2 fosforilado por PKA (anticuerpo anti-RyR2-pSer²⁸⁰⁹) y FKBP12.6 en ratones de tipo natural (FKBP12.6^{+/+}), ratones FKBP12.6^{+/-} y FKBP12.6^{-/-} en condiciones de

reposo, y tras ejercicio, o bien en ausencia o bien en presencia de JTV-519, respectivamente. En condiciones de reposo, ~70% de FKBP12.6 está asociado con RyR2 en ratones FKBP12.6^{+/-}. Tras pruebas de ejercicio, la cantidad de FKBP12.6 asociada con el complejo de RyR2 disminuyó drásticamente en ratones FKBP12.6^{+/-}, pero esto pudo recuperarse mediante el tratamiento con JTV-519. (C) Se aislaron canales individuales de RyR2 de corazones obtenidos tras pruebas de ejercicio e inyección de epinefrina. Se muestran canales de ratones FKBP12.6^{+/-}, con y sin pretratamiento con JTV-519, y canales de ratones FKBP12.6^{-/-} tras pretratamiento con JTV-519. Debe observarse que la función del canal RyR2 se normalizó en el ratón FKBP12.6^{+/-} que había realizado ejercicio, tratado con JTV-519. El canal individual representativo de un ratón FKBP12.6^{+/-} que había realizado ejercicio, tras el tratamiento con JTV-519 muestra que se requiere FKBP12.6 en el corazón para la acción de JTV-519. Las líneas discontinuas representan aperturas de canal incompletas, o aperturas de "subconductancia", y son indicativas de canales RyR2 con reducción de FKBP12.6. Los trazados a la izquierda representan 5,0 s, mientras que los trazados a la derecha representan 500 ms. En la figura, Po = probabilidad de apertura; To = veces abiertas promedio; Tc = veces cerradas promedio; y c = estado cerrado del canal. (D) Gráfico de barras de resumen que muestra las probabilidades de apertura promedio de canales RyR2 individuales (véase anteriormente). JTV-519 reduce drásticamente la probabilidad de apertura de RyR2 de ratones FKBP12.6^{+/-} tras pruebas de ejercicio a concentraciones de calcio diastólico (150 nM).

La figura 3 ilustra que JTV-519 normaliza la regulación del canal RyR2 aumentando la afinidad de unión de FKBP12.6 por canales RyR2 fosforilado por PKA. (A, B) Se prepararon membranas de RS cardíacas caninas (A) y canales RyR2 expresados de manera recombinante (B) tal como se describió anteriormente (Kaftan *et al.*, Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca²⁺-release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78: 990-97, 1996). (A) Se fosforilaron receptores de rianodina (RyR2) con la unidad catalítica de PKA (40 U; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), en presencia o ausencia del inhibidor de PKA, PKI₅₋₂₄, en tampón de fosforilación (MgCl₂ 8 mM, EGTA 10 mM y Tris/PIPES 50 mM; pH 6,8). Se centrifugaron muestras a 100.000x g durante 10 min. y se lavaron tres veces en tampón imidazol (imidazol 10 mM; pH 7). Se añadió FKBP12.6 expresada de manera recombinante (concentración final = 250 nM) a las muestras, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de JTV-519. Tras una incubación de 60-min., se centrifugaron las muestras a 100.000 x g durante 10 min. y se lavaron dos veces en tampón imidazol. Se calentaron las muestras hasta 95°C y se fraccionaron por tamaños usando SDS-PAGE. Se realizó la inmunotransferencia de los microsomas de RS, tal como se describió anteriormente (Jayaraman *et al.*, FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.*, 267: 9474-77, 1992), con anticuerpo anti-FKBP12.6 (1:1.000) y anticuerpo anti-RyR2-5029 (1:3.000). La figura demuestra que JTV-519 permite que FKBP12.6 se una a: (A) RyR2 fosforilado por PKA (unión parcial a 100 nM; unión completa a 1000 nM) o (B) canales mutantes de RyR2-S2809D, que son canales RyR2 fosforilado por PKA de manera constitutiva. (C-E) Estudios de canales individuales muestran un aumento de la probabilidad de apertura de RyR2 tras fosforilación por PKA (D), en comparación con fosforilación por PKA en presencia del inhibidor de PKA específico, PKI₅₋₂₄ (C). Se normalizó la función de canal individual en RyR2 fosforilado por PKA incubado con FKBP12.6 en presencia de JTV-519 (E). Las aperturas de canal son hacia arriba, la raya indica el nivel de aperturas completas (4 pA), y la letra "c" indica el estado cerrado. Se muestran canales a escalas de tiempo comprimidas (5 s, trazado superior) y expandidas (500 ms, trazado inferior), y los registros son a 0 mV. Los histogramas de amplitud (derecha) revelaron un aumento de la actividad y aperturas de subconductancia en RyR2 fosforilado por PKA, pero no tras tratamiento con JTV-519 y FKBP12.6. (F) Representación gráfica normalizada de la probabilidad de apertura como una función del [Ca²⁺]_{cit}. La incubación de RyR2 fosforilado por PKA con FKBP12.6 en presencia de JTV-519 desplazó la dependencia de Ca²⁺ de la activación de RyR2 hacia la derecha, haciéndola similar a la dependencia de Ca²⁺ de los canales no fosforilados.

La figura 4 muestra que JTV-519 mejora la contractilidad cardíaca en un modelo de rata de insuficiencia cardíaca. (A) Se determinó el área de sección transversal diastólica miocárdica a niveles papilares medios usando ecocardiografía, antes y después de un tratamiento de 4 semanas con JTV-519 o vehículo (control). El aumento relativo en la disfunción diastólica se inhibió mediante JTV-519. (B) Aunque la función sistólica se deterioró en los animales sin tratar, JTV-519 aumentó significativamente la función sistólica en ratas con insuficiencia cardíaca tras infarto de miocardio (pos-IM).

La figura 5 demuestra que JTV-519 aumenta la afinidad de la calstabilina 2 (FKBP12.6) por RyR2 en ratas con insuficiencia cardíaca. Se sometieron a inmunoprecipitación cantidades equivalentes de RyR2 usando anticuerpo anti-RyR2 (A). Las inmunotransferencias representativas (A) y los gráficos de barras (B) muestran la cantidad de fosforilación por PKA de RyR2 en Ser2809 (B, izquierda) y la cantidad de calstabilina 2 (FKBP12.6) (B, derecha) unida a RyR2 en los diferentes grupos experimentales. En la insuficiencia cardíaca, el RyR2 se hiperfosforila de manera significativa por PKA (B, izquierda), lo que conduce a la disociación de la calstabilina 2 (FKBP12.6) del complejo de canal (B, derecha). El tratamiento con JTV-519 dio como resultado la normalización tanto del estado de fosforilación por PKA del RyR2 como de la unión de FKBP12.6 a RyR2. El número de experimentos se indica en las barras. *P < 0,05, IC frente a simulación; #P < 0,05, IC+JTV-519 frente a IC.

La figura 6 ilustra que JTV-519 normaliza la regulación de canales RyR2 en corazones con insuficiencia. Se aislaron canales RyR2 de ratas operadas de manera simulada (simulación) o con insuficiencia cardíaca (IC). Trazados de canales individuales representativos muestran que la probabilidad de apertura (Po) de canal RyR2 aumentaba de manera significativa en corazones con insuficiencia (centro), en comparación con ratas operadas de manera

simulada (parte superior). El tratamiento de ratas con insuficiencia cardiaca con JTV-519 durante 4 semanas normalizó la probabilidad de apertura de canal a niveles similares a los de animales operados de manera simulada. Para cada estado, el trazo superior representa 5000 ms y el trazo inferior representa 200 ms. Las aperturas de canal son hacia arriba, la raya indica el nivel completo de apertura de canal (4 pA) y "c" indica el estado cerrado de los canales. Los histogramas de amplitud (derecha) revelaron un aumento de P_o y aperturas de subconductancia en canales RyR2 de corazones con insuficiencia.

La figura 7 demuestra que JTV-519 normaliza la regulación de canales RyR2 aumentando la unión de FKBP12.6 (calstabilina 2) a canales RyR2. (A) Se fosforilaron con PKA canales RyR2 de tipo natural (RyR2-WT) en ausencia o presencia del inhibidor de PKA específico PKI₅₋₂₄, entonces se incubaron con calstabilina 2 (FKBP12.6) en presencia de JTV-519 a las concentraciones indicadas. La inmunotransferencia de RyR2 muestra cantidades iguales de RyR2 en las muestras; la inmunotransferencia de calstabilina 2 muestra que JTV-519 permitió la nueva unión parcial (100 nM) o completa (1000 nM) de calstabilina 2 a RyR2 fosforilado por PKA. (B) RyR2-S2809D, que imita el RyR2 fosforilado por PKA de manera constitutiva, se incubó con calstabilina 2 en presencia de las concentraciones indicadas de JTV-519. La inmunotransferencia de RyR2 muestra cantidades iguales de RyR2 en las muestras; la inmunotransferencia de calstabilina 2 muestra que JTV-519 permite la nueva unión parcial (100 nM) o completa (1000 nM) de la calstabilina 2 a RyR2-S2809D. (C) Las curvas de unión de calstabilina 2 marcada con [³⁵S] muestran que JTV-519 aumenta la afinidad de unión de calstabilina 2 a RyR2 fosforilado por PKA y canales mutantes de RyR2-S2809D, hasta un nivel comparable al RyR2-WT no fosforilado. (D-F) Estudios de canales individuales muestran que JTV-519 (1 μ M) reduce la probabilidad de apertura (P_o) de RyR2-WT fosforilado por PKA mediante la nueva unión de calstabilina 2 a 150 nM [Ca^{2+}] (n = 11 para D; n = 12 para E; n = 13 para F). Las aperturas de canal son hacia arriba, la raya indica el nivel completo de apertura de canal (4 pA) y "c" indica el estado cerrado de los canales. Los histogramas de amplitud (derecha) revelan un aumento de P_o y aperturas de subconductancia en RyR2 fosforilado por PKA; esto no se observó tras el tratamiento con JTV-519 (1 μ M) y calstabilina 2 (FKBP12.6).

La figura 8 ilustra el complejo macromolecular de RyR2 en tejido auricular. (A) Se sometió a inmunoprecipitación RyR2 a partir de retículo sarcoplasmático (RS) auricular y se fosforiló con PKA o adenosina monofosfato cíclico (AMPc). La adición de inhibidor de PKA (PKI) bloqueó completamente la reacción de fosforilación. (B) Se sometieron a inmunoprecipitación conjunta componentes del complejo macromolecular de RyR2 con RyR2 de RS auricular. El control positivo era RS auricular (con el 50% de entrada de inmunoprecipitación (IP)). El control negativo representa muestras sometidas a inmunoprecipitación con anticuerpo bloqueado con el péptido antigénico. (C) Se sometió a inmunoprecipitación conjunta calstabilina 2 (FKBP12.6) con RyR2 de RS auricular. Antes del fraccionamiento por tamaño mediante SDS PAGE, se fosforilaron las muestras con PKA en presencia y ausencia de PKI. La fosforilación por PKA provocó la disociación de la calstabilina 2 (FKBP12.6) del complejo de canal, de una manera inhibida mediante PKI. +Cont. (CSR) = RS auricular; +Cont. (FKBP) = FKBP recombinante; -Cont. = IP realizada con anticuerpo absorbido previamente con péptido antigénico.

La figura 9 muestra la hiperfosforilación por PKA de RyR2 en fibrilación auricular (FA). (A) Se fosforiló con PKA RyR2 sometido a inmunoprecipitación (IP) de animales control (control; n = 6) y perros con fibrilación auricular (A Fib; n = 6). Para experimentos de retrofosforilación, se realizó una inmunotransferencia para RyR2 en paralelo, con el fin de determinar la cantidad de proteína RyR2 que se sometía a inmunoprecipitación en cada muestra. El gráfico de barras a la izquierda representa una cuantificación de los estudios de retrofosforilación. Los valores representan los grados relativos de fosforilación por PKA de RyR2, ajustados para la cantidad de proteína sometida a inmunoprecipitación. Los perros con FA mostraron un aumento del 130% en la fosforilación por PKA, en comparación con los controles (n = 6 para FA; n = 6 para control; P = 0,001). Se sometió a inmunoprecipitación conjunta calstabilina 2 (FKBP12.6) con RyR2. Para los experimentos de inmunoprecipitación conjunta, se realizó una inmunotransferencia para RyR2 en paralelo, con el fin de determinar la cantidad de proteína RyR2 que se sometía a inmunoprecipitación de cada muestra. El gráfico de barras a la derecha representa una cuantificación de los experimentos de inmunoprecipitación conjunta. Los valores representan la cantidad de calstabilina 2 (FKBP12.6) sometida a inmunoprecipitación conjunta con RyR2, ajustados para la cantidad de proteína sometida a inmunoprecipitación. La unión de calstabilina 2 (FKBP12.6) a RyR2 mostró una disminución del 72% en perros con FA, en comparación con los controles (n = 6 para los controles; n = 7 para FA; P < 0,0005). (B) Se realizó una serie idéntica de experimentos usando tejido auricular humano de pacientes con fibrilación auricular en el entorno de insuficiencia cardiaca (A Fib; n = 5) y tejido auricular de pacientes con corazones normales (control; n = 3). El gráfico de barras a la izquierda representa una cuantificación de los estudios de retrofosforilación. Los seres humanos con FA mostraron un aumento del 112% en la fosforilación por PKA, en comparación con los controles (n = 5 para A Fib; n = 3 para el control; P = 0,002). El gráfico de barras a la derecha representa resultados de experimentos de inmunoprecipitación conjunta de calstabilina 2 (FKBP12.6). Los seres humanos con FA mostraron una disminución del 70% en la cantidad de calstabilina 2 (FKBP12.6) unida a RyR2 (n = 5 para A Fib; n = 3 para los controles; P < 0,0001).

La figura 10 ilustra la función de canal RyR2 alterada en FA. (A) Los trazos superiores muestran canales RyR2 representativos de las aurículas izquierdas de los controles; los trazos inferiores son canales de FA. A la derecha de los trazos están los histogramas de amplitud actuales correspondientes. (B) Los gráficos de barras muestran la cuantificación de la probabilidad de apertura (P_o) y la frecuencia de apertura (F_o) para perros control (Cont.) y perros con fibrilación auricular crónica (A Fib). Se estudiaron 17 canales de 5 perros A Fib y 11 canales de 5 perros control.

Los canales de los perros control no demostraron un aumento de la actividad. Por el contrario, 15 de los 17 canales (88%) de perros A Fib mostraron un aumento significativo de la probabilidad de apertura (FA: $0,39 \pm 0,07$; control: $0,009 \pm 0,002$; $P < 0,001$) y la frecuencia de regulación (FA: $21,9 \pm 4,6 \text{ s}^{-1}$; control: $1,6 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$; $P < 0,002$).

5 La figura 11 demuestra que el tratamiento con JTV-519 restaura la función de RyR2 normal en FA. (A) Los trazos representativos de canales RyR2 individuales de corazones de perro, a una concentración de Ca^{2+} citosólica de 150 nM (como se produce durante la diástole) y en presencia de calstabilina 2 (FKBP12.6) 0,25 mM, demuestran un aumento significativo de la probabilidad de apertura (P_o) y la frecuencia de regulación tras la fosforilación por PKA (control: $P_o = 0,3 \pm 0,2\%$, $n = 6$; PKA: $P_o = 14,8 \pm 3,2\%$, $n = 7$; $P < 0,001$). Como se observa a una resolución temporal superior en el trazo inferior, y en el histograma de todos los puntos, la fosforilación por PKA de RyR2 da como resultado aperturas parciales (estados de subconductancia) que se observan cuando la calstabilina 2 (FKBP12.6) se disocia del RyR2. JTV-519 (1,0 mM) restauró la actividad del canal RyR2 fosforilado por PKA ($P_o = 0,8 \pm 0,3\%$; $n = 6$; $P < 0,001$), en comparación con RyR2 tratado con PKA; JTV-519 también dio como resultado una distribución de amplitud actual diferenciada en el histograma, como se observa en canales control sin fosforilar. Los trazos superior e inferior representan 5000 ms y 200 ms, respectivamente; el estado cerrado se indica mediante "c"; se muestran aperturas de canal como desviaciones hacia arriba hasta el nivel de 4 pA, tal como se indica mediante las barras; las líneas discontinuas en los trazos inferiores indican escalones de 1 pA de aperturas parciales. (B) Se incubó calstabilina 2 (FKBP12.6) recombinante con RyR2 fosforilado por PKA, en presencia o ausencia del derivado de 1,4-benzotiazepina, JTV-519. La inmunotransferencia con anticuerpo anti-calstabilina 2 reveló que JTV-519 permitía que la calstabilina 2 (FKBP12.6) recombinante se uniera a RyR2 fosforilado por PKA. En ausencia de JTV-519 no se producía la unión de calstabilina 2.

La figura 12 muestra que los derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos inducen la unión de calstabilina 2 (FKBP12.6) a receptor de rianodina (RyR2) cardiaco fosforilado por PKA a 0,5 nM. Panel superior = 2,0 nM de cada compuesto; panel inferior = 0,5 nM de cada compuesto.

La figura 13 muestra que el derivado de 1,4-benzotiazepina, S36 (ilustrado en la figura 15), previene arritmias cardiacas en ratones a 200 nM. Los gráficos de barras ilustran acontecimientos arrítmicos o muerte súbita cardiaca durante pruebas de ejercicio en ratones FKBP12.6^{+/+} (con o sin tratamiento con fármaco, según se indica). El gráfico izquierdo ilustra muerte súbita cardiaca; el gráfico central ilustra TV sostenida; y el gráfico derecho ilustra TV no sostenida. Los números hacen referencia al número total de animales usados en cada grupo.

La figura 14 demuestra que JTV-519 mejora la contractilidad cardiaca en un modelo de rata de insuficiencia cardiaca.

La figura 15 muestra las estructuras de los derivados. S4, S7, S20, S24, S25, S26 y S27 deben considerarse ejemplos de referencia.

Descripción detallada de la invención

La fosforilación de RyR2 cardiaco por la proteína cinasa (PKA) es una parte importante de la respuesta de "lucha o huida"; aumenta la ganancia de acoplamiento EC cardiaco elevando la cantidad de Ca^{2+} liberada para un desencadenante dado (Marks, A.R., Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ. Res.*, 87:8-11, 2000). Esta ruta de señalización proporciona un mecanismo mediante el cual la activación del sistema nervioso simpático, en respuesta al estrés, da como resultado un gasto cardiaco aumentado requerido para cumplir con las demandas metabólicas de las respuestas al estrés. Tras la unión de catecolaminas, los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos activan la adenilil ciclasa mediante una proteína G estimuladora, G_{α_s} . La adenilil ciclasa aumenta los niveles intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que activan la PKA dependiente de AMPc. La fosforilación por PKA de RyR2 aumenta la probabilidad de apertura del canal disociando calstabilina 2 (FKBP12.6) del complejo de canal. Esto aumenta, a su vez, la sensibilidad de RyR2 a la activación dependiente de Ca^{2+} (Hain *et al.*, Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J. Biol. Chem.*, 270:2074-81, 1995; Valdivia *et al.*, Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg^{2+} and phosphorylation. *Science*, 267:1997-2000, 1995; Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000).

Los corazones con insuficiencia (por ejemplo, en pacientes con insuficiencia cardiaca y en modelos animales de insuficiencia cardiaca) se caracterizan por una respuesta inadaptativa que incluye estimulación hiperadrenérgica crónica (Bristow *et al.*, Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N. Engl. J. Med.*, 307:205-11, 1982). La significación patógena de esta estimulación en la insuficiencia cardiaca está respaldada por estrategias terapéuticas que disminuyen la estimulación beta-adrenérgica y tensión de pared miocárdica ventricular izquierda, y revierten de manera potente la remodelación ventricular (Barbone *et al.*, Comparison of right and left ventricular responses to left ventricular assist device support in patients with severe heart failure: a primary role of mechanical unloading underlying reverse remodeling. *Circulation*, 104:670-75, 2001; Eichhorn y Bristow, Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure. *Circulation*, 94:2285-96, 1996). En la insuficiencia cardiaca, la estimulación beta-adrenérgica crónica está asociada con la activación de receptores beta-adrenérgicos en el corazón, que, aunque se

acoplan con proteínas G, activan la adenilil ciclasa y de ese modo aumentan la concentración intracelular de AMPc. AMPc activa PKA dependiente de AMPc, que se ha mostrado que induce hiperfosforilación de RyR2. Por tanto, la insuficiencia cardíaca crónica es un estado hiperadrenérgico crónico (Chidsey *et al.*, Augmentation of plasma norepinephrine response to exercise in patients with congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 267:650, 1962) que da como resultado varias consecuencias patológicas, incluyendo hiperfosforilación por PKA de RyR2 (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000).

Se ha propuesto la hiperfosforilación por PKA de RyR2 como un factor que contribuye a una función contráctil deprimida y arritmogénesis en insuficiencia cardíaca (Marks *et al.*, Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation*, 105:272-75, 2002; Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000). De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado la hiperfosforilación por PKA de RyR2 en corazones con insuficiencia *in vivo*, tanto en modelos animales como en pacientes con insuficiencia cardíaca que se someten a trasplante de corazón (Antos *et al.*, Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circ. Res.*, 89:997-1004, 2001; Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000; Ono *et al.*, Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} release in heart failure. *Cardiovasc. Res.*, 48:323-31, 2000; Reiken *et al.*, Beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure. *Circulation*, 104:2843-48, 2001; Semsarian *et al.*, The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. *J. Clin. Invest.*, 109:1013-20, 2002; Yano *et al.*, Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation*, 102:2131-36, 2000).

En corazones con insuficiencia, la hiperfosforilación de RyR2 por PKA induce la disociación de la subunidad reguladora FKBP12.6 del canal RyR2 (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000). Esto provoca cambios notables en las propiedades biofísicas del canal RyR2. Tales cambios se evidencian mediante un aumento de la probabilidad de apertura (P_o), debido a un aumento de la sensibilidad a la activación dependiente de Ca^{2+} (Brillantes *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77:513-23, 1994; Kaftan *et al.*, Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78:990-97, 1996); la desestabilización del canal, que da como resultado estados de subconductancia; y la regulación acoplada alterada de los canales, que da como resultado un acoplamiento EC defectuoso y disfunción cardíaca (Marx *et al.*, Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281:818-21, 1998). Por tanto, RyR2 hiperfosforilado por PKA es muy sensible a la estimulación por Ca^{2+} de bajo nivel, y esto se manifiesta en sí mismo como una fuga de Ca^{2+} de RS a través del canal hiperfosforilado.

La respuesta inadaptable al estrés en la insuficiencia cardíaca da como resultado la reducción de FKBP12.6 del complejo macromolecular de canal. Esto conduce a un desplazamiento a la izquierda en la sensibilidad de RyR2 a la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , lo que como resultado canales que son más activos a $[Ca^{2+}]_i$ de baja a moderada (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000; Yamamoto *et al.*, Abnormal Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc. Res.*, 44:146-55, 1999; Yano *et al.*, Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation*, 102:2131-36, 2000). Con el tiempo, el aumento de la "fuga" a través de RyR2 da como resultado el reajuste del contenido de Ca^{2+} de RS a un nivel menor, que reduce a su vez la ganancia de acoplamiento EC y contribuye a una contractilidad sistólica alterada (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000).

Una subpoblación de canales RyR2 que "tienen fugas" de manera particular pueden liberar Ca^{2+} de RS durante la fase de reposo del ciclo cardíaco, la diástole. Esto da como resultado despolarizaciones de la membrana de los cardiomiocitos conocidas como post-despolarizaciones tardías (DAD, *delayed after-depolarizations*), que se sabe que desencadenan arritmias cardíacas ventriculares fatales (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003).

En corazones estructuralmente normales, puede estar interviniendo un fenómeno similar. Específicamente, se sabe que el ejercicio y el estrés inducen la liberación de catecolaminas que activan receptores beta-adrenérgicos en el corazón. La activación de los receptores beta-adrenérgicos conduce a hiperfosforilación de canales RyR2. Las evidencias también sugieren que la hiperfosforilación de RyR2, que resulta de la activación de receptores beta-adrenérgicos, hace que sea más probable que canales RyR2 mutados se abran en la fase de relajación del ciclo cardíaco, aumentando la probabilidad de arritmias.

La presente descripción da a conocer que JTV-519 previene la insuficiencia cardíaca en un modelo de rata de

insuficiencia cardiaca tras IM. En este modelo animal, JTV-519 mejoró la función cardiaca, en cuanto a disfunción diastólica reducida y función sistólica mejorada. Además, la presente descripción ha demostrado que la forma de músculo esquelético del canal RyR, RyR1, es también defectuosa (o tiene fugas) en músculo esquelético con insuficiencia cardiaca, debido a la hiperfosforilación por PKA (Reiken *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12 from the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J. Cell Biol.*, 160:919-28, 2003). Por tanto, se espera que JTV-519 también mejorará la función del músculo esquelético en pacientes con insuficiencia cardiaca. Como tal, JTV-519 proporciona un enfoque terapéutico novedoso para tratar dos síntomas importantes en la insuficiencia cardiaca, la fatiga precoz y la dificultad para respirar, que están provocados por debilidad del músculo esquelético en las extremidades y en el diafragma, respectivamente.

Tal como se comentó anteriormente, la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) es un trastorno heredado en individuos con corazones estructuralmente normales. Se caracteriza por taquicardia ventricular inducida por estrés, una arritmia letal que puede provocar muerte súbita cardiaca (MSC). Las mutaciones en canales RyR2, ubicados en el retículo sarcoplasmático (RS), se han vinculado a la TVPC.

Todos los individuos con TVPC tienen arritmias cardiacas inducidas por ejercicio. Los inventores mostraron anteriormente que la muerte súbita y arritmias inducidas por ejercicio (en pacientes con TVPC) resultan de una afinidad reducida de FKBP12.6 por RyR2. En el presente documento, los inventores han demostrado que el ejercicio activa el RyR2 como resultado de la fosforilación por proteína cinasa (PKA) dependiente de adenosina-3',5'-monofosfato.

Para determinar los mecanismos moleculares subyacentes a las arritmias cardiacas fatales en TVPC, los inventores estudiaron canales RyR2 mutantes asociados con TVPC (por ejemplo, S2246L, R2474S, N4104K, R4497C). Los canales RyR2 mutantes, que tenían una función normal en bicapas lipídicas planas en condiciones basales, eran más sensibles a la activación mediante fosforilación por PKA, que muestra un aumento de actividad (probabilidad de apertura) y estados abiertos prolongados, en comparación con canales de tipo natural. Además, los canales RyR2 mutantes fosforilados por PKA eran resistentes a la inhibición por Mg^{2+} , un inhibidor fisiológico de los canales RyR2, y mostraron una unión reducida a FKBP12.6 (que estabiliza el canal en el estado cerrado). Estos hallazgos indican que, durante el ejercicio, cuando los canales RyR2 se fosforilan por PKA, es más probable que los canales con TVPC mutantes se abran en la fase de relajación del ciclo cardiaco (diástole), aumentando la probabilidad de aparición de arritmias desencadenadas por la fuga de Ca^{2+} de RS. Puesto que la insuficiencia cardiaca es una causa principal de muerte en todo el mundo, métodos para reparar la fuga en RyR2 podrían prevenir arritmias fatales en millones de pacientes.

La presente descripción ha demostrado además en el presente documento que el fármaco, JTV-519, un derivado de 1,4-benzotiazepina, previene las arritmias ventriculares letales en ratones heterocigotos para el gen FKBP12.6. Se ha mostrado recientemente que JTV-519 reduce la fuga de Ca^{2+} de RS diastólica en un modelo animal de insuficiencia cardiaca (Yano *et al.*, FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*, 107:477-84, 2003; Kohno *et al.*, A new cardioprotective agent, JTV519, improves defective channel gating of ryanodine receptor in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 14:14, 2002). La presente descripción examinó la eficacia y el mecanismo de acción de JTV-519 en un modelo de arritmia cardiaca. En los experimentos *in vivo*, se usaron cantidades de gramos de JTV-519 (monoclorhidrato de 4-[3-(4-bencilpiperidin-1-il)propionil]-7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina).

Para someter a prueba las arritmias cardiacas, se sometieron ratones FKBP12.6^{+/-} y FKBP12.6^{-/-} a un protocolo de ejercicio descrito previamente (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003; Mohler *et al.*, Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, 421:634-39, 2003). Aunque el 88% de los ratones FKBP12.6^{+/-} (7 de 8) presentaron taquiarritmias ventriculares (TV) o acontecimientos sincopales durante el protocolo, ninguno de los ratones FKBP12.6^{+/-} (0 de 6) pretratados con JTV-519 desarrolló arritmias o acontecimientos sincopales (figura 1). Además, el 90% de los ratones FKBP12.6^{+/-} (9 de 10) murieron durante o tras ejercicio, mientras que ninguno de los ratones FKBP12.6^{+/-} tratados con JTV-519 (0 de 9) murió (figura 1C). En contraposición a los ratones FKBP12.6^{+/-} pretratados, el 100% de los ratones FKBP12.6^{-/-} (5 de 5) tratados con JTV-519 desarrollaron TV durante el protocolo de estrés y murieron, a pesar del tratamiento con JTV-519 (figura 1C). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que se requiere FKBP12.6 para las acciones antiarrítmicas de JTV-519.

Con el fin de caracterizar adicionalmente las propiedades antiarrítmicas de JTV-519, los inventores sometieron ratones FKBP12.6^{+/+}, FKBP12.6^{+/-} y FKBP12.6^{-/-} a protocolos de estimulación eléctrica programados. Se indujeron TV mediante sobreestimulación con marcapasos rápida en el 71% de los ratones FKBP12.6^{+/-} (5 de 7), pero no en ratones FKBP12.6^{+/+} de tipo natural ($P < 0,05$, $n = 5$), tras la inyección de 0,5 mg/kg isoproterenol. Los ratones FKBP12.6^{+/-} pretratados con JTV-519 (0,5 mg/kg/h) fueron de manera significativa menos susceptible a TV inducidas por sobreestimulación con marcapasos, en comparación con los ratones FKBP12.6^{+/-} sin tratar (1 de 7 frente a 5 de 7; $P < 0,05$). En contraposición, el 67% de los ratones FKBP12.6^{-/-} (4 de 6) pretratados con JTV-519 desarrollaron TV durante la sobreestimulación con marcapasos.

Podían inducirse TV con un único latido prematuro en el 71% de los ratones FKBP12.6^{+/-} (5 de 7). No se observaron TV en los 7 ratones FKBP12.6^{+/-} pretratados con JTV-519. Usando un protocolo de doble latido prematuro (S1-S2-S3), se indujeron TV de manera reproducible en el 100% de los ratones FKBP12.6^{+/-} sin tratar (7 de 7). El tratamiento con JTV-519 eliminó por completo las TV inducibles en los ratones FKBP12.6^{+/-} (7 de 7). El tratamiento con JTV-519 no previno las TV en los ratones FKBP12.6^{-/-}, respaldando el concepto de que se requiere FKBP12.6 para las acciones antiarrítmicas de JTV-519.

Previamente, los inventores demostraron que la fosforilación por PKA de RyR2 en Ser2809 provoca la disociación de FKBP12.6 del canal RyR2 (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000). En el presente estudio, el pretratamiento con JTV-519 (0,5 mg/kg/h) no afectó al grado de fosforilación por PKA de RyR2 en ratones FKBP12.6^{+/-} y FKBP12.6^{-/-} (figura 2). En comparación con los ratones FKBP12.6^{+/+}, los complejos de RyR2 de los ratones FKBP12.6^{+/-} tenían de manera significativa más reducción de FKBP12.6 tras ejercicio (*P < 0,05). El pretratamiento con JTV-519, sin embargo, previno la pérdida de FKBP12.6 del complejo macromolecular de RyR2 en los ratones FKBP12.6^{+/-} durante el ejercicio (figura 2; *P < 0,05).

Las probabilidades de apertura (Po) de los canales RyR2 de los ratones FKBP12.6^{+/-} sometidos a ejercicio aumentaron de manera significativa, en comparación con los canales de ratones FKBP12.6^{+/+} sometidos a ejercicio (+/-: 0,47 ± 0,12, n = 11; +/-: 0,04 ± 0,01, n = 13; P < 0,05). El tratamiento de los ratones FKBP12.6^{+/-} sometidos a ejercicio con JTV-519 (0,5 mg/kg/h) redujo de manera significativa la Po del canal (0,02 ± 0,01, n = 13), en comparación con ratones sometidos a ejercicio no tratados (figura 2). Esta observación concuerda con las cantidades aumentadas de FKBP12.6 en el complejo de RyR2 (figura 2). En contraposición, el tratamiento con JTV-519 de los ratones FKBP12.6^{-/-} sometidos a ejercicio no dio como resultado canales con una baja Po.

Se examinaron canales individuales RyR2 con una baja [Ca²⁺] *cis* (citósólica) de 150 nM, usando Ca²⁺ como el portador de carga. Estas condiciones simulan las del corazón durante la diástole, cuando los canales RyR2 deben tener una baja probabilidad de apertura con el fin de impedir la fuga de Ca²⁺ de RS diastólica que puede desencadenar arritmias cardíacas. Por tanto, la reducción significativa en la Po de RyR2, tal como se observa en los ratones FKBP12.6^{+/-} sometidos a ejercicio tratados con JTV-519, sugiere que los canales RyR2 no "tendrán fugas" durante la diástole d, lo que concuerda con la ausencia de arritmias observadas.

Para examinar adicionalmente el mecanismo mediante el que JTV-519 previene las TV, los inventores simulon las condiciones de ejercicio usando fosforilación por PKA de canales RyR2 de tipo natural (RyR2-WT). Los canales RyR2 fosforilados por PKA se incubaron entonces con FKBP12.6 (250 nM), en presencia de concentraciones crecientes de JTV-519. La incubación con JTV-519 100 nM o 1000 nM indujo la unión de FKBP12.6 a RyR2 fosforilado por PKA (figura 3). JTV-519 también indujo la unión de FKBP12.6 a canales RyR2-S2809D mutantes que imitan los canales RyR2 fosforilados por PKA de manera constitutiva (figura 3).

La afinidad de FKBP12.6 por canales RyR2 fosforilados por PKA aumentó de manera significativa mediante la adición de JTV-519. Las constantes de disociación (K_d) para la unión de FKBP12.6 a los canales fueron de: 148 ± 59,0 nM para RyR2-WT + PKA + PKI₅₋₂₄ (inhibidor de PKA); 1972 ± 39,9 nM para RyR2-WT + PKA; 158 ± 56,4 nM para RyR2 + PKA + JTV-519 (P < 0,05, n = 2 para canales fosforilados por PKA frente a canales fosforilados por PKA con JTV-519) (figura 3). Se obtuvieron resultados similares usando canales mutantes RyR2-S2809D (que imitan los canales fosforilados por PKA de manera constitutiva). Las K_d para la unión de FKBP12.6 fueron de: 2123 ± 104 nM para RyR2-S2809D; y 428 ± 39 nM para RyR2-S2809D + JTV-519. La fosforilación por PKA de RyR2 activó el canal (Po = 0,01 ± 0,002 (PKA + PKI; n = 11) frente a Po = 0,40 ± 0,02 (PKA; n = 12; P < 0,05). La adición de FKBP12.6 (250 nM) a los canales RyR2-WT fosforilados por PKA no disminuyó la Po. Sin embargo, la adición de JTV-519 1 μM más FKBP12.6 redujo la Po hasta niveles comparables a los de los canales no fosforilados por PKA (Po = 0,002 ± 0,001; n = 13; P < 0,05).

Tomados en conjunto, los resultados de los inventores muestran que la reducción de FKBP12.6 del complejo macromolecular de RyR2 (que está asociado con el aumento de la probabilidad de apertura de RyR2, taquicardias ventriculares y muerte súbita cardíaca en los ratones FKBP12.6^{+/-}) se revierte mediante el tratamiento con el derivado de 1,4-benzodiazepina, JTV-519. Por tanto, los inventores han identificado un mecanismo molecular novedoso para tratar arritmias ventriculares: aumentos en la afinidad de RyR2 por FKBP12.6 impiden fugas de calcio de RS diastólicas que desencadenan arritmias. Puesto que la deficiencia de FKBP12.6 en el complejo macromolecular de RyR2 es una característica común en la insuficiencia cardíaca (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000) y en arritmias ventriculares inducidas por ejercicio heredadas (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003), se espera que JTV-519 proporcione una manera novedosa y específica para tratar el defecto molecular en RyR2 que desencadena la muerte súbita cardíaca.

Tal como se comentó anteriormente, la fibrilación auricular es la forma más común de arritmia cardíaca en seres humanos. Hasta la fecha, se ha establecido que la remodelación estructural y la remodelación eléctrica, incluyendo un acortamiento de la refractariedad auricular, pérdida de adaptación de refractariedad relacionada con la frecuencia (Wijffels *et al.*, Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: a study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*,

92:1954-68, 1995; Morillo *et al.*, Chronic rapid atrial pacing: structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation*, 91:1588-95, 1995; Elvan *et al.*, Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs: electrophysiological remodeling. *Circulation*, 94:2953-60, 1996; Gaspo *et al.*, Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation*, 96:4027-35, 1997) y acortamiento de la longitud de onda de ondulaciones de reentrada, acompañan a la taquicardia sostenida (Rensma *et al.*, Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ. Res.*, 62:395-410, 1988). Probablemente, esta remodelación es importante en el desarrollo, el mantenimiento y la progresión de la fibrilación auricular. También se ha sugerido que el manejo del calcio puede desempeñar un papel en la remodelación eléctrica en la fibrilación auricular (Sun *et al.*, Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation*, 98:719-27, 1998; Goette *et al.*, Electrical remodeling in atrial fibrillation: time course and mechanisms. *Circulation*, 94:2968-74, 1996; Daoud *et al.*, Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation-induced electrical remodeling in humans. *Circulation*, 96:1542-50, 1997; Yu *et al.*, Tachycardia-induced change of atrial refractory period in humans: rate dependency and effects of antiarrhythmic drugs. *Circulation*, 97:2331-37, 1998; Leistad *et al.*, Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644. *Circulation*, 93:1747-54, 1996; Tieleman *et al.*, Verapamil reduces tachycardia-induced electrical remodeling of the atria. *Circulation*, 95:1945-53, 1997).

Se ha propuesto una variedad de mecanismos, basados en la función alterada de los canales de calcio, para FA. Por ejemplo, estudios han mostrado una reducción en la corriente de Ca^{2+} de tipo L ($I_{Ca,L}$) y corriente de salida transitoria (I_{to}), en el entorno de taquicardia auricular prolongada (Yue *et al.*, Ionic remodeling underlying potential action changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.*, 81:512-25, 1997). Es probable que la regulación por disminución observada de $I_{Ca,L}$ explique, al menos en parte, el acortamiento del PREA y la pérdida de adaptación de refractariedad relacionada con la frecuencia, siendo ambos distintivos del proceso de remodelación eléctrica que acompaña a la FA (Yue *et al.*, Ionic remodeling underlying potential action changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.*, 81:512-25, 1997). En modelos animales experimentales de estimulación auricular con marcapasos rápida, y en estudios clínicos de seres humanos con FA, verapamilo ha mostrado que inhibe la remodelación eléctrica, lo que sugiere de ese modo que está implicada una sobrecarga de Ca^{2+} (Daoud *et al.*, Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation-induced electrical remodeling in humans. *Circulation*, 96:1542-50, 1997; Leistad *et al.*, Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644. *Circulation*, 93:1747-54, 1996).

Aunque los canales iónicos del sarcolema desempeñan un papel importante en la remodelación que acompaña a la taquicardia auricular y FA, la contribución del manejo de Ca^{2+} intracelular no se ha explorado exhaustivamente. Existen evidencias, sin embargo, para sugerir que el manejo de Ca^{2+} intracelular aberrante sí que desempeña un papel en el proceso de remodelación. Estudios previos han demostrado, por ejemplo, que la pérdida de adaptación a la frecuencia no puede explicarse por completo por corrientes iónicas del sarcolema alteradas, tales como $I_{Ca,L}$ e I_{to} (Ramirez *et al.*, Mathematical analysis of canine atrial action potentials: rate, regional factors, and electrical remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279:H1767-85, 2000; Kneller *et al.*, Remodeling of Ca^{2+} -handling by atrial tachycardia: evidence for a role in loss of rate-adaptation. *Cardiovasc. Res.*, 54:416-26, 2002). Estudios han mostrado también que los cambios inducidos por taquicardia en el manejo de calcio intracelular también contribuyen de manera significativa a la pérdida de adaptación a la frecuencia, lo que se cree que es crítico para la patogenia de FA (Sun *et al.*, Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation*, 98:719-27, 1998; Kneller *et al.*, Remodeling of Ca^{2+} -handling by atrial tachycardia: evidence for a role in loss of rate-adaptation. *Cardiovasc. Res.*, 54:416-26, 2002; Hara *et al.*, Steady-state and nonsteady-state action potentials in fibrillating canine atrium: abnormal rate adaptation and its possible mechanisms. *Cardiovasc. Res.*, 42:455-69, 1999).

En estudios previos, aurículas de un modelo canino de FA inducida mediante estimulación con marcapasos demostró una pérdida de adaptación a la frecuencia-duración de PA-duración, y características de PA alteradas, que podrían revertirse mediante la presencia de rianodina. Estas observaciones sugieren que los cambios resultan, al menos en parte, de un proceso dependiente de Ca^{2+} intracelular (Hara *et al.*, Steady-state and nonsteady-state action potentials in fibrillating canine atrium: abnormal rate adaptation and its possible mechanisms. *Cardiovasc. Res.*, 42:455-69, 1999). Además, en la aurícula de animales caninos con taquicardia auricular inducida por estimulación con marcapasos sostenida, existe una reducción significativa en los aumentos transitorios de Ca^{2+} (Sun *et al.*, Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation*, 98:719-27, 1998).

Dado que los aumentos transitorios de Ca^{2+} resultan de la entrada de Ca^{2+} del sarcolema que desencadena la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el RS a través de RyR2, los resultados de estudios previos sugieren que alteraciones en el manejo de calcio intracelular acompañan al proceso de remodelación inducido por taquicardia. Tales aumentos transitorios de Ca^{2+} disminuidos de manera aberrante se han asociado con el acortamiento deprimido de miocitos auriculares aislados, lo que indica que el manejo de calcio contribuye a la disfunción auricular que acompaña a la FA (Sun *et al.*, Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation*, 98:719-27, 1998).

Tal como se da a conocer en el presente documento, los estudios de los inventores proporcionan evidencias

convincientes de que la homeostasis del calcio desempeña un papel importante en la remodelación eléctrica y contráctil que acompaña a la taquicardia auricular sostenida y FA. La liberación de las reservas de Ca^{2+} de RS por RyR2 se presenta como una componente integral de la homeostasis de Ca^{2+} miocárdico. La regulación de RyR2 se ha caracterizado bien en tejido ventricular de animales caninos y seres humanos, y RyR2 se ha implicado en enfermedades del miocardio ventricular, incluyendo insuficiencia cardiaca y muerte súbita cardiaca (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76, 2000; Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003; Reiken *et al.*, Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation*, 107:2459-66, 2003). A pesar las evidencias de que el manejo de Ca^{2+} desempeña un papel en las arritmias auriculares, la regulación y función del receptor de rianodina auricular no se ha caracterizado bien en este entorno. En particular, antes de la presente invención, no se conocía el papel de este canal en la FA.

Los inventores confirman en el presente documento que, como en el miocardio ventricular, existen canales de liberación de calcio intracelular auriculares como complejos macromoleculares. Los resultados de los experimentos de coinmunoprecipitación de los inventores indican que RyR2 auricular está asociado físicamente con la principal subunidad reguladora, calstabilina 2 (FKBP12.6); con las fosfatasa, PP1 y PP2A; y con las subunidades reguladoras y catalíticas de PKA. Además, los inventores han demostrado que PKA endógena fosforila específicamente RyR2 en retículo sarcoplasmático auricular, lo que da como resultado una reducción de calstabilina 2 (FKBP12.6) en el complejo de canal. Estos hallazgos sugieren que la regulación de la función contráctil en la aurícula podría modularse mediante fosforilación por PKA de RyR2 auricular, de una manera similar a la observada en el miocardio ventricular (Brillantes, *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK-506 binding protein, *Cell*, 77:513-523, 1994).

En el presente estudio, los inventores observaron que la hiperfosforilación por PKA de RyR2 estaba asociada con la reducción de calstabilina 2 (FKBP12.6) en aurículas con FA caninas. De manera similar, los inventores observaron hiperfosforilación por PKA, con reducción asociada de calstabilina (FKBP12.6), en tejido auricular de seres humanos con FA en el entorno de insuficiencia cardiaca. La consecuencia funcional de esta hiperfosforilación anómala por PKA de RyR2 fue el aumento de la probabilidad de apertura en condiciones que simulan la diástole en el corazón (Ca^{2+} citosólico bajo). Tales anomalías funcionales son características de canales que tienen reducción de calstabilina 2 (FKBP12.6) (Brillantes, *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK-506 binding protein, *Cell*, 77:513-523, 1994). Esta función de canal anómala en FA concuerda con estudios previos que demostraron que la pérdida de calstabilina 2 (FKBP12.6) de RyR2, en el entorno de hiperfosforilación por PKA, da como resultado "canales que tienen fugas" que están predispuestos a una fuga de Ca^{2+} diastólica que es secundaria a una sensibilidad aumentada a la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Brillantes *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77:513-23, 1994; Kaftan *et al.*, Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78:990-97, 1996). En ausencia de calstabilina 2 (FKBP12.6), también se sabe que los canales se abren y se cierran (se regulan) de manera estocástica, más que al unísono (regulación acoplada) (Marx *et al.*, Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281:818-21, 1998).

Las evidencias sugieren que FA se inicia normalmente por extrasístoles auriculares prematuras (Bennett y Pentecost, The pattern of onset and spontaneous cessation of atrial fibrillation in man. *Circulation*, 41:981-88, 1970), que se sabe que resultan de post-despolarizaciones (Cranefield, P.F., Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ. Res.*, 41: 415-23, 1977). Se ha observado el reinicio de FA por extrasístoles auriculares, inmediatamente tras la terminación de la arritmia (Timmermans *et al.*, Immediate reinitiation of atrial fibrillation following internal atrial defibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 9:122-28, 1998; Wellens *et al.*, Atrioverter: an implantable device for the treatment of atrial fibrillation. *Circulation*, 98:1651-56, 1998), y se ha vinculado específicamente con post-despolarizaciones tempranas (Burashnikov y Antzelevitch, Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation*, 107:2355-60, 2003). Es particularmente probable que las extrasístoles den lugar a FA en el entorno de un periodo refractario efectivo auricular acortado (Wang *et al.*, Regional and functional factors determining induction and maintenance of atrial fibrillation in dogs. *Am. J. Physiol.*, 271:H148-58, 1996), de manera similar a la que acompaña a la remodelación eléctrica auricular.

Tal como se comentó anteriormente, existen evidencias de que la liberación de Ca^{2+} diastólica aberrante desde RyR2 "con fugas" hiperfosforilado por PKA da como resultado post-despolarizaciones tardías (DAD) suficientes para desencadenar arritmias ventriculares letales (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003). Se cree que el manejo de calcio de RyR2 disfuncional también puede servir para iniciar FA de manera similar. La función de canal anómala observada por los inventores puede contribuir a la patogenia de FA al proporcionar una fuente de DAD necesaria para desencadenar FA, además de contribuir al manejo de calcio disfuncional que es integral en el proceso de remodelación asociado con la arritmia. Dadas las evidencias presentadas en el presente documento de que el miocardio auricular de seres humanos con FA, en el entorno de insuficiencia cardiaca, se hiperfosforila por PKA y tiene calstabilina 2 (FKBP12.6) reducida, la función de RyR2 disfuncional puede explicar, en parte, la frecuencia de arritmias auriculares en pacientes con FA.

La capacidad de JTV-519 para reparar un defecto a nivel molecular específico en el manejo de calcio de RyR2 hace que sea un candidato fascinante para un agente terapéutico novedoso. El potencial de JTV-519 está subrayado por el número creciente de enfermedades cardíacas importantes, incluyendo insuficiencia cardíaca y arritmias ventriculares fatales, que implican la regulación disfuncional de RyR2 (es decir, la hiperfosforilación por PKA y la pérdida de calstabin 2 (FKBP12.6) del complejo de canal pueden ser factores de contribución importantes en su patogenia).

Los estudios iniciales de JTV-519 centrados en sus propiedades anti-isquémicas (Personal Communication, Aetas). Más recientemente, sin embargo, se ha mostrado que JTV-519 inhibe la inducción de FA en un modelo de pericarditis estéril canina de fibrilación auricular (Kumagai *et al.*, Antiarrhythmic effects of JTV-519, a novel cardioprotective drug, on atrial fibrillation / flutter in a canine sterile pericarditis model. J. Cardiovasc. Electrophysiol., 14:880-84, 2003). Este estudio no definió, sin embargo, el mecanismo a través del que JTV-519 tenía un impacto sobre la inducibilidad y el mantenimiento de FA.

Tal como se demuestra en el presente documento, los inventores han determinado que el tratamiento con JTV-519 (1 μ M) permite que la calstabin 2 recombinante (FKBP12.6) se una a RyR2 fosforilado por PKA que se ha aislado de miocardio canino normal *in vitro*. La asociación de calstabin 2 (FKBP12.6) con RyR2 fosforilado por PKA no se produjo con los canales sin tratar. La reasociación de calstabin 2 (FKBP12.6) con el complejo de canal restaura la función normal en canales hiperfosforilados por PKA. Por tanto, la restauración de la función del canal RyR2 puede desempeñar un papel en la capacidad de JTV-519 para inhibir la inducibilidad y el mantenimiento de FA, tal como observaron Kumagai *et al.* (Antiarrhythmic effects of JTV-519, a novel cardioprotective drug, on atrial fibrillation / flutter in a canine sterile pericarditis model. J. Cardiovasc. Electrophysiol., 14:880-84, 2003).

La fibrilación auricular es un proceso electrofisiológico complejo; es probable que su patogenia molecular sea multifactorial. El manejo de Ca^{2+} miocárdico aberrante parece contribuir de manera significativa al proceso patológico. Los estudios de los inventores sugieren que la función del canal de liberación de Ca^{2+} intracelular anómala, que resulta de la hiperfosforilación por PKA de RyR2, puede contribuir al proceso de remodelación en FA, y podría servir potencialmente como un desencadenante para la arritmia.

Métodos de tratamiento y prevención novedosos usando JTV-519

Según lo anterior, el presente documento da a conocer un método para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, "FKBP12.6" incluye tanto una "proteína FKBP12.6" como un "análogo de FKBP12.6". A menos que se indique de otro modo en el presente documento, "proteína" incluirá proteína, dominio de proteína, polipéptido o péptido, y cualquier fragmento de los mismos. Un "análogo de FKBP12.6" es una variante funcional de la proteína FKBP12.6, que tiene actividad biológica de FKBP12.6, que tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 60% o más con la proteína FKBP12.6. Tal como se usa adicionalmente en el presente documento, el término "actividad biológica de FKBP12.6" se refiere a la actividad de una proteína o péptido que demuestra una capacidad para asociarse físicamente con, o unirse con, RyR2 sin fosforilar o no hiperfosforilado (es decir, la unión de aproximadamente dos veces, o, más preferiblemente, de aproximadamente cinco veces, por encima de la unión de nivel inicial de un control negativo), en las condiciones de los ensayos descritos en el presente documento, aunque la afinidad puede ser diferente de la de FKBP12.6.

Además, tal como se usa en el presente documento, "RyR2" incluye tanto una "proteína RyR2" (por ejemplo, proteína RyR2 auricular o proteína RyR2 ventricular) y un "análogo de RyR2". Un "análogo de RyR2" es una variante funcional de la proteína RyR2, que tiene actividad biológica de RyR2, que tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 60% o más con la proteína RyR2. Tal como se usa en el presente documento, el término "análogo de RyR2" incluye RyR1 (la isoforma de músculo esquelético de RyR2) y RyR3. El RyR2 de la presente invención puede estar sin fosforilar, fosforilado (por ejemplo, por PKA), o hiperfosforilado (por ejemplo, por PKA); preferiblemente, el RyR2 está fosforilado o hiperfosforilado. Tal como se usa adicionalmente en el presente documento, el término "actividad biológica de RyR2" se refiere a la actividad de una proteína o péptido que demuestra una capacidad para asociarse físicamente con, o unirse con, FKBP12.6 (es decir, la unión de aproximadamente dos veces, o, más preferiblemente, de aproximadamente cinco veces, por encima de la unión de nivel inicial de un control negativo), en las condiciones de los ensayos descritos en el presente documento, aunque la afinidad puede ser diferente de la de RyR2.

Tal como se describió anteriormente, el receptor de rianodina cardíaco, RyR2, es un complejo proteico que comprende cuatro proteínas RyR2 de 565.000 Dalton en asociación con cuatro proteínas FKBP12.6 de 12.000 Dalton. Las proteínas de unión a FK506 (FKBP) son peptidil-prolil cis-trans isomerasas que se expresan ampliamente, y sirven para una variedad de funciones celulares. La proteína FKBP12.6 se une estrechamente a, y regula la función de, RyR2. FKBP12.6 se une al canal RyR2, una molécula por subunidad de RyR2, estabiliza la función del canal RyR2, y facilita la regulación acoplada entre canales RyR2 vecinos, impidiendo de ese modo la activación aberrante del canal durante la fase de reposo del ciclo cardíaco. Por consiguiente, tal como se usa en el presente documento, el término "FKBP12.6 unida a RyR2" incluye una molécula de una proteína FKBP12.6 que se une a una subunidad de proteína RyR2 o un tetrámero de FKBP12.6 que está en asociación con un tetrámero de RyR2. El término "FKBP12.6 unida a RyR2" también incluye una subunidad de proteína RyR2 que se une a una molécula de una proteína FKBP12.6, o un tetrámero de RyR2 que está en asociación con un tetrámero de

FKBP12.6. Por tanto, “una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto” incluye una disminución en el nivel de RyR2 unido a FKBP12.6 en un sujeto, y una disminución en el nivel de un complejo FKBP12.6-RyR2 en un sujeto.

5 Según el método descrito en el presente documento, una “disminución” en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto se refiere a un descenso, una disminución o una reducción detectable en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto. Se limita o impide una disminución de este tipo en el sujeto cuando la disminución se detiene, impide, obstruye o reduce de algún modo mediante la administración de JTV-519 (tal como se describe a continuación), de manera que el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto es mayor del que habría de otro modo en ausencia de JTV-519. El “nivel” de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto se refiere al nivel global en el sujeto, incluyendo el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en la sangre (circulación), tejidos y células (por ejemplo, citoplasma o núcleo) del sujeto. A modo de ejemplo, entonces, puede lograrse una disminución en el nivel global de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto mediante una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en la sangre, en un tejido y/o en células del sujeto.

15 El nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto puede detectarse mediante ensayos y técnicas convencionales, incluyendo los determinados fácilmente a partir de la técnica conocida (por ejemplo, técnicas inmunológicas, análisis de hibridación, inmunoprecipitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, técnicas de obtención de imágenes por fluorescencia y/o detección de radiación, etc.), así como cualquier ensayo y método de detección dado a conocer en el presente documento. Por ejemplo, puede aislarse proteína y purificarse a partir de células de un sujeto usando métodos convencionales conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, extracción de las células (por ejemplo, con un detergente que solubiliza la proteína) cuando sea necesario, seguido por purificación por afinidad en una columna, cromatografía (por ejemplo, FTLC y HPLC), inmunoprecipitación (con un anticuerpo) y precipitación (por ejemplo, con isopropanol y un reactivo tal como Trizol). El aislamiento y la purificación de la proteína pueden estar seguidos por electroforesis (por ejemplo, sobre un gel de SDS-poliacrilamida). Puede determinarse una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto, o la limitación o el impedimento de la misma, comparando la cantidad de FKBP12.6 unida a RyR2 detectada antes de la administración de un agente terapéutico/preventivo (por ejemplo, JTV-519 u otro derivado de 1,4-benzotiazepina, según los métodos descritos a continuación) con la cantidad detectada en un tiempo adecuado tras la administración del agente terapéutico/preventivo.

30 En el método descrito actualmente, puede limitarse o impedirse una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto (por ejemplo, en células del sujeto), por ejemplo, inhibiendo la disociación de FKBP12.6 y RyR2 en el sujeto; aumentando la unión entre FKBP12.6 y RyR2 en el sujeto; o estabilizando el complejo RyR2-FKBP12.6 en el sujeto. Tal como se usa en el presente documento, el término “inhibir la disociación” incluye bloquear, disminuir, inhibir, limitar o impedir la disociación física o separación de una subunidad de FKBP12.6 de una molécula de RyR2 en el sujeto, y bloquear, disminuir, inhibir, limitar o impedir la disociación física o separación de una molécula de RyR2 de una subunidad de FKBP12.6 en el sujeto. Tal como se usa adicionalmente en el presente documento, el término “aumentar la unión” incluye potenciar, aumentar o mejorar la capacidad de RyR2 fosforilado para asociarse físicamente con FKBP12.6 (por ejemplo, la unión de aproximadamente dos veces, o, más preferiblemente, de aproximadamente cinco veces, por encima de la unión de nivel inicial de un control negativo) en el sujeto, y potenciar, aumentar o mejorar la capacidad de FKBP12.6 para asociarse físicamente con RyR2 fosforilado (por ejemplo, la unión de aproximadamente dos veces, o, más preferiblemente, de aproximadamente cinco veces, por encima de la unión de nivel inicial de un control negativo) en el sujeto.

45 Adicionalmente, en el método descrito actualmente, puede limitarse o impedirse una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto (por ejemplo, en células de un sujeto) disminuyendo directamente el nivel de RyR2 fosforilado en el sujeto, o disminuyendo indirectamente el nivel de RyR2 fosforilado en el sujeto (por ejemplo, mediante selección como diana de una enzima (tal como PKA) u otra molécula endógena que regule o module las funciones o los niveles de RyR2 fosforilado en las células). Preferiblemente, el nivel de RyR2 fosforilado en el sujeto disminuye en al menos el 10% en el método de la presente invención. Más preferiblemente, el nivel de RyR2 fosforilado disminuye en al menos el 20%.

50 Según el método descrito actualmente, se limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto (por ejemplo, en células de un sujeto). El sujeto de la presente invención puede ser cualquier animal, incluyendo anfibios, aves, peces, mamíferos y marsupiales, pero es preferiblemente un mamífero (por ejemplo, un ser humano; un animal doméstico, tal como un gato, perro, mono, ratón o rata; o un animal comercial, tal como una vaca o cerdo). En determinadas realizaciones de la presente invención, el sujeto tiene, o es un candidato para, un estado cardíaco. Los ejemplos de un “estado cardíaco” incluyen, sin limitación, arritmias cardíacas (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca y muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio.

60 La arritmia cardíaca es una alteración de la actividad eléctrica del corazón que se manifiesta como una anomalía en la frecuencia cardíaca o el ritmo cardíaco. La taquicardia (por ejemplo, taquicardia auricular, de la unión (nodal), ventricular y paroxística) es un estado asociado con una rapidez excesiva en la acción del corazón, particularmente cuando la frecuencia cardíaca es superior a 100 por min. Una taquiarritmia es una taquicardia asociada con una

irregularidad en el ritmo cardiaco normal. La arritmia cardiaca inducida por ejercicio es un estado cardiaco (por ejemplo, una fibrilación ventricular o taquicardia ventricular, incluyendo cualquiera que conduzca a muerte súbita cardiaca) que se desarrolla durante/tras haberse sometido un sujeto a ejercicio físico.

5 Una fibrilación auricular es un ejemplo de taquiarritmia. Más específicamente, la fibrilación auricular es un estado asociado con un ritmo cardiaco anómalo e irregular, en el que se generan señales eléctricas de forma caótica en la totalidad de las cámaras superiores, o aurículas, del corazón. Los síntomas comunes de la fibrilación auricular incluyen, sin limitación, palpitaciones (una incómoda conciencia del latido rápido e irregular del corazón). La fibrilación auricular también puede dar como resultados coágulos sanguíneos que se desplazan desde el corazón hasta el cerebro, provocando un accidente cerebrovascular. El tratamiento actual de la fibrilación auricular implica el control de factores de riesgo, la administración de medicaciones para ralentizar la frecuencia cardiaca y/o convertir el corazón a un ritmo normal, y la prevención de complicaciones asociadas con la formación de coágulos sanguíneos.

La insuficiencia cardiaca es un estado que se manifiesta mediante una función contráctil (contractilidad) disminuida del corazón. Los síntomas de insuficiencia cardiaca incluyen dificultad para respirar, disminución de la tolerancia al ejercicio y fatiga muscular temprana.

15 Un "candidato" para un estado cardiaco (por ejemplo, arritmia cardiaca o insuficiencia cardiaca) es un sujeto que se sabe que corre, o que se cree que corre, o se sospecha que corre, el riesgo de desarrollar un estado cardiaco. Los ejemplos de candidatos para un estado cardiaco incluyen, sin limitación, un animal/una persona que se sospecha que tiene arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio) y/o insuficiencia cardiaca; y un animal/una persona que se sabe que corre, o que se cree que corre, o se sospecha que corre, el riesgo de desarrollar arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio.

25 Un "candidato" para arritmia cardiaca inducida por ejercicio es un sujeto que se sabe que corre, o que se cree que corre, o se sospecha que corre, el riesgo de desarrollar arritmia cardiaca durante/tras ejercicio físico. Los ejemplos de candidatos para arritmia cardiaca inducida por ejercicio incluyen, sin limitación, un animal/una persona que se sabe que tiene taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC); un animal/una persona que se sospecha que tiene TVPC; y un animal/una persona que se sabe que corre, o que se cree que corre, o se sospecha que corre, el riesgo de desarrollar arritmia cardiaca durante/tras ejercicio físico, y que está a punto de hacer ejercicio, está haciendo ejercicio actualmente o acaba de completar el ejercicio. Tal como se comentó anteriormente, TVPC es un trastorno heredado en individuos con corazones estructuralmente normales. Se caracteriza por taquicardia ventricular inducida por estrés, una arritmia letal que puede provocar muerte súbita cardiaca. En sujetos con TVPC, el ejercicio físico y/o el estrés inducen taquicardias ventriculares polimórficas y/o bidireccionales que conducen a muerte súbita cardiaca (MSC) en ausencia de enfermedad cardiaca estructural detectable. Los individuos con TVPC tienen arritmias ventriculares cuando se someten a ejercicio, pero no desarrollan arritmias en reposo.

40 En el método descrito actualmente, las células de un sujeto son preferiblemente células de músculo estriado. Un músculo estriado es un músculo en el que las unidades de repetición (sarcómeros) de las miofibrillas contráctiles se disponen en alineación con la totalidad de la célula, lo que da como resultado estriaciones transversales u oblicuas que puede observarse al nivel de un microscopio óptico. Los ejemplos de células de músculo estriado incluyen, sin limitación, células de músculo voluntario (esquelético) y células de músculo cardiaco. En una realización preferida, la célula usada en el método de la presente invención es una célula de músculo cardiaco humana. Tal como se usa en el presente documento, el término "célula de músculo cardiaco" incluye fibras de músculo cardiaco, tales como las que se encuentran en el miocardio del corazón. Las fibras de músculo cardiaco se componen de cadenas de células de músculo cardiaco contiguas, o cardiomiocitos, unidas extremo con extremo en discos intercalados. Estos discos presentan dos clases de uniones celulares: desmosomas expandidos que se extienden a lo largo de sus partes transversales, y uniones comunicantes, encontrándose las más grandes de las mismas a lo largo de sus partes longitudinales.

50 En el método descrito actualmente, se limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto (por ejemplo, en células de un sujeto) administrando JTV-519 al sujeto; esto permitiría entonces el contacto entre células del sujeto y JTV-519. JTV-519 (monoclorhidrato de 4-[3-(4-bencilpiperidin-1-il)propionil]-7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina), también conocido como k201, es un derivado de 1,4-benzotiazepina, y un modulador de canales iónicos de calcio. Además de regular los niveles de Ca^{2+} en células miocárdicas, JTV-519 modula la corriente de Na^+ y la corriente de K^+ rectificadora de entrada en células ventriculares de cobaya, e inhibe la corriente de K^+ rectificadora tardía en células auriculares de cobaya. FK506 y rapamicina son fármacos que pueden usarse para diseñar otros compuestos que estabilizan el complejo RyR2-FKBP12.6 en el sujeto de la presente invención. FK506 y rapamicina disocian ambos FKBP12.6 de RyR2. Es posible diseñar y/o seleccionar compuestos que están relacionados estructuralmente con estos fármacos, pero tienen los efectos opuestos.

60 En el método descrito actualmente, JTV-519 puede administrarse a un sujeto a modo de una composición

terapéutica, que comprende JTV-519 y un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la composición, y no perjudicial para el receptor del mismo. El portador farmacéuticamente aceptable empleado en el presente documento se selecciona de diversos materiales orgánicos o inorgánicos que se usan como materiales para formulaciones farmacéuticas, y que pueden incorporarse como agentes analgésicos, tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, emulsionantes, excipientes, extendedores, deslizantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes de tonicidad, vehículos y agentes de aumento de la viscosidad. Si es necesario, también pueden añadirse aditivos farmacéuticos, tales como antioxidantes, agentes aromáticos, colorantes, agentes de mejora del aroma, conservantes y edulcorantes. Los ejemplos de portadores farmacéuticos aceptables incluyen carboximetilcelulosa, celulosa cristalina, glicerina, goma arábica, lactosa, estearato de magnesio, metilcelulosa, polvos, solución salina, alginato de sodio, sacarosa, almidón, talco y agua, entre otros.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Por ejemplo, el JTV-519 puede ponerse en asociación con un portador o diluyente, como una suspensión o disolución. Opcionalmente, también pueden añadirse uno o más componentes auxiliares (por ejemplo, tampones, agentes aromatizantes, agentes tensioactivos, y similares). La elección del vehículo dependerá de la vía de administración.

Puede administrarse JTV-519 a un sujeto poniendo en contacto células diana (por ejemplo, células de músculo cardíaco) *in vivo* en el sujeto con el JTV-519. Puede ponerse en contacto JTV-519 con (por ejemplo, introducirse en) células del sujeto usando técnicas conocidas utilizadas para la introducción y administración de proteínas, ácidos nucleicos y otros fármacos. Los ejemplos de métodos para poner en contacto las células con (es decir, tratar las células con) JTV-519 incluyen, sin limitación, absorción, electroporación, inmersión, inyección, introducción, suministro de liposomas, transfección, transfusión, vectores, y otros vehículos y métodos de administración de fármacos. Cuando las células diana se localizan en una parte particular de un sujeto, puede ser deseable introducir el JTV-519 directamente en las células, mediante inyección o mediante cualquier otro medio (por ejemplo, introduciendo el JTV-519 en la sangre u otro líquido corporal). Las células diana pueden estar contenidas, por ejemplo, en tejido cardíaco de un sujeto, y pueden detectarse en tejido cardíaco del sujeto mediante métodos de detección convencionales determinados fácilmente a partir de la técnica, cuyos ejemplos incluyen, sin limitación, técnicas inmunológicas (por ejemplo, tinción inmunohistoquímica), técnicas de obtención de imágenes por fluorescencia y técnicas microscópicas.

Adicionalmente, el JTV-519 descrito actualmente puede administrarse a un sujeto humano o animal mediante procedimientos conocidos, incluyendo, sin limitación, administración oral, administración parenteral y administración transdérmica. Preferiblemente, el JTV-519 se administra por vía parenteral, mediante inyección epifascial, intracapsular, intracraneal, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, subcutánea o sublingual, o a modo de catéter. En una realización, el agente se administra al sujeto a modo de suministro dirigido a células de músculo cardíaco mediante un catéter insertado en el corazón del sujeto.

Para administración oral, una formulación de JTV-519 puede presentarse como cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, o como una suspensión. La formulación puede tener aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata. La formulación también puede presentarse con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábica, almidón de maíz o gelatinas. Adicionalmente, la formulación puede presentarse con disgregadores, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica. La formulación también puede presentarse con fosfato de calcio dibásico anhidro o glicolato sódico de almidón. Finalmente, la formulación puede presentarse con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio.

Para administración parenteral (es decir, administración mediante inyección a través de una vía distinta al tubo digestivo), puede combinarse JTV-519 con una disolución acuosa estéril que es preferiblemente isotónica con la sangre del sujeto. Puede prepararse una formulación de este tipo resolviendo un principio activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles, tales como cloruro de sodio, glicina, y similares, y que tiene un pH tamponado compatible con las condiciones fisiológicas, de modo que se produzca una disolución acuosa, entonces haciendo que dicha disolución sea estéril. La formulación puede presentarse en envases de dosis únicas o múltiples, tales como viales o ampollas selladas. La formulación puede suministrarse mediante cualquier modo de inyección, incluyendo, sin limitación, epifascial, intracapsular, intracraneal, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, subcutánea o sublingual, o a modo de catéter en el corazón del sujeto.

Para administración transdérmica, puede combinarse JTV-519 con potenciadores de penetración de la piel, tales como propilenglicol, polietilenglicol, isopropanol, etanol, ácido oleico, N-metilpirrolidona, y similares, que aumentan la permeabilidad de la piel al JTV-519, y permiten que el JTV-519 penetre a través de la piel y al torrente sanguíneo. La composición de JTV-519/potenciador también puede combinarse adicionalmente con una sustancia polimérica, tal como etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etileno/acetato de vinilo, polivinilpirrolidona, y similares, para proporcionar la composición en forma de gel, que puede disolverse en un disolvente, tal como cloruro de metileno, evaporarse hasta la viscosidad deseada, y entonces aplicarse al material de refuerzo para obtener un parche.

Según lo descrito en el presente documento, puede administrarse JTV-519 al sujeto (y puede ponerse en contacto JTV-519 con células del sujeto) en una cantidad eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto, particularmente en células del sujeto. Esta cantidad puede determinarse fácilmente por el experto, basándose en procedimientos conocidos, incluyendo análisis de curvas de titulación establecidas *in vivo*, y métodos y ensayos dados a conocer en el presente documento. Una cantidad adecuada de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto puede oscilar entre aproximadamente 5 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día, y/o puede ser una cantidad suficiente para lograr niveles plasmáticos que oscilan entre aproximadamente 300 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml. Preferiblemente, la cantidad de JTV-519 oscila entre aproximadamente 10 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día.

En una realización del método, el sujeto no ha desarrollado aún un estado cardíaco, tal como una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio. En este caso, la cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para prevenir un estado cardíaco (por ejemplo, arritmia cardíaca, insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en el sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, una cantidad de un fármaco (por ejemplo, JTV-519) "eficaz para prevenir un estado cardíaco" incluye una cantidad del fármaco (por ejemplo, JTV-519) eficaz para prevenir el desarrollo del deterioro clínico o síntomas del estado cardíaco. Por ejemplo, cuando el estado cardíaco es fibrilación auricular, la cantidad de JTV-519 eficaz para prevenir fibrilación auricular puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para prevenir palpitaciones y/o coágulos sanguíneos en el sujeto. De manera similar, cuando el estado cardíaco es arritmia cardíaca inducida por ejercicio, la cantidad de JTV-519 eficaz para prevenir arritmia cardíaca inducida por ejercicio puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para prevenir palpitaciones inducidas por ejercicio, desmayos, fibrilación ventricular, taquicardia ventricular y muerte súbita cardíaca en el sujeto. Adicionalmente, cuando el estado cardíaco es insuficiencia cardíaca, la cantidad de JTV-519 eficaz para prevenir insuficiencia cardíaca puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para prevenir dificultad para respirar, disminución de la tolerancia al ejercicio y fatiga muscular temprana en el sujeto.

La cantidad de un fármaco (por ejemplo, JTV-519) eficaz para prevenir un estado cardíaco en un sujeto variará dependiendo de los factores particulares de cada caso, incluyendo el tipo de estado cardíaco, el peso del sujeto, la gravedad del estado del sujeto, y el modo de administración del fármaco (por ejemplo, JTV-519). Esta cantidad puede determinarse fácilmente por el experto, basándose en procedimientos conocidos, incluyendo ensayos clínicos, y métodos dados a conocer en el presente documento. En una realización de la presente invención, la cantidad de un fármaco (por ejemplo, JTV-519) eficaz para prevenir arritmia cardíaca inducida por ejercicio es una cantidad de un fármaco (por ejemplo, JTV-519) eficaz para prevenir muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio en el sujeto. En otra realización, el fármaco (por ejemplo, JTV-519) previene al menos un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en el sujeto.

Debido a su capacidad para estabilizar FKBP12.6 unida a RyR2, y mantener y restaurar el equilibrio en el contexto de la fosforilación dinámica por PKA y desfosforilación de RyR2, JTV-519 también puede ser útil en el tratamiento de un sujeto que ya ha comenzado a experimentar síntomas clínicos de un estado cardíaco. Si los síntomas del estado cardíaco se observan en el sujeto lo suficientemente pronto, JTV-519 podría ser eficaz en la limitación o el impedimento de una disminución adicional en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto.

Por consiguiente, en otra realización el sujeto ha desarrollado un estado cardíaco. Por ejemplo, el sujeto ha estado haciendo ejercicio, o está actualmente haciendo ejercicio, y ha desarrollado arritmia cardíaca inducida por ejercicio. En tal caso, la cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para tratar un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio) o insuficiencia cardíaca) en el sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, una cantidad de un fármaco (por ejemplo, JTV-519) "eficaz para tratar un estado cardíaco" incluye una cantidad de un fármaco (por ejemplo, JTV-519) eficaz para aliviar o mejorar el deterioro clínico o síntomas del estado cardíaco. Por ejemplo, cuando el estado cardíaco es fibrilación auricular, la cantidad de JTV-519 eficaz para tratar fibrilación auricular puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para aliviar o mejorar palpitaciones y/o coágulos sanguíneos en el sujeto. De manera similar, cuando el estado cardíaco es arritmia cardíaca inducida por ejercicio, la cantidad de JTV-519 eficaz para tratar arritmia cardíaca inducida por ejercicio puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para aliviar o mejorar palpitaciones inducidas por ejercicio, desmayos, fibrilación ventricular y taquicardia ventricular en el sujeto. Adicionalmente, cuando el estado cardíaco es insuficiencia cardíaca, la cantidad de JTV-519 eficaz para tratar insuficiencia cardíaca puede ser una cantidad de JTV-519 eficaz para aliviar o mejorar dificultad para respirar, disminución de la tolerancia al ejercicio y fatiga

muscular temprana en el sujeto.

La cantidad de un fármaco (por ejemplo, JTV-519) eficaz para tratar un estado cardiaco en un sujeto variará dependiendo de los factores particulares de cada caso, incluyendo el tipo de estado cardiaco, el peso del sujeto, la gravedad del estado del sujeto y el modo de administración del fármaco (por ejemplo, JTV-519). Esta cantidad puede determinarse fácilmente por el experto, basándose en procedimientos conocidos, incluyendo ensayos clínicos, y métodos dados a conocer en el presente documento. En una realización preferida, el fármaco (por ejemplo, JTV-519) trata al menos un estado cardiaco en el sujeto.

La presente invención proporciona además un método para tratar al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio) o insuficiencia cardiaca) en un sujeto. El método puede comprender administrar JTV-519 al sujeto en una cantidad eficaz para tratar al menos un estado cardiaco en el sujeto. Una cantidad adecuada de JTV-519 eficaz para tratar un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio) o insuficiencia cardiaca) en un sujeto puede oscilar entre aproximadamente 5 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día, y/o puede ser una cantidad suficiente para lograr niveles plasmáticos que oscilan entre aproximadamente 300 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml.

La presente invención también proporciona un método para prevenir al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio) en un sujeto. El método puede comprender administrar JTV-519 al sujeto en una cantidad eficaz para prevenir al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio) en un sujeto puede oscilar entre aproximadamente 5 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día, y/o puede ser una cantidad suficiente para lograr niveles plasmáticos que oscilan entre aproximadamente 300 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml.

En diversas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la arritmia cardiaca inducida por ejercicio en el sujeto está asociada con TV. En realizaciones preferidas, la TV es TVPC. En otras realizaciones de estos métodos, el sujeto es un candidato para arritmia cardiaca inducida por ejercicio, incluyendo un candidato para muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio.

Adicionalmente, en vista de los métodos anteriores, la presente descripción también enseña el uso de JTV-519 en un método para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto que tiene, o es un candidato para, al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio). La presente descripción también proporciona el uso de JTV-519 en un método para tratar o prevenir al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio) en un sujeto.

Métodos de selección novedosos

Tal como se comentó anteriormente y se presenta en el presente documento, los datos de los inventores muestran que la fosforilación por la proteína cinasa A (PKA) del receptor de rianodina cardiaco, RyR2, en la serina 2809 activa el canal liberando la proteína de unión a FK506, FKBP12.6. En corazones con insuficiencia (incluyendo corazones humanos y modelos animales de insuficiencia cardiaca), RyR2 se hiperfosforila por PKA, lo que da como resultado canales defectuosos que tienen cantidades disminuidas de FKBP12.6 unida, y tienen una sensibilidad aumentada a la activación inducida por calcio. El resultado neto de estos cambios es que los canales RyR2 "tienen fugas". Estas fugas de canal pueden dar como resultado una reducción de las reservas intracelulares de calcio en tal grado que ya no existe suficiente calcio en el retículo sarcoplasmático (RS) para proporcionar un estímulo intenso para la contracción muscular. Esto da como resultado una débil contracción del músculo cardiaco. Como una segunda consecuencia de la fuga del canal, los canales RyR2 liberan calcio durante la fase de reposo del ciclo cardiaco conocida como "diástole". Esta liberación de calcio durante la diástole puede desencadenar las arritmias fatales de los corazones (por ejemplo, taquicardia ventricular y fibrilación ventricular) que provocan muerte súbita cardiaca (MSC).

Los inventores también han mostrado que el tratamiento de la insuficiencia cardiaca con un dispositivo de bombeo mecánico, denominado dispositivo de asistencia ventricular izquierda (DAVI), que pone el corazón en reposo y

restaura la función normalizada, se asocia con una reducción en la hiperfosforilación por PKA de RyR2, y la función normalizada del canal. Además, los inventores han mostrado que el tratamiento de perros (que tienen insuficiencia cardiaca inducida por estimulación con marcapasos) con bloqueantes beta-adrenérgicos (betabloqueantes) revierte la hiperfosforilación por PKA de RyR2. Los betabloqueantes inhiben la ruta que activa PKA. La conclusión que puede extraerse a partir de los resultados del trabajo de los inventores es que la fosforilación por PKA de RyR2 aumenta la actividad del canal, lo que da como resultado la liberación de más calcio en la célula para un desencadenante (activador) dado del canal.

Tal como se da a conocer adicionalmente en el presente documento, los inventores han establecido que los estados cardiacos (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio) están asociadas con un aumento en fosforilación de proteínas RyR2 (particularmente proteínas mutantes de RyR2 asociadas con TVPC) y una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2. Es posible usar este mecanismo para diseñar fármacos eficaces para el tratamiento y la prevención de tales estados cardiacos. Un agente candidato que tiene la capacidad para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 puede tener, como consecuencia de esta actividad de limitación o impedimento, un efecto sobre un acontecimiento biológico asociado con RyR2, tratando o previniendo de ese modo tales estados cardiacos.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona además un método para identificar un agente para su uso en el tratamiento o la prevención de al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio). El método comprende las etapas de: (a) obtener o generar un cultivo de células que contienen RyR2; (b) poner en contacto las células con un agente candidato; (c) exponer las células a una o más condiciones de las que se sabe que aumentan la fosforilación de RyR2 en las células; y (d) determinar si el agente limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en las células.

Tal como se usa en el presente documento, un "agente" incluirá una proteína, polipéptido, péptido, ácido nucleico (incluyendo ADN o ARN), anticuerpo, fragmento Fab, fragmento F(ab')₂, molécula, compuesto, antibiótico, fármaco, y cualquier combinación de los mismos. Un agente que limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 puede ser o bien natural o bien sintético, y puede ser un agente reactivo con (es decir, un agente que tiene afinidad por, se une a o se dirige contra) RyR2 y/o FKBP12,6. Tal como se usa adicionalmente en el presente documento, una célula "que contiene RyR2" es una célula (preferiblemente, una célula de músculo cardiaco) en la que RyR2, o un derivado u homólogo del mismo, se expresa de manera natural o se produce de manera natural. Las condiciones de las que se sabe que aumentan la fosforilación de RyR2 en las células incluyen, sin limitación, PKA.

En el método de la presente descripción, pueden ponerse en contacto células con un agente candidato mediante cualquiera de los métodos convencionales de efectuar un contacto entre fármacos/agentes y células, incluyendo cualquier modo de introducción y administración descrito en el presente documento. El nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en la célula puede medirse o detectarse mediante procedimientos conocidos, incluyendo cualquiera de los métodos, procedimientos moleculares y ensayos conocidos por un experto en la técnica o descritos en el presente documento. En una realización de la presente invención, el agente limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en las células.

Tal como se da a conocer en el presente documento, RyR2 se ha implicado en varios acontecimientos biológicos en células de músculo estriado. Por ejemplo, se ha mostrado que los canales RyR2 desempeñan un papel importante en el acoplamiento EC y la contractilidad en células de músculo cardiaco. Por tanto, está claro que los fármacos terapéuticos o preventivos diseñados para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en las células, particularmente células de músculo cardiaco, pueden ser útiles en la regulación de varios acontecimientos biológicos asociados con RyR2, incluyendo acoplamiento EC y contractilidad. Por tanto, una vez que se ha seleccionado el agente candidato de la presente invención, y se ha determinado que tiene un efecto de limitación o impedimento adecuado sobre la disminución de los niveles de FKBP12.6 unida a RyR2, puede evaluarse para determinar su efecto sobre el acoplamiento EC y la contractilidad en células, particularmente células de músculo cardiaco. Se espera que el agente terapéutico/preventivo de la presente invención sea útil para tratar o prevenir estados cardiacos, incluyendo arritmias cardiacas (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca y muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio.

Por consiguiente, el método de la presente descripción puede comprender además las etapas de: (e) poner en contacto el agente candidato con un cultivo de células que contienen RyR2; y (f) determinar si el agente tiene un efecto sobre un acontecimiento biológico asociado con RyR2 en las células. Tal como se usa en el presente documento, un "acontecimiento biológico asociado con RyR2" incluye un proceso bioquímico o fisiológico en el que se han implicado los niveles o la actividad de RyR2. Tal como se da a conocer en el presente documento, los ejemplos de acontecimientos biológicos asociados con RyR2 incluyen, sin limitación, acoplamiento EC y

contractilidad en células de músculo cardíaco. Según este método de la presente invención, puede ponerse en contacto un agente candidato con una o más células (preferiblemente, células de músculo cardíaco) *in vitro*. Por ejemplo, puede incubarse un cultivo de las células con una preparación que contiene el agente candidato. Entonces puede evaluarse el efecto del agente candidato sobre un acontecimiento biológico asociado con RyR2 mediante cualquier método o ensayo biológico conocido en la técnica, incluyendo inmunotransferencia, registros de canal individual y cualquier otro dado a conocer en el presente documento.

La presente descripción describe adicionalmente un agente identificado mediante el método de identificación descrito anteriormente, así como una composición farmacéutica que comprende el agente y un portador farmacéuticamente aceptable. El agente puede ser útil para prevenir muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio en un sujeto, y para tratar o prevenir otros estados asociados con RyR2. Tal como se usa en el presente documento, un "estado asociado con RyR2" es un estado, enfermedad, o trastorno en el que se ha implicado el nivel o la actividad de RyR2, e incluye un acontecimiento biológico asociado con RyR2 y un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio).

El estado asociado con RyR2 puede tratarse o prevenirse en el sujeto administrando al sujeto una cantidad del agente eficaz para tratar o prevenir el estado asociado con RyR2 en el sujeto. Esta cantidad puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir al menos un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en un sujeto, administrando el agente al sujeto en una cantidad eficaz para tratar o prevenir al menos un estado cardíaco en el sujeto.

La presente descripción también proporciona un método *in vivo* para identificar un agente para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio). El método comprende las etapas de: (a) obtener o generar un animal que contiene RyR2; (b) administrar un agente candidato al animal; (c) exponer el animal a una o más condiciones de las que se sabe que aumentan la fosforilación de RyR2 en las células; y (d) determinar si el agente limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el animal. El método puede comprender además las etapas de (e) administrar el agente a un animal que contiene RyR2; y (f) determinar si el agente tiene un efecto sobre un acontecimiento biológico asociado a RyR2 en el animal. También se proporciona un agente identificado mediante este método; una composición farmacéutica que comprende este agente; y un método para tratar o prevenir al menos un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en un sujeto, administrando este agente al sujeto en una cantidad eficaz para tratar o prevenir al menos un estado cardíaco en el sujeto.

El trabajo de los inventores ha demostrado que se esperaría que los compuestos que bloquean la activación por PKA reduzcan la activación del canal RyR2, lo que da como resultado menor liberación de calcio en la célula. También se esperaría que los compuestos que se unen al canal RyR2 en el sitio de unión a FKBP12.6, pero que no salen del canal cuando se fosforila el canal por PKA, disminuyan la actividad del canal en respuesta a la activación por PKA u otros desencadenantes que activan el canal RyR2. Tales compuestos también darían como resultado menor liberación de calcio en la célula. En vista de estos hallazgos, la presente descripción proporciona además ensayos adicionales para identificar agentes que pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención de estados cardíacos (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio), porque bloquean o inhiben la activación de RyR2.

A modo de ejemplo, los ensayos de diagnóstico de la presente descripción pueden seleccionar la liberación de calcio en células mediante el canal RyR2, usando colorantes fluorescentes sensibles a calcio (por ejemplo, Fluo-3, Fura-2, y similares). Pueden cargarse células con el colorante fluorescente de elección, entonces estimularse con activadores de RyR2 para determinar si los compuestos añadidos a la célula reducen o no la señal fluorescente dependiente de calcio (Brillantes *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77:513-23, 1994; Gillo *et al.*, Calcium entry during induced differentiation in murine erythroleukemia cells. *Blood*, 81:783-92, 1993; Jayaraman *et al.*, Regulation of the inositol 1,4,5-trisfosfato receptor by tyrosine phosphorylation. *Science*, 272:1492-94, 1996). Pueden monitorizarse las señales fluorescentes dependientes de calcio con un tubo fotomultiplicador, y analizarse con el software apropiado, tal como se describió anteriormente (Brillantes *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77:513-23, 1994; Gillo *et al.*, Calcium entry during induced differentiation in murine erythroleukemia cells. *Blood*, 81:783-92, 1993; Jayaraman *et al.*, Regulation of the inositol 1,4,5-trisfosfato receptor

by tyrosine phosphorylation. *Science*, 272:1492-94, 1996). Este ensayo puede automatizarse fácilmente para seleccionar grandes números de compuestos usando placas de múltiples pocillos.

Para identificar compuestos que inhiben la activación dependiente de PKA de la liberación de calcio intracelular mediada por RyR2, un ensayo puede implicar la expresión de canales RyR2 recombinantes en un sistema de expresión heterólogo, tal como células Sf9, HEK293 o CHO (Brillantes *et al.*, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77:513-23, 1994). También podría coexpresarse RyR2 con receptores beta-adrenérgicos. Esto permitiría la evaluación del efecto de compuestos sobre la activación de RyR2, en respuesta a la adición de agonistas de los receptores beta-adrenérgicos.

También puede someterse a ensayo el nivel de fosforilación por PKA de RyR2 que se correlaciona con el grado de insuficiencia cardíaca, y entonces usarse para determinar la eficacia de los compuestos diseñados para bloquear la fosforilación por PKA del canal RyR2. Un ensayo de este tipo puede basarse en el uso de anticuerpos que son específicos para la proteína RyR2. Por ejemplo, la proteína canal RyR2 puede inmunoprecipitarse, y entonces se retrofosforiló por PKA y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. La cantidad de marcador radiactivo [^{32}P] que se transfiere a la proteína RyR2 puede medirse entonces usando un aparato Phosphorimager (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000).

Otro ensayo de la presente descripción implica el uso de un anticuerpo específico de fosfoepítipo que detecta RyR2 que se fosforila por PKA en Ser 2809. Puede usarse la inmunotransferencia con un anticuerpo de este tipo para evaluar la eficacia de la terapia para insuficiencia cardíaca y arritmias cardíacas. Adicionalmente, pueden usarse ratones con inserción (*knock-in*) de RyR2 S2809A y RyR2 S2809D para evaluar la eficacia de la terapia para insuficiencia cardíaca y arritmias cardíacas. Tales ratones proporcionan además evidencias de que la hiperfosforilación por PKA de RyR2 es un factor contribuyente en insuficiencia cardíaca y arritmias cardíacas, mostrando que la mutación RyR2 S2809A inhibe la insuficiencia cardíaca y las arritmias, y que la mutación RyR2 S2809D empeora la insuficiencia cardíaca y las arritmias.

Derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos y métodos de síntesis de los mismos

Los derivados de 1,4-benzotiazepina, particularmente los derivados de 2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina, son elementos estructurales importantes en la preparación de moléculas biológicamente activas, que incluyen JTV-519. Los inventores han desarrollado un procedimiento novedoso para preparar compuestos intermedios de 1,4-benzotiazepina, tales como 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina. El procedimiento de los inventores utiliza materiales de partida fácilmente disponibles y baratos, y proporciona altos rendimientos de productos intermedios clave de 1,4-benzotiazepina.

A principios de los años 1990, Kaneko *et al.* (patente estadounidense 5.416.066; documento WO 92/12148; documento JP4230681) dieron a conocer que JTV-519 podía prepararse mediante haciendo reaccionar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (un producto intermedio de 1,4-benzotiazepina) con cloruro de acrililoilo, y entonces haciendo reaccionar el producto resultante con 4-bencilpiperidina.

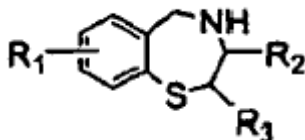
Dos procedimientos para la preparación de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina y compuestos similares se han notificado previamente en la bibliografía. El primer procedimiento, dado a conocer por Kaneko *et al.* (patente estadounidense n.º 5.416.066), implicaba una ruta de síntesis de seis etapas que partía de ácido 2,5-dihidroxibenzoico. En este procedimiento, se metiló selectivamente ácido 2,5-dihidroxibenzoico con sulfato de dimetilo. Entonces se hacía reaccionar el compuesto resultante con cloruro de dimetiltiocarbamoilo durante 20 h, y entonces se sometía a alta temperatura (270°C) durante 9 h. Se sometía a reflujo el producto de esta etapa con metóxido de sodio en metanol durante 20 h. Se hacía reaccionar entonces el producto de la etapa de reflujo con 2-cloroetilamina, en condiciones básicas y a una temperatura alta, para producir una amida ciclada. Se redujo la amida ciclada con LiAlH_4 para proporcionar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (un producto intermedio de 1,4-benzotiazepina).

El segundo procedimiento para la preparación de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina se dio a conocer por Hitoshi en una patente japonesa (documento JP 10045706). Este procedimiento partía de 2-bromo-5-metoxibenzaldehído. Se sustituyó el bromuro por NaSMe, y se oxidó el producto resultante con cloro, seguido por reflujo en agua, para proporcionar el dialdehído del disulfuro. Se trató el dialdehído con 2-cloroetilamina, y se redujo el producto resultante con un agente reductor, tal como NaBH_4 . Se cicló el compuesto resultante para dar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina.

Inicialmente, los inventores trataron de preparar el producto intermedio de 1,4-benzotiazepina, 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina, usando los métodos descritos anteriormente. Sin embargo, encontraron que el primer procedimiento, descrito por Kaneko *et al.* (patente estadounidense n.º 5.416.066), implicaba etapas de síntesis de alta temperatura y largo tiempo de reacción. Además, los inventores descubrieron que el grupo tio en el tercer producto intermedio tiolado se oxidaba fácilmente por el aire para dar un compuesto de disulfuro, haciendo imposible sintetizar el producto ciclado posterior. Los inventores también determinaron que el procedimiento descrito por Hitoshi (documento JP 10045706) implicaba Cl_2 , y que tenía que usarse otro método patentado para la preparación

del primer producto intermedio, aparte de la sustitución de bromuro por NaSMe.

5 Para superar los problemas anteriores, los inventores desarrollaron un procedimiento novedoso para preparar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina a partir de materiales de partida fácilmente disponibles y baratos. El procedimiento de los inventores simplifica las etapas de aislamiento y de purificación etapas, y puede usarse para preparar varios productos intermedios de 1,4-benzotiazepina, incluyendo 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina y otros compuestos que tienen la estructura general mostrada en fórmula:



R1 = n-MeO, n-MeS, n-alkilo, n = 6, 7, 8, 9

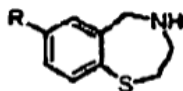
R2 = alquilo

R3 = alquilo

10

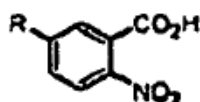
Este procedimiento también puede usarse para preparar JTV-519.

Por consiguiente, en vista de lo anterior, la presente descripción proporciona un método para la síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:

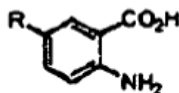


15 en la que R = OR', SR', NR', alquilo o haluro y R' = alquilo, arilo o H, y en la que R puede estar en la posición 2, 3, 4 ó 5, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) tratar un compuesto que tiene la fórmula:

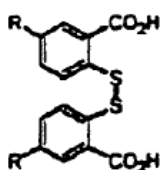


20 en la que R es tal como se definió anteriormente, con un agente reductor, en presencia de un catalizador opcional, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R es tal como se definió anteriormente;

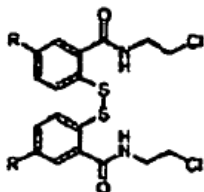
(b) tratar el compuesto formado en la etapa (a) con un agente de diazotación y un disulfuro, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



25

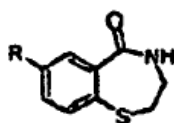
en la que R es tal como se definió anteriormente;

(c) tratar el compuesto formado en la etapa (b) con un agente de activación y cloroetilamina, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



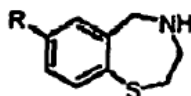
en la que R es tal como se definió anteriormente;

5 (d) tratar el compuesto formado en la etapa (c) con un agente reductor y una base, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R es tal como se definió anteriormente; y

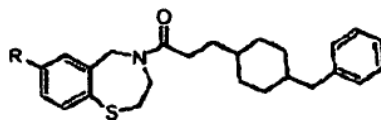
10 (e) tratar el compuesto formado en la etapa (d) con un agente reductor, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R es tal como se definió anteriormente.

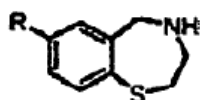
15 Según el método de la presente descripción, el agente reductor en la etapa (a) puede ser H₂. Adicionalmente, el agente de diazotación en la etapa (b) puede ser NaNO₂, y el disulfuro en la etapa (b) puede ser Na₂S₂. Además, el cloruro en la etapa (c) puede ser SOCl₂. El agente reductor en la etapa (d) puede ser trimetilfosfina (PMe₃), mientras que la base en la etapa (d) es trietilamina. En otra realización, el agente reductor en la etapa (e) es LiAlH₄.

La presente descripción proporciona además un método para la síntesis de un compuesto de que tiene la fórmula:

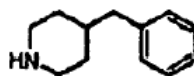


20 en la que R = OR', SR', NR', alquilo o haluro y R' = alquilo, arilo o H, y en la que R puede estar en la posición 2, 3, 4 ó 5, comprendiendo dicho método la etapa de:

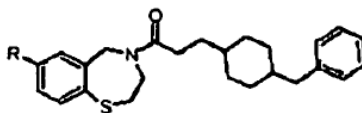
(a) tratar un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R es tal como se definió anteriormente, con cloruro 3-bromopropiónico y un compuesto que tiene la fórmula:

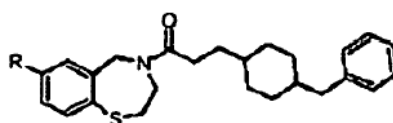


para formar un compuesto que tiene la fórmula:

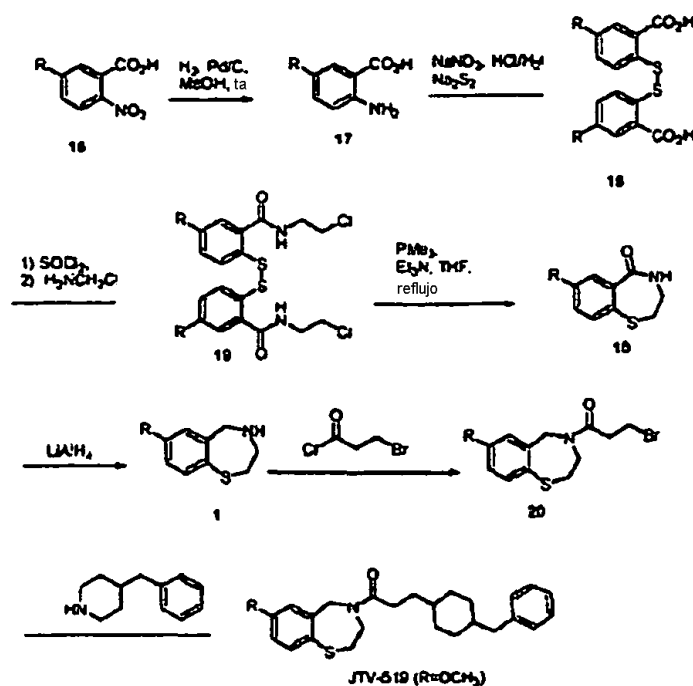


en la que R es tal como se definió anteriormente.

5 A modo de ejemplo, un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R = OR', SR', NR', alquilo o haluro y R' = alquilo, arilo o H, y en la que R puede estar en la posición 2, 3, 4 ó 5, puede sintetizarse tal como sigue:



10 R = OR', SR', NR', alquilo, haluros; R' = alquilo, arilo, H
R puede estar en la posición 2, 3, 4 ó 5

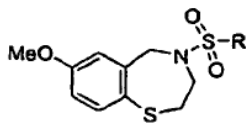
15 A modo de ejemplo, y tal como se muestra en el ejemplo 9 y en el esquema 1 a continuación, puede prepararse 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina a partir de ácido 2-nitro-5-metoxibenzoico tal como sigue. Se reduce el grupo nitro del ácido 2-nitro-5-metoxibenzoico, usando H₂ con Pd/C como catalizador, para dar ácido 2-amino-5-metoxibenzoico. Puede diazotarse el ácido 2-amino-5-metoxibenzoico con NaNO₂, y entonces tratarse con Na₂S₂, para proporcionar un compuesto de disulfuro estable. Sin más purificación, puede tratarse el compuesto de disulfuro estable con SOCl₂, y entonces hacerse reaccionar con 2-cloroetilamina, en presencia de Et₃N, para dar una amida. Entonces puede convertirse el compuesto amida en un compuesto ciclado mediante un procedimiento en un solo recipiente, tal como sigue. Puede añadirse un agente reductor (tal como trimetilfosfina o trifetilfosfina) y una base (tal como trietilamina) a una disolución del compuesto de amida en THF (tetrahidrofurano). Entonces puede someterse a reflujo la mezcla de reacción resultante durante 3 h. El agente reductor (trimetilfosfina o trifetilfosfina) escinde el disulfuro (S-S) en su monosulfuro (-S), que, *in situ*, experimenta una ciclación intramolecular con el

cloruro para proporcionar una amida ciclada. Entonces puede reducirse la amida ciclada con LiAlH_4 para proporcionar el producto intermedio de 1,4-benzotiazepina, 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina. Entonces puede prepararse JTV-519 a partir de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina haciendo reaccionar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina con cloruro 3-bromopropiónico, y entonces haciendo reaccionar el compuesto resultante con 4-bencilpiperidina.

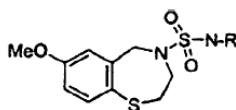
La presente descripción proporciona además una composición, que comprende JTV-519 radiomarcado. El marcado de JTV-519 puede lograrse usando uno de una variedad de diferentes marcadores radiactivos conocidos en la técnica. El marcador radiactivo de la presente invención puede ser, por ejemplo, un radioisótopo. El radioisótopo puede ser cualquier isótopo que emita radiación detectable, incluyendo, sin limitación, ^{35}S , ^{125}I , ^3H , o ^{14}C . La radiactividad emitida por el radioisótopo puede detectarse mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la emisión gamma del radioisótopo puede detectarse usando técnicas de obtención de imágenes mediante radiación gamma, particularmente técnicas de obtención de imagen mediante gammagrafía.

A modo de ejemplo, y tal como se muestra en el ejemplo 10 y el esquema 2 a continuación, puede prepararse JTV-519 radiomarcado tal como sigue. Puede desmetilarse JTV-519 en el anillo de fenilo usando BBr_3 . Entonces puede volverse a metilar el compuesto de fenol resultante con un agente de metilación radiomarcado (tal como sulfato de ^3H -dimetilo) en presencia de una base (tal como NaH) para proporcionar JTV-519 marcado con ^3H .

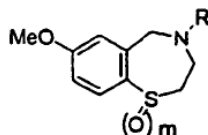
La presente descripción proporciona además productos intermedios y derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos, incluyendo 2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepenos que son similares a JTV-519. A modo de ejemplo, la presente descripción proporciona compuestos que tienen las siguientes fórmulas:



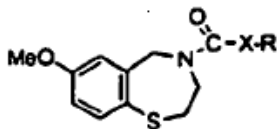
en la que R = arilo, alquenilo, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y R' = alquilo o cicloalquilo;



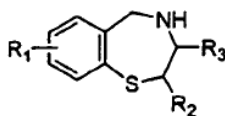
en la que R = arilo, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y R' = alquilo o cicloalquilo;



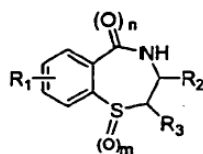
en la que $\text{R} = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ o $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, y $\text{X} = \text{N}$ o S , y $n = 1, 2$ ó 3 , y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que $m = 1$ ó 2 ; y



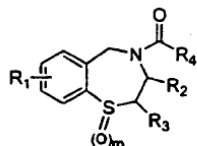
en la que $\text{R} = \text{arilo}$, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $\text{R}' = \text{alquilo}$ o cicloalquilo; y en la que $\text{X} = \text{NH}$ u O . También se proporcionan compuestos de 2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina adicionales que tienen las siguientes fórmulas:



en la que $\text{R}_1 = \text{OR}'$, SR' , NR' , alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $\text{R}' = \text{alquilo}$, arilo o H ; en la que $\text{R}_2 = \text{H}$, alquilo o arilo; y en la que $\text{R}_3 = \text{H}$, alquilo o arilo;



en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenido o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenido o arilo; en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y en la que $n = 0$ ó 1 ; y

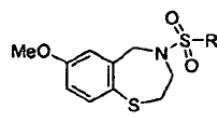


5

en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenido o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenido o arilo; en la que $R_4 = H$, haluro, alquenido, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que $m = 0, 1$ ó 2 .

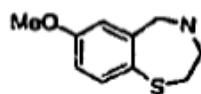
10 Los ejemplos de los compuestos de 1,4-benzotiazepina novedosos de los inventores incluyen, sin limitación, S7, S-20, S-25, S-27 y S36. Preferiblemente, el compuesto es S36. Pueden encontrarse estructuras para S7, S-20, S-25, S-27 y S36 en la figura 15 de la presente solicitud. Estos y cualquier otro compuesto novedoso de la presente invención pueden asociarse con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se describió anteriormente, de modo que se forme una composición farmacéutica.

15 La presente descripción proporciona además métodos de síntesis de los compuestos de 1,4-benzotiazepina novedosos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la presente descripción proporciona un método para la síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:

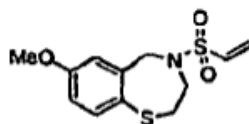


en la que $R =$ arilo, alquenido, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo, que comprende las etapas de:

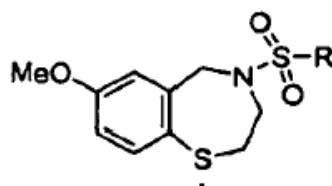
20 (a) tratar un compuesto que tiene la fórmula:



con un compuesto de cloruro de sulfonilo (incluyendo cualquier derivado de cloruro de sulfonilo) y una base, para formar un compuesto que tiene la fórmula:

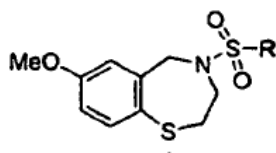


25 (b) opcionalmente, tratar el compuesto formado en la etapa (a) con una amina primaria o secundaria, para formar un compuesto que tiene la fórmula:

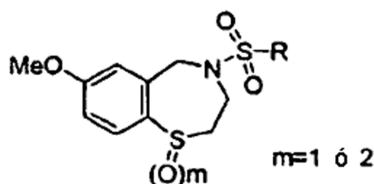


5 en la que R es tal como se definió anteriormente. En una realización, el compuesto de cloruro de sulfonilo en la etapa (a) se selecciona del grupo que consiste en cloruro de alquilsulfonilo y cloruro de arilsulfonilo. En otra realización, la base en la etapa (a) es Et₃N. Todavía en otra realización, la amina primaria o secundaria en la etapa (b) es 4-bencilpiperidina.

El método de la descripción puede comprender además la etapa de oxidar el compuesto que tiene la fórmula:

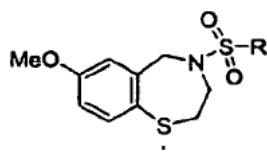


en la que R = arilo, alqueniilo, alquilo, -(CH₂)_nNR'₂ o -(CH₂)_nSR', y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo, con un agente oxidante, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



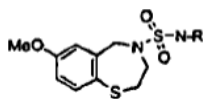
10 en la que R es tal como se definió anteriormente, y en la que m = 1 ó 2. En una realización de la presente invención, el agente oxidante es peróxido de hidrógeno.

A modo de ejemplo, y tal como se muestra en el ejemplo 11 y el esquema 3, los inventores han desarrollado un método de síntesis de compuestos que tienen la estructura general:

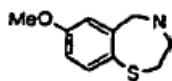


15 en la que R = arilo, alqueniilo, alquilo, -(CH₂)_nNR'₂ o -(CH₂)_nSR', y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo. Pueden prepararse compuestos novedosos de esta estructura general haciendo reaccionar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina con cloruro de alquilsulfonilo o cloruro de arilsulfonilo, en presencia de una base tal como Et₃N. Pueden seguir reacciones adicionales (por ejemplo, adición de 4-bencil-piperidina), para extender la cadena lateral según se desee. Tal como demuestra el esquema 3, pueden añadirse cloruro de 2-cloroetanosulfonilo (por ejemplo, 180 mg; 1,1 mM) y Et₃N (por ejemplo, 140 mg; 1,1 mM) a 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (1) (por ejemplo, 194 mg; 1 mM) en CH₂Cl₂ (por ejemplo, 20 ml), a 0°C. Entonces puede agitarse la mezcla (por ejemplo, a 0°C durante 2 h), y lavarse (por ejemplo, con H₂O y disolución saturada de NaHCO₃). La eliminación del disolvente proporcionará un producto en bruto, que puede purificarse mediante cromatografía sobre gel de sílice. Puede confirmarse la estructura mediante RMN. El esquema 3 muestra además que puede extenderse la cadena lateral del compuesto resultante haciendo reaccionar el compuesto (por ejemplo, 28 mg; 0,1 mM) con 4-bencil-piperidina (por ejemplo, 21 mg; 0,13 mM) en CH₂Cl₂. Tras llegar a completarse la reacción, puede eliminarse la amina en exceso mediante un eliminador de base (por ejemplo, gel de sílice funcionalizado con 3-(2-anhídrido succínico)propilo, 0,5 g).

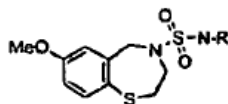
30 La presente descripción también proporciona un método para la síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo, que comprende la etapa de tratar un compuesto que tiene la fórmula:

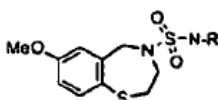


- 5 con un cloruro de sulfurilo y una amina primaria o secundaria, en presencia de una base, para formar un compuesto que tiene la fórmula:

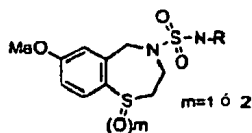


en la que R es tal como se definió anteriormente. En una realización de la presente invención, la base es Et_3N . En otra realización, la amina primaria o secundaria es 1-piperonilpiperazina.

- 10 El método de la presente descripción puede comprender además la etapa de oxidar el compuesto que tiene la fórmula:

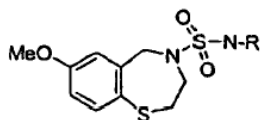


en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



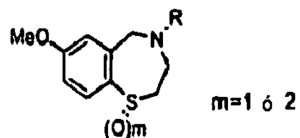
- 15 en la que R es tal como se definió anteriormente, y en la que m = 1 ó 2. En una realización, el agente oxidante es peróxido de hidrógeno.

A modo de ejemplo, y tal como se muestra en el ejemplo 11 y el esquema 4, los inventores han desarrollado un método de síntesis de compuestos que tienen la estructura general:



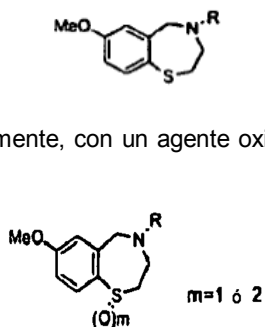
- 20 en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo. Pueden prepararse compuestos novedosos de esta estructura general mediante una reacción en un solo recipiente de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina con cloruro de sulfurilo, en presencia de una base (por ejemplo, Et_3N), seguido por una amina primaria o secundaria. Tal como demuestra el esquema 4, pueden añadirse cloruro de sulfurilo (por ejemplo, 15,0 mg; 0,111 mM) y Et_3N (por ejemplo, 28,0 mg; 0,22 mM) a 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (por ejemplo, 19,4 mg; 0,1 mM) en CH_2Cl_2 (por ejemplo, 20 ml), a $0^\circ C$. Tras agitarse la mezcla (por ejemplo, durante 2 h a $0^\circ C$), puede añadirse 1-piperonilpiperazina (por ejemplo, 27 mg; 0,12 mM). Puede agitarse la mezcla durante otras 2 h, y entonces lavarse (por ejemplo, con H_2O y una disolución saturada de $NaHCO_3$). Puede eliminarse la amina en exceso mediante la adición de un eliminador de base (por ejemplo, gel de sílice funcionalizado con 3-(2-anhídrido succínico)propilo, 0,2 g).
- 25
- 30

La presente descripción proporciona además un método para la síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:



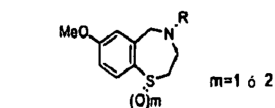
en la que $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ o $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, y $X = \text{N}$ o S , y $n = 1, 2 \text{ ó } 3$, y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $m = 1 \text{ ó } 2$, que comprende la etapa de tratar un compuesto que tiene la fórmula:

5 en la que R es tal como se definió anteriormente, con un agente oxidante, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



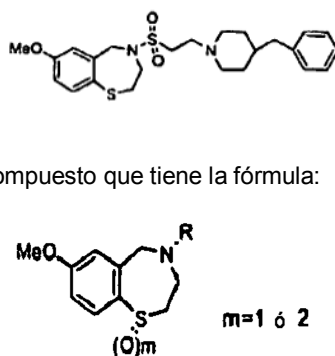
10 en la que R y m son tal como se definieron anteriormente. En una realización, el agente oxidante es peróxido de hidrógeno. Este método también puede usarse para oxidar JTV-519.

La presente descripción proporciona además un método para la síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:



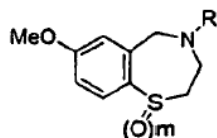
en la que $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ o $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, y $X = \text{N}$ o S , y $n = 1, 2 \text{ ó } 3$, y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $m = 1 \text{ ó } 2$, que comprende la etapa de tratar un compuesto que tiene la fórmula:

15 con un agente oxidante, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R y m son tal como se definieron anteriormente. En una realización, el agente oxidante es peróxido de hidrógeno. Este método también puede usarse para oxidar JTV-519.

20 A modo de ejemplo, y tal como se muestra en el ejemplo 11 y el esquema 5, la presente descripción proporciona un método de síntesis de compuestos que tienen la estructura general:

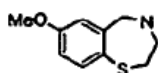


- 5 en la que $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ o $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, y $X = \text{N}$ o S , y $n = 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $m = 1$ ó 2 . Pueden prepararse compuestos novedosos de esta estructura general mediante oxidación de JTV-519, o uno de los derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos descritos en el presente documento, con peróxido de hidrógeno. Tal como muestra el esquema 5, puede añadirse el compuesto de 1,4-benzotiazepina de interés (por ejemplo, 21 mg; 0,05 mM) en MeOH (por ejemplo, 5 ml) a H_2O_2 (por ejemplo, 0,1 ml, en exceso). Puede agitarse la mezcla (por ejemplo, durante 2 días), y puede purificarse el producto resultante mediante cromatografía sobre gel de sílice (por ejemplo, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 10:1$)

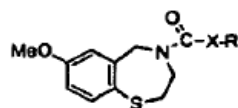
Adicionalmente, la presente descripción proporciona un método para la síntesis de un compuesto que tiene la fórmula:



en la que $R =$ arilo, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $X = \text{NH}$ u O , que comprende la etapa de tratar un compuesto que tiene la fórmula:

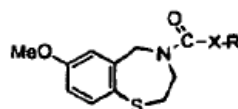


- 15 con un compuesto de cloruro de carbonilo, en presencia de una base, y con una amina primaria o secundaria o un alcohol, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



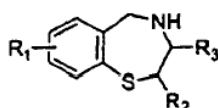
en la que R y X son tal como se definieron anteriormente. En una realización, el compuesto de cloruro de carbonilo es trifosgeno. En otra realización, la base es Et_3N . Aún en otra realización, la amina primaria o secundaria es 4-bencilpiperidina.

- 20 A modo de ejemplo, y tal como se muestra en el ejemplo 11 y el esquema 6, los inventores han desarrollado un método de síntesis de compuestos que tienen la estructura general:



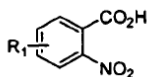
- 25 en la que $R =$ arilo, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $X = \text{NH}$ u O . Pueden prepararse compuestos novedosos de esta estructura general haciendo reaccionar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina con trifosgeno, en presencia de una base (por ejemplo, Et_3N), seguido por la adición de una amina primaria o secundaria o un alcohol.

La presente descripción proporciona además un método para la síntesis de compuestos de 2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina que tienen la fórmula:

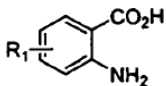


- 30 en la que $R_1 = \text{OR}'$, SR' , NR' , alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o H ; en la que $R_2 = \text{H}$, alquilo o arilo; y en la que $R_3 = \text{H}$, alquilo, o arilo, que comprende las etapas de:

(a) tratar un compuesto que tiene la fórmula:

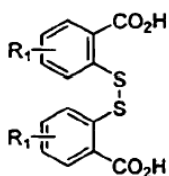


en la que R₁ es tal como se definió anteriormente, con un agente reductor, en presencia de un catalizador opcional, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



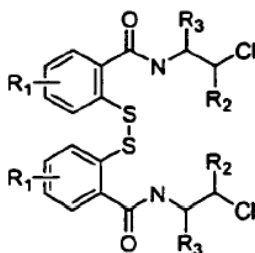
5 en la que R₁ es tal como se definió anteriormente;

(b) tratar el compuesto formado en la etapa (a) con un agente de diazotación y un disulfuro, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



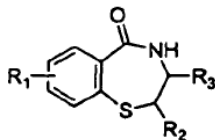
en la que R₁ es tal como se definió anteriormente;

10 (c) tratar el compuesto formado en la etapa (b) con un agente de activación y cloroetilamina, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



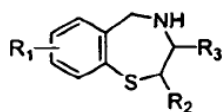
en la que R₁, R₂ y R₃ son tal como se definieron anteriormente;

15 (d) tratar el compuesto formado en la etapa (c) con un agente reductor y una base para formar un compuesto que tiene la fórmula:



en la que R₁, R₂ y R₃ son tal como se definieron anteriormente; y

(e) tratar el compuesto formado en la etapa (d) con un agente reductor, para formar un compuesto que tiene la fórmula:



20

en la que R₁, R₂ y R₃ son tal como se definieron anteriormente.

Métodos de tratamiento y prevención usando derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos

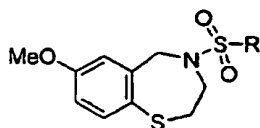
Los compuestos de 1,4-benzotiazepina novedosos de los inventores comparten características funcionales con JTV-519. Por ejemplo, como JTV-519 (PM = 423), el compuesto S36 (PM = 267) regula los canales de calcio. En efecto, S36 (un ácido carboxílico) es aproximadamente 10 veces más potente que JTV-519 en la regulación de los canales de calcio (datos no mostrados). A diferencia de JTV-519, sin embargo, los compuestos novedosos de los inventores muestran una débil actividad de bloqueo de hERG.

El canal de tipo rectificador tardío rápido (I(Kr)), un canal de potasio, es importante para la repolarización del potencial de acción cardíaco. hERG es la subunidad formadora de poros del canal I(Kr). La supresión de la función de I(Kr), como resultado de efectos farmacológicos adversos y/o defectos genéticos en hERG, puede conducir al síndrome de intervalo QT largo (SQTL), que conlleva un riesgo aumentado de arritmias potencialmente mortales. Los hERG, entonces, son subunidades de canal de potasio que, cuando se bloquean, pueden provocar arritmias cardíacas y muerte súbita cardíaca.

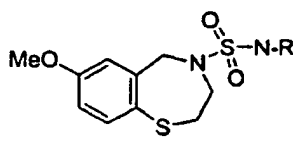
Los compuestos de los inventores tienen un bloqueo reducido de manera significativa de canales hERG (I(Kr)), en comparación con JTV-519. Tal como se muestra en las figuras 4-7, por ejemplo, uno de los compuestos de los inventores, S36, tiene una actividad de bloqueo de hERG que es aproximadamente de 5 a 10 veces menor que la actividad de bloqueo de hERG del JTV-519. Dado que los compuestos de los inventores tienen una débil actividad de bloqueo de hERG, se espera que sean menos tóxicos que JTV-519.

Basándose en lo anterior, los compuestos de 1,4-benzotiazepina novedosos de los inventores son más potentes que el JTV-519, y tienen toxicidad reducida. Por tanto, se cree que los compuestos novedosos de los inventores serán particularmente útiles en cualquiera de los métodos descritos anteriormente para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto, incluyendo un sujeto que tiene, o es un candidato para, al menos un estado cardíaco, incluyendo, sin limitación, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca y muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio. También se cree que los compuestos de los inventores serán particularmente útiles en métodos para tratar o prevenir tales estados cardíacos en un sujeto.

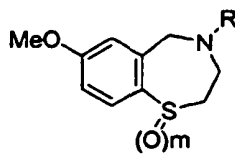
Por consiguiente, la presente descripción proporciona además un método para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto, mediante la administración de un agente al sujeto, en una cantidad eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto. El agente de la presente descripción puede ser cualquier derivado de 1,4-benzotiazepina, incluyendo los siguientes:



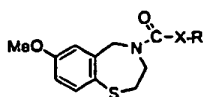
en la que R = arilo, alquenoilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;

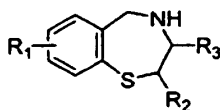


en la que R = $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ o $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, y X = N o S, y n = 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que m = 1 ó 2;



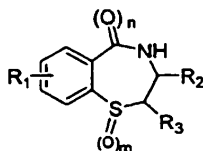
(d)

en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que X = NH u O;



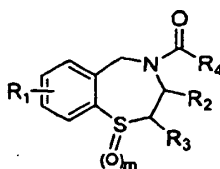
(e)

5 en la que $R_1 = OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o H; en la que $R_2 = H$, alquilo o arilo; y en la que $R_3 = H$, alquilo o arilo;



(f)

10 en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alqueniilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alqueniilo o arilo; en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y en la que $n = 0$ ó 1 ;



(g)

en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alqueniilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alqueniilo o arilo; en la que $R_4 = H$, haluro, alqueniilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y

15 (h) cualquier forma oxidada de los compuestos (a)-(g) anteriores. También se proporcionan usos de estos agentes en métodos para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto. En una realización de la presente invención, el agente se selecciona del grupo que consiste en S4, S7, S-20, S-24, S-25, S-26, S-27 y S36. Pueden encontrarse estructuras para estos agentes en la figura 15. Preferiblemente, el agente es S36.

20 Tal como se describió anteriormente, el sujeto puede ser cualquier animal, pero es preferiblemente un ser humano. En una realización, el sujeto tiene taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC). En otra realización, el sujeto tiene, o es un candidato para, al menos un estado cardiaco, incluyendo, sin limitación, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio),
 25 insuficiencia cardiaca y muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio.

En el método de la presente descripción, puede administrarse un derivado de 1,4-benzotiazepina a un sujeto como parte de una composición terapéutica que comprende el derivado y un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se describió anteriormente. Puede administrarse el derivado o la composición farmacéutica al sujeto a modo de cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica y/o dadas a conocer en el presente documento.

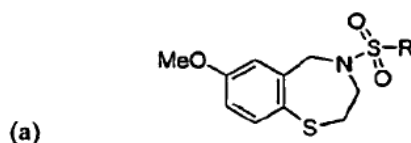
30 Según el método de la presente descripción, puede administrarse un derivado de 1,4-benzotiazepina a un sujeto (y puede ponerse el derivado de 1,4-benzotiazepina en contacto con células del sujeto) en una cantidad eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto, particularmente en células del

5 sujeto. Esta cantidad puede determinarse fácilmente por el experto, basándose en procedimientos conocidos, incluyendo el análisis de curvas de titulación establecidas *in vivo*, y métodos y ensayos dados a conocer en el presente documento. Una cantidad adecuada del derivado de 1,4-benzotiazepina eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto puede oscilar entre aproximadamente 5 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día, y/o puede ser una cantidad suficiente para conseguir niveles en plasma que oscilan entre aproximadamente 300 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml. Preferiblemente, la cantidad del derivado de 1,4-benzotiazepina oscila entre aproximadamente 10 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día.

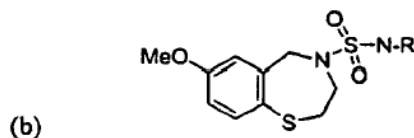
10 Según el método de la presente descripción, puede limitarse o impedirse una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto disminuyendo el nivel de RyR2 fosforilado en el sujeto. En una realización de la presente invención, el sujeto aún no ha desarrollado un estado cardíaco, tal como una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio. En este caso, la cantidad del derivado de 1,4-benzotiazepina eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto puede ser una cantidad del derivado de 1,4-benzotiazepina eficaz para prevenir un estado cardíaco (por ejemplo, arritmia cardíaca, insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en el sujeto. En una realización, el derivado de 1,4-benzotiazepina previene al menos un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en el sujeto.

25 En otra realización, el sujeto ya ha desarrollado un estado cardíaco. En este caso, la cantidad del derivado de 1,4-benzotiazepina eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto puede ser una cantidad del derivado de 1,4-benzotiazepina eficaz para tratar un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio) o insuficiencia cardíaca) en el sujeto. En una realización preferida, el JTV-519 trata al menos un estado cardíaco en el sujeto.

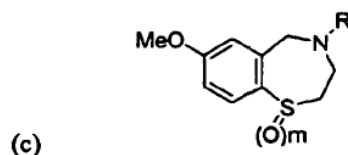
30 La presente descripción proporciona además un método para tratar o prevenir un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en un sujeto, que comprende administrar un agente al sujeto, en una cantidad eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto. El agente de la presente descripción puede ser cualquier derivado de 1,4-benzotiazepina, incluyendo los siguientes:



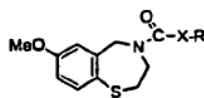
en la que R = arilo, alquenoilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;

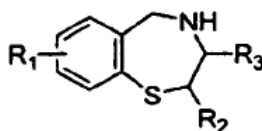


40 en la que R = $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ o $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, y X = N o S, y n = 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que m = 1 ó 2;



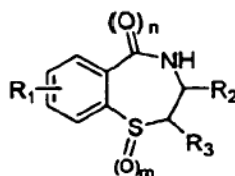
(d)

en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que X = NH u O;



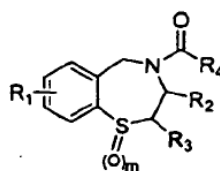
(e)

- 5 en la que $R_1 = OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o H; en la que $R_2 = H$, alquilo o arilo; y en la que $R_3 = H$, alquilo o arilo;



(f)

- 10 en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y en la que $n = 0$ ó 1 ;



(g)

en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_4 = H$, haluro, alquenilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y

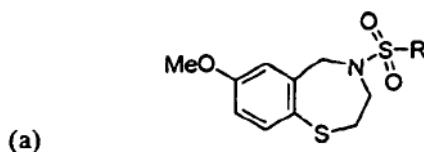
- 15 (h) cualquier forma oxidada de los compuestos (a)-(g) anteriores.

La presente descripción proporciona además un método para tratar al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio) o insuficiencia cardiaca) en un sujeto. El método comprende administrar un derivado de 1,4-benzotiazepina al sujeto en una cantidad eficaz para tratar al menos un estado cardiaco en el sujeto. Una cantidad adecuada del derivado de 1,4-benzotiazepina eficaz para tratar un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio) o insuficiencia cardiaca) en un sujeto puede oscilar entre aproximadamente 5 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día, y/o puede ser una cantidad suficiente para conseguir niveles en plasma que oscilan entre aproximadamente 300 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml.

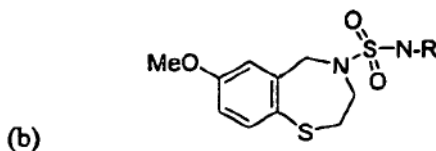
La presente descripción también proporciona un método para prevenir al menos un estado cardiaco (por ejemplo,

una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio) en un sujeto. El método comprende administrar un derivado de 1,4-benzotiazepina al sujeto en una cantidad eficaz para prevenir al menos un estado cardiaco en el sujeto. Una cantidad adecuada del derivado de 1,4-benzotiazepina eficaz para prevenir al menos un estado cardiaco (por ejemplo, una arritmia cardiaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardiaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardiaca o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio) en un sujeto puede oscilar entre aproximadamente 5 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día, y/o puede ser una cantidad suficiente para conseguir niveles en plasma que oscilan entre aproximadamente 300 ng/ml y aproximadamente 1000 ng/ml.

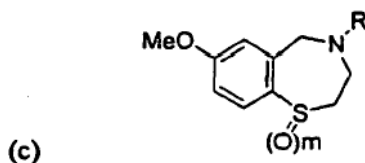
Según los métodos descritos anteriormente, los ejemplos del derivado de 1,4-benzotiazepina incluyen, sin limitación:



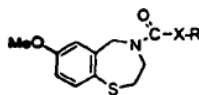
en la que R = arilo, alquenoilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



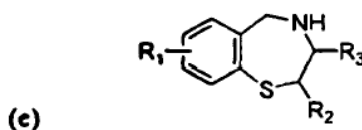
en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



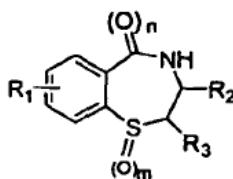
en la que R = $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ o $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, y X = N o S, y n = 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que m = 1 ó 2;



en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que X = NH u O;

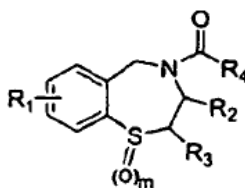


en la que R₁ = OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o H; en la que R₂ = H, alquilo o arilo; y en la que R₃ = H, alquilo o arilo;



(f)

en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y en la que $n = 0$ ó 1 ;



(g)

5

en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_4 = H$, haluro, alquenilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y

10 (h) cualquier forma oxidada de los compuestos (a)-(g) anteriores. En una realización de la presente invención, el derivado de 1,4-benzotiazepina se selecciona del grupo que consiste en S4, S7, S-20, S-24, S-25, S-26, S-27 y S36. Preferiblemente, el derivado de 1,4-benzotiazepina es S36. La presente descripción también proporciona usos de estos derivados de 1,4-benzotiazepina en métodos para tratar o prevenir al menos un estado cardíaco (por ejemplo, una arritmia cardíaca (por ejemplo, taquicardia; arritmia auricular, incluyendo taquiarritmia auricular y fibrilación auricular (tanto sostenidas como no sostenidas); arritmia ventricular, incluyendo fibrilación ventricular; y arritmia cardíaca inducida por ejercicio), insuficiencia cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio) en un sujeto.

La presente descripción también proporciona ensayos novedosos para la selección regular o de alto rendimiento de otras moléculas pequeñas biológicamente activas que potencian la unión de FKBP12.6 y RyR2. En particular, la presente descripción proporciona un método para identificar un agente que potencia la unión de RyR2 y FKBP12.6, que comprende las etapas de: (a) obtener o generar una fuente de RyR2; (b) exponer el RyR2 a FKBP12.6, en presencia de un agente candidato; y (c) determinar si el agente potencia la unión de RyR2 y FKBP12.6. En una realización, el RyR2 se fosforila por PKA. En otra realización, el RyR2 se hiperfosforila por PKA. Aún en otra realización, el RyR2 está sin fosforilar.

En el método de la presente descripción, el RyR2 se inmoviliza en una fase sólida, tal como una placa o perlas. Para facilitar la detección de la unión de RyR2-FKBP12.6, la FKBP12.6 puede radiomarcarse (por ejemplo, con ^{32}S). Además, puede detectarse la unión potenciada de RyR2 y FKBP12.6 usando un agente de unión a FKBP12.6. En una realización, el agente de unión a FKBP12.6 es un anticuerpo anti-FKBP12.6. La presente descripción también proporciona un agente identificado mediante este método, así como usos de este agente en métodos para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto; en métodos para tratar o prevenir insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular o arritmia cardíaca inducida por ejercicio en un sujeto; y en métodos para prevenir la muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio en un sujeto.

Adicionalmente, la presente descripción proporciona un método para identificar un agente para potenciar la unión de RyR2 y FKBP12.6, que comprende las etapas de: (a) obtener o generar una fuente de FKBP12.6; (b) exponer el FKBP12.6 a RyR2, en presencia de un agente candidato; y (c) determinar si el agente potencia la unión de RyR2 y FKBP12.6. En una realización, el RyR2 se fosforila por PKA. En otra realización, el RyR2 se hiperfosforila por PKA. Aún en otra realización, el RyR2 está sin fosforilar.

En el método de la presente descripción, la FKBP12.6 se inmoviliza en una fase sólida, tal como una placa o perlas. Para facilitar la detección de la unión de RyR2-FKBP12.6, el RyR2 puede radiomarcarse (por ejemplo, con ^{32}P). Además, puede detectarse la unión potenciada de RyR2 y FKBP12.6 usando un agente de unión a RyR2. En una realización, el agente de unión a RyR2 es un anticuerpo anti-RyR2. La presente descripción también proporciona un agente identificado mediante este método, así como usos de este agente en métodos para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto; en métodos para tratar o prevenir insuficiencia

cardiaca, fibrilación auricular o arritmia cardiaca inducida por ejercicio en un sujeto; y en métodos para prevenir la muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en un sujeto.

A modo de ejemplo, y tal como se muestra en el ejemplo 12 a continuación, puede desarrollarse un ensayo de alta eficacia para la selección de alto rendimiento para moléculas pequeñas inmovilizando FKBP12.6 (por ejemplo, FKBP12.6 de tipo natural o una proteína de fusión, tal como GST-FKBP12.6) en una placa de 96 pocillos recubierta con glutatión, usando procedimientos habituales. Puede cargarse el receptor de rianodina de tipo 2 (RyR2) fosforilado por PKA sobre la placa recubierta con FKBP12.6, e incubarse con análogos de JTV-519 y otros derivados de 1,4-benzotiazepeno a diversas concentraciones (10-100 nM) durante 30 min. Después, puede lavarse la placa para eliminar el RyR2 no unido, y entonces incubarse con anticuerpo anti-RyR2 (por ejemplo, durante 30 min.). Puede lavarse la placa otra vez para eliminar el anticuerpo anti-RyR2 no unido, y entonces tratarse con un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente. Puede leerse la placa mediante un lector de placas de fluorescencia automático para determinar la actividad de unión.

Alternativamente, puede fosforilarse por PKA RyR2 en presencia de ^{32}P -ATP. Puede cargarse el RyR2 fosforilado por PKA radiactivo sobre una placa de 96 pocillos recubierta con FKBP12.6, en presencia de análogos de JTV-519 y otros derivados de 1,4-benzotiazepeno a diversas concentraciones (10-100 nM) durante 30 min. Puede lavarse la placa para eliminar el RyR2 radiomarcado no unido, y entonces leerse mediante un lector de placas automático. También puede recubrirse RyR2 fosforilado por PKA en la placa, e incubarse con FKBP12.6 marcado con ^{32}S en presencia de los análogos y los derivados.

Los siguientes ejemplos, se exponen para ayudar en el entendimiento de la invención, y no debe interpretarse que limitan en modo alguno el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones que siguen después.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Ratones deficientes en FKBP12.6

Se generaron ratones deficientes en FKBP12.6, tal como se describió anteriormente (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003). Brevemente, se aislaron clones de fago λ genómicos de ratón para el ortólogo murino de la proteína de unión a FK506 humana 12.6 (FKBP12.6) a partir de una biblioteca de DBA/11acJ, usando una sonda de ADNc murino de longitud completa. Se diseñó el vector de selección como diana para delecionar los exones 3 y 4, que contienen las secuencias de codificación enteras para FKBP12.6 murina (Bennett *et al.*, Identification and characterization of the murine FK506 binding protein (FKBP) 12.6 gene. *Mamm. Genome*, 9: 1069-71, 1998), mediante la sustitución de 3,5 kb de ADN genómico murino por un marcador seleccionable PGK-neo. Se clonaron un fragmento en 5' de 5,0 kb y un fragmento en 3' de 1,9 kb en pJNS2, un vector de estructura principal con casetes PGK-neo y PGK-TK. Se cultivaron las células madre embrionarias (ME) DBA/11acJ y se transfectaron, usando protocolos establecidos. En primer lugar, se seleccionaron células ME seleccionadas como diana mediante análisis de tipo Southern, y se analizaron 5 líneas de células ME positivas mediante PCR para confirmar la recombinación homóloga. Se reprodujeron quimeras macho con hembras DBA/11acJ, y se identificó la descendencia de la línea germinal mediante una color de pelaje marrón. Se genotipó la descendencia de la línea germinal usando análisis de tipo Southern en 5'. Se sometieron a inter cruzamiento machos y hembras FKBP12.6^{+/-} positivos, y la descendencia dio como resultado ratones FKBP12.6^{-/-} a aproximadamente una frecuencia del 25%. Los ratones FKBP12.6^{-/-} eran fértiles.

Todos los estudios llevados a cabo con ratones FKBP12.6^{-/-} usaron ratones FKBP12.6^{+/+} de edad y sexo coincidentes como controles. No se observaron diferencias entre los ratones FKBP12.6^{-/-} criados con los siguientes orígenes: DBA/C57BL6 mezclado, DBA puro y C57BL6 puro.

EJEMPLO 2 – PRUEBAS DE EJERCICIO Y REGISTRO DE TELEMETRÍA EN RATONES

Se mantuvieron ratones FKBP12.6^{+/+} y FKBP12.6^{-/-} y se estudiaron según protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Columbia. Se anestesiaron ratones usando anestesia por inhalación de isoflurano al 2,5%. Se obtuvieron los registros de radiotelemedría de ECG de animales ambulatorios >7 días tras la implantación intraperitoneal (Data Sciences International, St. Paul, MN) (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003). Para pruebas de estrés, se sometieron ratones a ejercicio en una cinta para correr inclinada, de modo gradual, hasta agotamiento, y entonces se les inyectó por vía intraperitoneal epinefrina (0,5-2,0 mg/kg) (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003). Se promediaron las frecuencias cardiacas en reposo de animales ambulatorios a lo largo de 4 h.

EJEMPLO 3 - EXPRESIÓN DE MUTANTES RyR2-S2809D Y DE TIPO NATURAL

Se realizó la mutagénesis del sitio diana de PKA en RyR2 (RyR2-S2809D), tal como se describió anteriormente (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003). Se cotransfectaron células HEK293 con 20 μg de

ADNc de RyR2 de tipo natural (WT) o mutante, y con 5 µg de ADNc de FKBP12.6, usando precipitación con fosfato de Ca²⁺. Se prepararon vesículas que contenían canales RyR2, tal como se describió anteriormente (Wehrens *et al.*, FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003).

5 EJEMPLO 4 – FOSFORILACIÓN POR PKA DE RYR2 PKA Y UNIÓN DE FKBP12.6

Se prepararon membranas de RS cardiaco, tal como se describió anteriormente (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000; Kaftan *et al.*, Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca²⁺-release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78:990-97, 1996). Se generó FKBP12.6 marcada con ³⁵S usando el sistema de transcripción/traducción acopladas rápidas TNT™ de Promega (Madison, WI). Se usó la unión a [³H]-rianodina para cuantificar los niveles de RyR2. Se diluyeron 100 µg de microsomas en 100 µl de tampón imidazol 10 mM (pH 6,8), se incubó con [³⁵S]-FKBP12.6 250 nM (concentración final) a 37°C durante 60 min., entonces se extinguió con 500 µl de tampón imidazol enfriado con hielo. Se centrifugaron muestras a 100.000 g durante 10 min., y se lavaron tres veces con tampón imidazol. Se determinó la cantidad de [³⁵S]-FKBP12.6 unida mediante recuento por centelleo líquido del sedimento.

15 EJEMPLO 5 - INMUNOTRANSFERENCIAS

Se realizó la inmunotransferencia de microsomas (50 µg) tal como se describió, con anticuerpos anti-FKBP12/12.6 (1:1.000), anti-RyR-5029 (1:3.000) (Jayaraman *et al.*, FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.*, 267:9474-77, 1992) o anti-fosfoRyR2-P2809 (1:5.000) durante 1 h a temperatura ambiente (Reiken *et al.*, Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation*, 107:2459-66, 2003). El anticuerpo anti-RyR2 específico del fosfoepítipo P2809 es un anticuerpo de conejo policlonal purificado por afinidad, preparado por encargo por Zymed Laboratories (San Francisco, CA) usando el péptido, CRTRRI-(pS)-QTSQ, que corresponde a RyR2 fosforilado por PKA en Ser2809. Tras la incubación con anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con HRP (dilución 1:5.000; Transduction Laboratories, Lexington, KY), se desarrollaron las transferencias usando ECL (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). También pueden usarse los anticuerpos en las siguientes razones: 1:4.000 (anticuerpo anti-IgG de conejo); y 1:5.000 (anticuerpos anti-RyR2-5029 y anti-FKBP12.6).

25 EJEMPLO DE REFERENCIA 6 – REGISTROS DE CANAL INDIVIDUAL

Se adquirieron registros de canal individual de RyR2 nativo de corazones de roedor (ratón o rata), o RyR2 recombinante, en condiciones de fijación de voltaje a 0 mV, tal como se describió anteriormente (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76,2000). Las disoluciones simétricas usadas para registros de canal fueron: compartimento trans - HEPES, 250 mmol/l; Ba(OH)₂, 53 mmol/l (en algunos experimentos, se sustituye Ba(OH)₂ por Ca(OH)₂); pH 7,35; y compartimento cis - HEPES, 250 mmol/l; base de Tris, 125 mmol/l; EGTA, 1,0 mmol/l; y CaCl₂, 0,5 mmol/l; pH 7,35. A menos que se indique lo contrario, se realizaron registros de canales individuales en presencia de [Ca²⁺] 150 nM y [Mg²⁺] 1,0 mM en el compartimento cis. Se aplicó rianodina (5 mM) al compartimento cis para confirmar la identidad de todos los canales. Se analizaron datos procedentes de registros de corriente digitalizados usando el software Fetchan (Axon Instruments, Union City, CA). Se expresan todos los datos como la media ± E.E. Se usó la prueba de la t de Student para datos independientes para la comparación estadística de valores medios entre experimentos. Un valor de p<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Se exponen los efectos de JTV-519 sobre los canales RyR2 en las figuras 1-3 y la tabla 1 (a continuación). Tal como se demuestra en la figura 3, los estudios de canal individual mostraron un aumento de la probabilidad de apertura de RyR2 tras la fosforilación por PKA (D), en comparación con la fosforilación por PKA en presencia del inhibidor de PKA específico, PKI₅₋₂₄ (C). Se normalizó la función de canal individual en RyR2 fosforilado por PKA incubado con FKBP12.6 en presencia de JTV-519 (E). Los histogramas de amplitud (derecha) revelaron un aumento en la actividad y aperturas de subconductancia en RyR2 fosforilado por PKA, pero no tras el tratamiento con JTV-519 y FKBP12.6. La figura 3F muestra que la incubación de RyR2 fosforilado por PKA con FKBP12.6, en presencia de JTV-519, desplazó la dependencia de Ca²⁺ de la activación de RyR2 hacia la derecha, haciéndola similar a la dependencia de Ca²⁺ de canales sin fosforilar.

50 Tabla 1. Datos de ECG ambulatorios antes, durante el ejercicio y tras el ejercicio y la inyección de epinefrina.

	LCS (ms)	FC (lpm)	PR (ms)	QRS (ms)	QT(ms)	QTc (ms)
Nivel inicial						
FKBP12.6 ^{+/-}	104 ± 6	586 ± 36	32 ± 1,5	9,9 ± 0,4	30 ± 1,0	29 ± 0,6
FKBP12.6 ^{+/-} + JTV-519	99 ± 5	608 ± 32	33 ± 0,6	9,3 ± 0,3	32 ± 0,7	32 ± 1,9

FKBP12.6 ^{-/-} + JTV-519	116 ± 9	527 ± 43	33 ± 0,4	10,0 ± 0,3	33 ± 1,3	30 ± 1,1
Ejercicio máximo						
FKBP12.6 ^{+/-}	80 ± 2	752 ± 18	28 ± 0,7	8,7 ± 0,4	30 ± 1,7	33 ± 1,6
FKBP12.6 ^{+/-} + JTV-519	90 ± 7	676 ± 49	29 ± 1,8	9,6 ± 0,4	34 ± 2,0	36 ± 0,9
FKBP12.6 ^{-/-} + JTV-519	83 ± 3	729 ± 22	29 ± 2	9,3 ± 0,3	30 ± 1,2	33 ± 0,9
Epinefrina tras el ejercicio						
FKBP12.6 ^{+/-}	94 ± 4	645 ± 28	35 ± 2,6	9,3 ± 0,4	33 ± 1,8	34 ± 1,9
FKBP 2.6 ^{+/-} + JTV-519	102 ± 4	592 ± 21	37 ± 2,6	9,9 ± 0,6	32 ± 2,3	32 ± 1,7
FKBP12.6 ^{-/-} + JTV-519	103 ± 4	585 ± 20	35 ± 3,8	11,1 ± 0,5	36 ± 1,2	36 ± 1,3
Resumen de datos de ECG ambulatorios en ratones FKBP12.6 ^{+/-} tratados con JTV-519 (n = 8) o control (n = 6), y ratones FKBP12.6 ^{-/-} tratados con JTV-519 (n = 5). LCS = longitud del ciclo sinusal; FC = frecuencia cardiaca; ms = milisegundo; lpm = latidos por minuto; FKBP12.6 ^{+/-} = ratones FKBP12.6 heterocigotos; FKBP12.6 ^{-/-} = ratones deficientes en FKBP12.6						

EJEMPLO DE REFERENCIA 7 – MODELO DE RATA DE INSUFICIENCIA CARDIACA

Se sometieron 25 Sprague-Dawley (300-400 g) a ligadura coronaria izquierda, mediante toracotomía izquierda, para producir infarto de miocardio, tal como se describió anteriormente (Alvarez *et al.*, Late post-myocardial infarction induces a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in rat cardiomyocytes. *J Mol. Cell Cardiol.*, 32:1169-79, 2000). En resumen, se anestesiaron ratas con una mezcla de ketamina intraperitoneal 150 mg/kg y clorpromazina 15 mg/kg. Se mantuvo la respiración con un dispositivo de ventilación asistida y un tubo endotraqueal (3 ml de aire / 60 pulsaciones por min.). Tras toracotomía izquierda media y apertura del pericardio, se ocluyó la arteria coronaria principal izquierda con una sutura de seda 7-0 en el punto más proximal por debajo de la orejuela auricular izquierda. Se trataron ratas operadas de manera simulada (n = 5) de la misma manera, pero sin ligadura de la arteria coronaria.

Seis semanas tras el infarto de miocardio, se confirmó la insuficiencia cardiaca usando ecocardiografía. Se infundió de manera continua JTV-519 o vehículo (DMSO) (0,5 mg/kg/h) por medio de una bomba de infusión osmótica implantable (minibomba osmótica Alzet; Durect Corporation, Cupertino, CA). Tras 4 semanas de tratamiento continuo, se realizaron mediciones de ecocardiografía y hemodinámicas. Se sacrificaron y se recogieron muestras de tejido.

Según las técnicas anteriores, se indujo insuficiencia cardiaca en ratas mediante ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Esto dio como resultado infarto de miocardio que se desarrolló en cardiomiopatía dilatada, con función cardiaca reducida, en el plazo de 4 semanas. Se estudiaron tres grupos de animales, con 25 en cada grupo: operados de manera simulada (control), insuficiencia cardiaca + terapia (JTV-519) e insuficiencia cardiaca sin terapia (vehículo). Un tratamiento de cuatro semanas con JTV-519 redujo de manera significativa la disfunción diastólica y sistólica, tal como se determinó mediante ecocardiografía (figura 4). Por tanto, la terapia con JTV-519 mejoró de manera significativa la función cardiaca y redujo la progresión de insuficiencia cardiaca en el modelo de rata de insuficiencia cardiaca inducida por isquemia.

Usando un canal RyR2-S2809D mutante que imita a los canales RyR2 fosforilados por PKA de manera constitutiva, se determinó que JTV-519 aumenta la afinidad de FKBP12.6 por el canal RyR2 (figura 5). Específicamente, el tratamiento con JTV-519 permitió que FKBP12.6 se uniera al canal mutante, revelando de ese modo un mecanismo mediante el cual JTV-519 previene la insuficiencia cardiaca. El tratamiento con JTV-519 también previno la fuga en los canales RyR2 de corazones con insuficiencia (figura 6). Además, JTV-519 restauró la unión de FKBP12.6 tanto a RyR2 fosforilado por PKA y a RyR2-S2809D mutante que imitaba a RyR2 fosforilado por PKA de manera constitutiva, de manera dependiente de la dosis (figura 7).

EJEMPLO DE REFERENCIA 8 - MODELO CANINO DE FIBRILACIÓN AURICULAR

a) Protocolos con animales

Se implantaron marcapasos en perros mestizos adultos hembra que pesaban 24-26 kg, usando técnicas descritas previamente (Dun *et al.*, Chronic atrial fibrillation does not further decrease outward currents. It increases them. *Am. J Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 285:H1378-84, 2003). Se anestesiaron los animales con tiopental sódico (17 mg/kg,

i.v.), y se ventilaron con isoflurano (al 1,5-2%) y O₂ (2 l/min.). Se implantaron derivaciones de fijación activa en la orejuela auricular derecha y la pared libre auricular derecha, a modo de túnel por vía subcutánea, y se conectaron a un generador de impulsos Itrel y un marcapasos Thera 8962, respectivamente (Medtronic, Mineápolis, MN). Se inyectó formaldehído al 40% (0,1-0,3 ml) en el haz de His, para lograr un bloqueo AV completo. Se programó el marcapasos ventricular a una velocidad de 60 lpm, y se mantuvo a esta velocidad en la totalidad del protocolo de estimulación con marcapasos. Tras la recuperación, se instituyó la estimulación auricular con marcapasos a una velocidad de 600-900 lpm, y se mantuvo durante 46±3 días, o hasta que el animal estuviera en FA crónica (definido como > 5 días de FA en ausencia de estimulación con marcapasos continuada).

Entonces se anestesiaron los animales con pentobarbital (30 mg/kg), y se extrajeron sus corazones. Se diseccionó tejido auricular, se congeló inmediatamente de forma rápida en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

b) Recogida de corazones

Los datos humanos presentados en este estudio se derivaron de 5 corazones humanos de pacientes con fibrilación auricular en el entorno de insuficiencia cardiaca en fase terminal tras trasplante ortotópico de corazón según un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Hospital Presbiteriano de Nueva York. Además, también se obtuvieron datos de muestras tomadas de 3 corazones normales no adecuados para trasplante. En el momento del trasplante, se conservaron los corazones con disolución de cardioplejía hipocalcémica e hipercalemicá fría (4°C), en el explante.

c) Inmunoprecipitación y retrofosforilación de RyR2

Se suspendieron membranas cardiacas (100 µg), preparadas a partir de tejido de aurícula izquierda atrial (AI) tal como se describió anteriormente (Marx, *et al.*, PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts, *Cell*, 101:365-376, 2000) en 0,5 ml de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM [pH 7,4], NaCl al 0,9%, Triton 100x al 0,25%, NaF 5 mM e inhibidores de proteasas), y entonces se incubaron con anticuerpo anti-RyR2 de ratón durante la noche a 4°C. Se añadieron perlas de proteína A-Sepharose, y se permitió que incubasen a 4°C durante 1 h. Posteriormente se lavaron las perlas de proteína A con tampón cinasa 1x (Tris-HCl 50 mM, piperazin-N,N'-bis[2-ácido etanosulfónico] 50 mM, MgCl 8 mM y EGTA 10 mM [pH 6,8]), y entonces se resuspendieron en tampón cinasa 1,5x. Se inició la reacción con PKA (5 unidades), MgATP 100 µM y [³²P]ATP (NEN Life Sciences, Boston); se permitió que incubase durante 8 min. a temperatura ambiente, y entonces se detuvo con 5 µl de tampón de carga 6x (SDS al 4% y DTT0,25 M). Se calentaron las muestras hasta 95°C, y entonces se fraccionaron por tamaños en una SDS-PAGE al 6%. Se cuantificó la radiactividad de RyR2 usando un aparato Phosphoimager de Molecular Dynamics, y el software Imagequant (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Se dividieron los valores entre la cantidad de RyR2 inmunoprecipitado (determinada mediante inmunotransferencia y densitometría) y se expresó como la inversa de la señal de [³²P]ATP.

d) Nueva unión de calstabilina 2 (FKBP12.6) con JTV-519

Se inmunoprecipitó RyR2 a partir de RS auricular (100 µg), y se lavó con tampón cinasa 1x, tal como se describió anteriormente. Se fosforiló el RyR2 inmunoprecipitado con PKA (5 unidades) y MgATP 100 µM a temperatura ambiente, y se terminó la reacción tras 8 min. mediante lavado con tampón RIPA enfriado con hielo. Posteriormente se incubó calstabilina 2 (recombinante FKBP12.6; 200 nM) con el RyR2 fosforilado a temperatura ambiente, en presencia o ausencia del derivado de 1,4-benzotiazepina, JTV-519 (1 µM). Tras lavar la reacción con tampón RIPA, se fraccionaron por tamaños las proteínas mediante SDS PAGE al 15%, y se sometieron a inmunotransferencia para determinar la calstabilina 2 (FKBP12.6).

Se resumen a continuación los resultados obtenidos en relación con los experimentos del ejemplo 8:

Regulación de RyR2 auricular

Se fosforiló por PKA RyR2 auricular (figura 8A), según las técnicas anteriores. La fosforilación por PKA de RyR2 auricular redujo la cantidad de calstabilina 2 (FKBP12.6) en el complejo macromolecular de RyR2, tal como se determinó mediante coimmunoprecipitación (figura 8C). El complejo macromolecular de RyR2 se componía de calstabilina 2 (FKBP12.6), la subunidad catalítica de PKA, la subunidad reguladora de PKA (RII), PP2A, PP1 y mAkap (figura 8B), tal como se notificó previamente para RyR2 ventricular (Marx *et al.*, PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000).

Hiperfosforilación por PKA del receptor de rianodina en fibrilación auricular

Aumentó la fosforilación por PKA de RyR2 inmunoprecipitado en el 130% en tejido auricular de perros con fibrilación auricular (FA) sostenida, en comparación con los controles (n = 6 para FA, n = 6 para control, P < 0,001; figura 9A). Disminuyó la unión de calstabilina 2 (FKBP12.6) a RyR2 en el 72% en tejido auricular de perros con FA sostenida, con relación a los controles (n = 7 para FA, n = 6 para control, P < 0,0005; figura 9A).

De manera similar, aumentó la fosforilación por PKA de RyR2 inmunoprecipitado en el 112% en tejido auricular de seres humanos con fibrilación auricular crónica, en el entorno de insuficiencia cardiaca, en comparación con los controles (n = 5 para FA, n = 3 para control, P = 0,002; figura 9B). Disminuyó la unión de calstabilina 2 (FKBP12.6) a RyR2 en el 70% (n = 5 para FA, n = 3 para control, P < 0,0001; figura 9B).

- 5 Para todos los experimentos de retrofosforilación y coinmunoprecipitación, se confirmó la cantidad total de RyR2 cargado mediante una inmunotransferencia paralela de RyR2 inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-RyR2-5029 (figuras 9A y 9B).

Función de canal del receptor cardiaco de rianodina

- 10 Para determinar la significación fisiológica de la hiperfosforilación por PKA de RyR2 que se observó en perros con FA, se tomaron mediciones de canal individual de RyR2 en condiciones de fijación de voltaje, a 0 mV en bicapas lipídicas planas, usando condiciones iónicas simétricas. Se estudiaron las propiedades de canal individual auriculares de RyR2 en 17 canales de 5 perros con FA, y en 11 canales de 5 perros control. Ningún canal de perros control demostró una actividad aumentada, mientras que 15 de 17 canales (88%) de los perros con FA mostraron de manera significativa un aumento de la probabilidad de apertura (Po; FA: $0,412 \pm 0,07$; control: $0,008 \pm 0,002$; P < 0,001) y frecuencia de regulación (Fo; FA: $21,9 \pm 4,6$; control: $1,6 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$; P < 0,002 (figuras 10A y 10B).

Nueva unión de calstabilina 2 (FKBP12.6) en presencia de JTV-519

El tratamiento con JTV-519 (1 mM), permitió que se uniera calstabilina 2 recombinante (FKBP12.6) a RyR2 fosforilado por PKA que se había aislado de miocardio canino normal. En ausencia de JTV-519, la calstabilina 2 (FKBP12.6) no pudo asociarse con RyR2 fosforilado por PKA en estos experimentos (figura 11B).

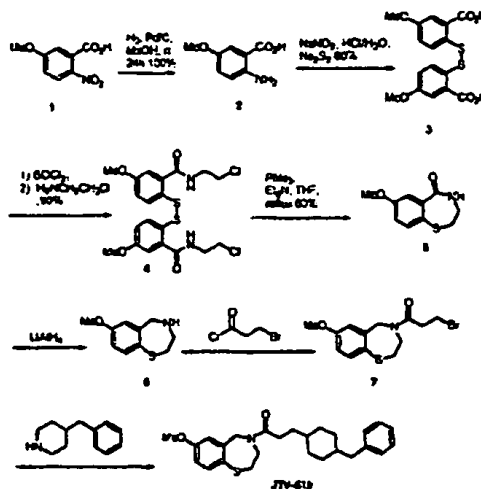
- 20 La significación fisiológica de la nueva unión de FKBP-12.6 en presencia de JTV-519 se demostró mediante las mediciones de canal individual de RyR2 en bicapas lipídicas planas. En presencia de calstabilina 2 recombinante (FKBP12.6) sola, los canales aislados demostraron un comportamiento notablemente anómalo, con un aumento de la probabilidad de apertura (Po) y la presencia de estados de subconductancia. Estas anomalías en la función de canal no se observaron cuando se añadió un inhibidor específico de PKA (PKI), lo que indica que las anomalías observadas en la función de canal eran específicas para la fosforilación de RyR2 por PKA. Cuando se trataron canales fosforilados por PKA con JTV-519, en presencia de calstabilina 2 recombinante (FKBP12.6), las mediciones de canal individual fueron similares a las observadas en presencia de PKI (figura 11A).

EJEMPLO DE REFERENCIA 9 - SÍNTESIS DE PRODUCTO INTERMEDIO DE 1,4-BENZOTIAZEPINA Y JTV-519

- 30 Para los experimentos *in vivo*, los inventores requirieron de una cantidad de gramos de JTV-519. Sin embargo, los intentos iniciales para preparar este compuesto mediante el producto intermedio de 1,4-benzotiazepina notificado, 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (compuesto 6 en el esquema 1, a continuación), fueron insatisfactorios. El grupo tio de este producto intermedio se oxida fácilmente por el aire para dar un compuesto de disulfuro, que hace que la síntesis del producto ciclado (5) sea imposible. Para superar este problema, los inventores desarrollaron un procedimiento novedoso que parte del ácido 2-nitro-5-metoxibenzoico (1) fácilmente disponible y barato. Este procedimiento se representa en el esquema 1 a continuación.

- 40 La reducción del grupo nitro del compuesto (1), usando H_2 con Pd/C como catalizador, dio ácido 2-amino-5-metoxibenzoico (2) con rendimiento cuantitativo. Se diazotó el compuesto (2) con NaNO_2 , y entonces se trató con Na_2S_2 para proporcionar el compuesto de disulfuro estable (3) con un rendimiento del 80%. Sin purificación adicional, se trató el disulfuro estable (3) con SOCl_2 , y entonces se hizo reaccionar con 2-cloroetilamina, en presencia de Et_3N , para dar una amida (4) con un rendimiento del 90%. Se convirtió el compuesto (4) en el compuesto ciclado (5) mediante un procedimiento en un solo recipiente mediante reflujo con trimetilfosfina y Et_3N en THF. Entonces se redujo la amida ciclada (5) con LiAlH_4 para producir 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (6).

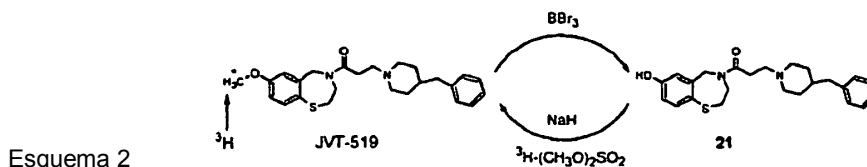
Esquema 1



Se preparó JTV-519 haciendo reaccionar el compuesto (6) con cloruro 3-bromopropiónico, y entonces haciendo reaccionar el producto resultante con 4-bencil-piperidina. Se estableció la estructura de JTV-519 mediante ¹H-RMN.

EJEMPLO DE REFERENCIA 10 - SÍNTESIS DE JTV-519 RADIOMARCADO

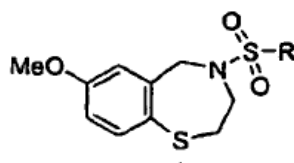
5 El procedimiento novedoso de los inventores para sintetizar JTV-519 radiomarcado se representa en el esquema 2 a continuación. Para preparar JTV-519 radiomarcado, se desmetiló JTV-519 en el anillo de fenilo usando BBr₃, para dar el compuesto de fenol (21). Se volvió a metilar el compuesto de fenol (21) con un agente de metilación radiomarcado (³H-sulfato de dimetilo) en presencia de una base (NaH) para proporcionar JTV-519 marcado con ³H (esquema 2).



Esquema 2

10 EJEMPLO DE REFERENCIA 11 - DERIVADOS DE 1,4-BENZOTIAZEPINA NOVEDOSOS Y MÉTODOS PARA SU SÍNTESIS

Se dan a conocer derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos para su uso en el tratamiento y la prevención de arritmias cardiacas a continuación en el presente documento. En particular, los inventores produjeron compuestos que tienen la siguiente estructura general:



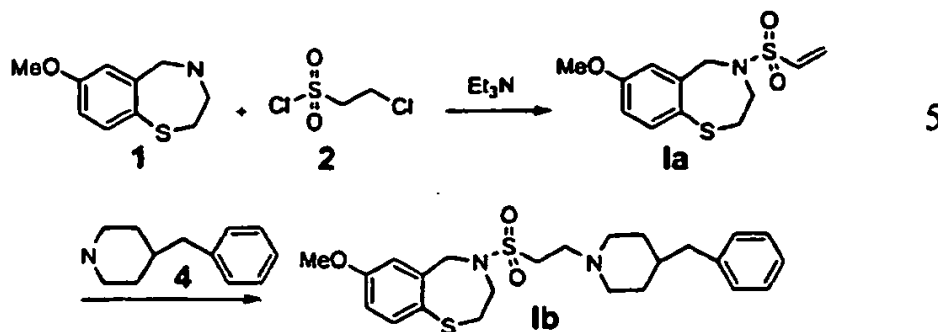
15 en la que R = arilo, alquenoilo, alquilo, -(CH₂)_nNR'₂ o -(CH₂)_nSR', y n = 0, 1, 2 ó 3; y en la que R' = alquilo o cicloalquilo. Se prepararon compuestos novedosos de esta estructura general haciendo reaccionar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina con cloruro de alquilsulfonilo o cloruro de arilsulfonilo, en presencia de una base tal como Et₃N. Pueden seguir reacciones adicionales (por ejemplo, la adición de 4-bencil-piperidina), para extender la cadena lateral, según se desee. Se representa una síntesis representativa de este procedimiento general en el esquema 3 a continuación.

20 Tal como demuestra el esquema 3, se añadieron cloruro de 2-cloroetanosulfonilo (180 mg; 1,1 mM) y Et₃N (140 mg; 1,1 mM) a 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (1) (194 mg; 1 mM) en CH₂Cl₂ (20 ml), a 0°C. Se agitó la mezcla a 0°C durante 2 h, y se lavó con H₂O y disolución saturada de NaHCO₃. La eliminación del disolvente dio el producto en bruto (1a), que se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (éter de petróleo: acetato de etilo =

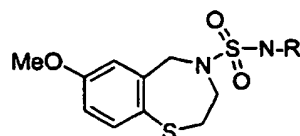
25

3:1). El rendimiento de esta síntesis fue de 280 mg, o del 95%. Se confirmó la estructura mediante RMN.

El esquema 3 muestra además que la cadena lateral de compuesto (Ia) se extendió haciendo reaccionar el compuesto (Ia) (28 mg; 0,1 mM) con 4-bencil-piperidina (21 mg; 0,13 mM) en CH_2Cl_2 . Tras llegar a completarse la reacción (mediante CCF), se eliminó la amina en exceso mediante un eliminador de base (gel de sílice funcionalizado con 3-(2-anhídrido succínico)propilo, 0,5 g). ^1H -RMN y HPLC mostraron que la pureza del producto (Ib) era > 98%.

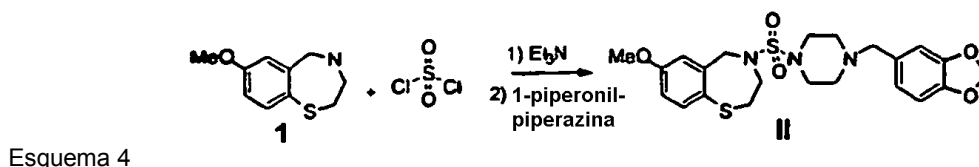


Adicionalmente, se produjeron compuestos que tienen la siguiente estructura general:

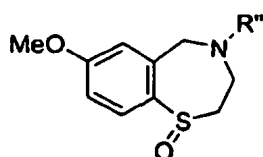


10 en la que $\text{R} = \text{arilo}$, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ o $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 ; y en la que $\text{R}' = \text{alquilo}$ o cicloalquilo. Se prepararon compuestos novedosos de esta estructura general mediante una reacción en un solo recipiente de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-benzotiazepina (1) con cloruro de sulfurilo, en presencia de una base (Et_3N), seguido por una amina primaria o secundaria. Se representa una síntesis representativa del este procedimiento general en el esquema 4 a continuación.

15 Tal como demuestra el esquema 4, se añadieron cloruro de sulfurilo (15,0 mg; 0,111 mM) y Et_3N (28,0 mg; 0,22 mM) a 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-benzotiazepina (1) (19,4 mg; 0,1 mM) en CH_2Cl_2 (20 ml), a 0°C . Tras agitar la mezcla durante 2 h a 0°C , se añadió 1-piperonilpiperazina (27 mg; 0,12 mM). Se agitó la mezcla durante otras 2 h, y entonces se lavó con H_2O y una disolución saturada de NaHCO_3 . Se eliminó la amina en exceso mediante la adición de un eliminador de base (gel de sílice funcionalizado con 3-(2-anhídrido succínico)propilo, 0,2 g). El rendimiento de esta síntesis fue de 36 mg, o del 77%.



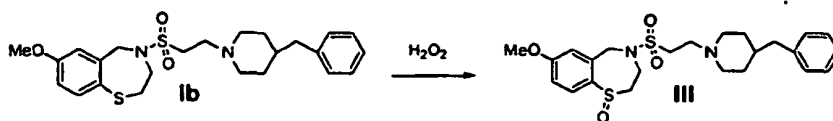
Se sintetizaron compuestos que tienen la siguiente estructura general:



25 en la que $\text{R}'' = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'''_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'''_2$ o $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'''_2$, y $\text{X} = \text{N}$ o S , y $n = 1, 2$ ó 3 . Se prepararon compuestos novedosos de esta estructura general mediante oxidación de JTV-519, o uno de los derivados de 1,4-benzotiazepina novedosos descritos anteriormente, con peróxido de hidrógeno. Se representa una síntesis representativa de este procedimiento general en el esquema 5 a continuación.

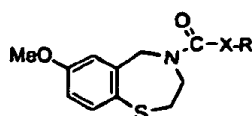
Tal como muestra el esquema 5, se añadió el compuesto (Ib) (21 mg; 0,05 mM) en MeOH (5 ml) a H_2O_2 (0,1 ml, en

exceso). Se agitó la mezcla durante 2 días, y se purificó el producto III mediante cromatografía sobre gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 10:1$). El rendimiento de esta síntesis fue de 19 mg, o del 91%.



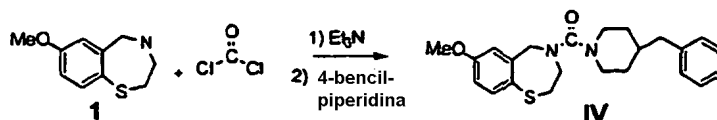
Esquema 5

Finalmente, se produjeron compuestos que tienen la siguiente estructura general:



5 en la que R = arilo, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo, cicloalquilo; y en la que X = NH u O. Se prepararon compuestos novedosos de esta estructura general haciendo reaccionar 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina (1) con trifosgeno, en presencia de una base (Et_3N), seguido por la adición de una amina primaria o secundaria o un alcohol. Se representa una síntesis representativa de este procedimiento general en el esquema 6 a continuación.

10



Esquema 6

EJEMPLO 12 – ENSAYO PARA SELECCIÓN DE ALTO RENDIMIENTO

Los inventores han desarrollado ensayos para seleccionar moléculas pequeñas biológicamente activas. Estos ensayos se basan en una nueva unión de proteína FKBP12 a RyR.

15 Puede desarrollarse un ensayo de alta eficacia para la selección de alto rendimiento para moléculas pequeñas mediante inmovilización de FKBP12.6 (proteína de fusión de GST) sobre una placa de 96 pocillos recubierta con glutatión. Se carga receptor de rianodina de tipo 2 (RyR2) fosforilado por PKA sobre la placa recubierta con FKBP12.6, y se incuba con análogos de JTV-519 a diversas concentraciones (10-100 nM) durante 30 min. Posteriormente, se lava la placa para eliminar el RyR2 no unido, y entonces se incuba con anticuerpo anti-RyR2 durante 30 min. Se lava la placa de nuevo para eliminar el anticuerpo anti-RyR2 no unido, y entonces se trata con anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente. Se lee la placa mediante un lector de placas de fluorescencia automático para determinar la actividad de unión.

25 En un ensayo alternativo, se fosforila RyR2 por PKA en presencia de ^{32}P -ATP. Se carga el RyR2 radiactivo fosforilado por PKA sobre una placa de 96 pocillos, recubierta con FKBP12.6, en presencia de análogos de JTV-519 a diversas concentraciones (10-100 nM) durante 30 min. Se lava la placa para eliminar el RyR2 radiomarcado no unido, y entonces se lee mediante un lector automático de placas.

EJEMPLO 13 – LOS DERIVADOS DE 1,4-BENZOTIAZEPINA NOVEDOSOS PERMITEN LA NUEVA UNIÓN DE FKBP12.6 A RYR2

30 Se fosforiló con PKA retículo sarcoplasmático cardíaco (RS) durante 30 min., a temperatura ambiente, lo que da como resultado la disociación completa de FKBP12.6 del complejo de RyR2. Entonces se incubó el RS (50 mg) durante 30 min., a temperatura ambiente, con FKBP12.6 250 nM y los compuestos de prueba. Se centrifugaron muestras a 100.000 g durante 10 min., y se lavaron los sedimentos 3 veces con tampón imidazol 10 mM. Tras lavado, se separaron las proteínas mediante PAGE al 15%. Se desarrollaron inmunotransferencias usando un anticuerpo anti-FKBP. Los resultados de este estudio se exponen en la figura 12. Los compuestos S4, S7, S20, S24, S25, S26 y S27 han de considerarse como ejemplos de referencia.

35

EJEMPLO 14 - PRUEBAS DE EJERCICIO/ECG Y REGISTRO DE TELEMETRÍA EN RATONES

Se realizaron estudios con ratones FKBP12.6^{+/-} (grupo de intervención), ratones de edad y sexo coincidentes FKBP12.6^{-/-} (control positivo) y ratones FKBP12.6^{+/+} de tipo natural (control negativo). Se demostró la ausencia de proteína FKBP12.6 (FKBP12.6^{-/-}) o disminución en (FKBP12.6^{+/-}) mediante inmunotransferencia en tejido cardíaco.

- 5 Se produjo la infusión de fármaco por vía subcutánea continua de JTV-519 (a una concentración objetivo en plasma de 1,0 μ M) o el derivado, S36 (a concentraciones objetivo en plasma de 1,0 μ M o 0,02 μ M), en ratones FKBP12.6^{+/-} o FKBP12.6^{-/-} a través de una minibomba osmótica, a una velocidad de 1,0 μ l por hora, durante 7 días antes de las pruebas de ejercicio (Alzet Durect Co., Cupertino, CA). Se anestesiaron ratones usando una inyección intraperitoneal de ketamina (50 μ g/kg) y xilazina (10 μ g/kg), y se implantaron radiotransmisores de ECG. Se obtuvieron registros de telemetría de ECG de animales ambulatorios 1 semana tras la implantación intraperitoneal (Data Sciences International, St. Paul, MN). Se usaron los criterios convencionales para medir los parámetros de ECG.

- 15 Para las pruebas de estrés, se sometieron ratones a ejercicio en una cinta para correr inclinada, de modo gradual, hasta agotamiento, y entonces se les inyectó por vía intraperitoneal epinefrina (0,2 mg/kg) para una estimulación simpática máxima. Entonces se promediaron las frecuencias cardíacas en reposo de los animales ambulatorios durante 4 h. Se realizaron durante la noche la recuperación tras las pruebas de ejercicio y la monitorización de los acontecimientos tras el ejercicio. Se midieron la longitud del ciclo sinusal (LCS), y PR, QRS, y los intervalos QT, y se calculó el intervalo QT corregido para la frecuencia (QTc) usando la fórmula de Mitchell. Se confirmaron los niveles de fármaco en plasma mediante HPLC. Se resumen los resultados en la figura 13.

20 EJEMPLO DE REFERENCIA 15 - JTV-519 MEJORA LA CONTRACTILIDAD CARDIACA EN UN MODELO DE RATA DE INSUFICIENCIA CARDIACA

- 25 Se sometieron ratas a infarto de miocardio (IM) mediante ligadura de la arteria coronaria izquierda. Se inició el tratamiento con JTV-519 (n = x) o vehículo (n = x), usando bombas osmóticas implantables (Alzet, Durect Corporation, Cupertino, CA), directamente tras el IM. Se determinaron los diámetros miocárdicos sistólico (Ds) y diastólico (Dd) a niveles papilares medios, usando ecocardiografía 24 h y 6 semanas tras el IM; entonces se calculó el acortamiento fraccional. Tal como se muestra en la figura 14, el tratamiento con JTV-519 mejoró de manera significativa la función cardíaca en ratas con insuficiencia cardíaca.

- 30 Aunque se ha descrito la invención anterior en cierto detalle con fines de claridad y comprensión, se apreciará por un experto en la técnica, a partir de una lectura de la descripción, que pueden realizarse diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

- El apéndice que sigue a las reivindicaciones de esta solicitud son las reivindicaciones tal como se presentaron de la solicitud "principal" de la que es divisionaria la presente solicitud. El apéndice es parte de esta solicitud y se incluye con el fin de proporcionar una descripción de la solicitud divisional presentada originariamente de las reivindicaciones de la solicitud principal.

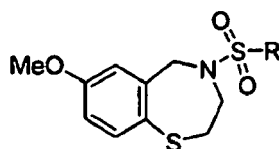
35

APÉNDICE – PARTE DE LA SOLICITUD

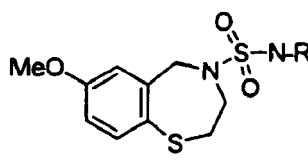
OTRAS INVENCIONES QUE PUEDEN REIVINDICARSE POSTERIORMENTE

REIVINDICACIONES TAL COMO SE PRESENTARON DE LA SOLICITUD PRINCIPAL

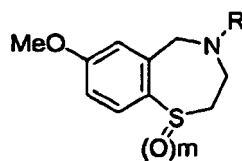
- 5 1. Método para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto que tiene, o es un candidato para, fibrilación auricular, que comprende administrar al sujeto una cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto, en el que el RyR2 es RyR2 auricular.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se limita o se impide la disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto disminuyendo el nivel de RyR2 fosforilado en el sujeto.
- 10 3. Método según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un ser humano.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto es una cantidad de JTV-519 eficaz para tratar o prevenir fibrilación auricular en el sujeto.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el JTV-519 trata o previene fibrilación auricular en el sujeto.
- 15 6. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 20 mg/kg/día.
7. Uso de JTV-519 en un método para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto que tiene, o es un candidato para, fibrilación auricular.
- 20 8. Método para tratar o prevenir fibrilación auricular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto, tratando o previniendo de ese modo fibrilación auricular en el sujeto.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la fibrilación auricular es fibrilación auricular no sostenida.
10. Método según la reivindicación 8, en el que la cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto es una cantidad de JTV-519 eficaz para tratar o prevenir fibrilación auricular en el sujeto.
- 25 11. Método según la reivindicación 10, en el que el JTV-519 trata o previene fibrilación auricular en el sujeto.
12. Método según la reivindicación 8, en el que la cantidad de JTV-519 eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 20 mg/kg/día.
- 30 13. Método para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto, que comprende administrar un agente al sujeto, en una cantidad eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en:



en la que R = arilo, alquenoilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;

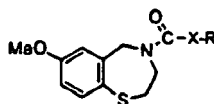


en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



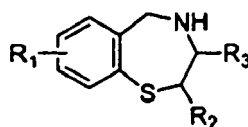
(c)

en la que $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ o $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, y $X = \text{N}$ o S , y $n = 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $m = 1$ ó 2 ;



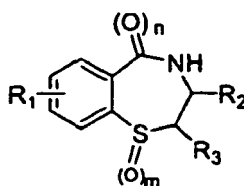
(d)

5 en la que $R =$ arilo, alquilo, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $X = \text{NH}$ u O ;



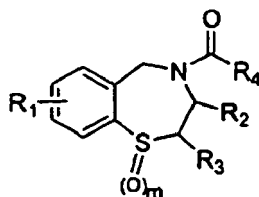
(e)

en la que $R_1 = \text{OR}'$, SR' , NR' , alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o H; en la que $R_2 = \text{H}$, alquilo o arilo; y en la que $R_3 = \text{H}$, alquilo o arilo;



(f)

10 en la que $R_1 = \text{H}$, OR' , SR' , NR' , alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = \text{H}$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = \text{H}$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y en la que $n = 0$ ó 1 ;



(g)

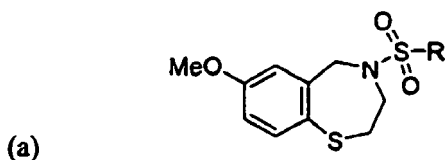
15 en la que $R_1 = \text{H}$, OR' , SR' , NR' , alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = \text{H}$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = \text{H}$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_4 = \text{H}$, haluro, alquenilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y

(h) cualquier forma oxidada de los mismos.

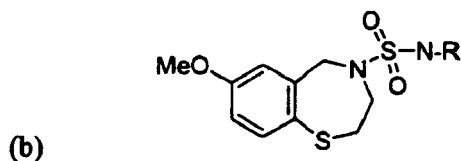
20 14. Método según la reivindicación 13, en el que se limita o impide la disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto disminuyendo el nivel de RyR2 fosforilado en el sujeto.

15. Método según la reivindicación 13, en el que el sujeto es un ser humano.

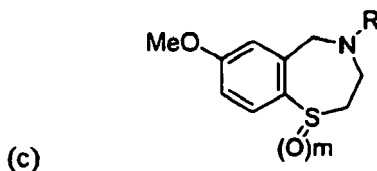
16. Método según la reivindicación 13, en el que el sujeto tiene taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC).
17. Método según la reivindicación 13, en el que el sujeto tiene, o es un candidato para, una arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio.
- 5 18. Método según la reivindicación 13, en el que la cantidad del agente eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto es una cantidad del agente eficaz para tratar o prevenir una arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en el sujeto.
- 10 19. Método según la reivindicación 18, en el que la arritmia cardiaca es una arritmia auricular o una arritmia ventricular.
20. Método según la reivindicación 19, en el que la arritmia auricular es fibrilación auricular.
21. Método según la reivindicación 21, en el que la fibrilación auricular es fibrilación auricular sostenida.
22. Método según la reivindicación 19, en el que la arritmia ventricular es arritmia ventricular inducida por ejercicio.
- 15 23. Método según la reivindicación 13, en el que el agente trata o previene una arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en el sujeto.
24. Método según la reivindicación 13, en el que la cantidad de agente eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 20 mg/kg/día.
- 20 25. Método según la reivindicación 13, en el que el agente es S4, S7, S-20, S-24, S-25, S-26, S-27 o S36.
26. Método según la reivindicación 25, en el que el agente es S36.
27. Uso de un agente en un método para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en:



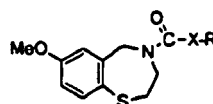
- 25 en la que R = arilo, alquenoilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



- en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;

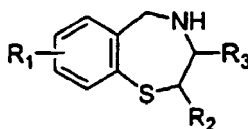


- 30 en la que R = $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ o $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, y X = N o S, y n = 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que m = 1 ó 2;



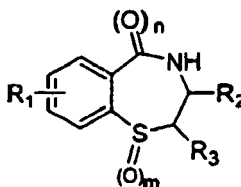
(d)

en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que X = NH u O;



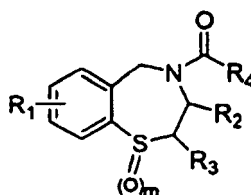
(e)

5 en la que R₁ = OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o H; en la que R₂ = H, alquilo o arilo; y en la que R₃ = H, alquilo o arilo;



(f)

10 en la que R₁ = H, OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o acilo; en la que R₂ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que R₃ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que m = 0, 1 ó 2; y en la que n = 0 ó 1;



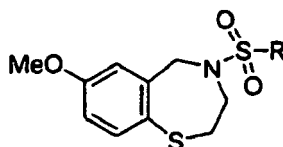
(g)

15 en la que R₁ = H, OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o acilo; en la que R₂ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que R₃ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que R₄ = H, haluro, alquenilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que m = 0, 1 ó 2; y

(h) cualquier forma oxidada de los mismos.

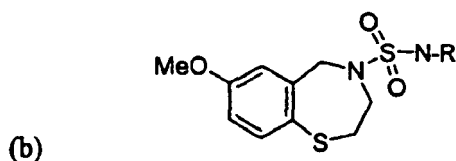
28. Método para tratar o prevenir una arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en un sujeto, que comprende administrar un agente al sujeto, en una cantidad eficaz para limitar o impedir una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el sujeto, en la que el agente se selecciona del grupo que consiste en:

20

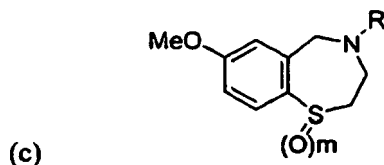


(a)

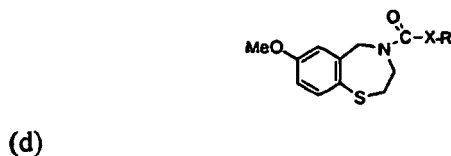
en la que R = arilo, alquenilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



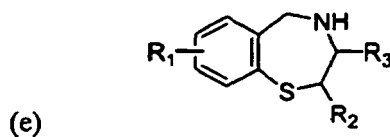
en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



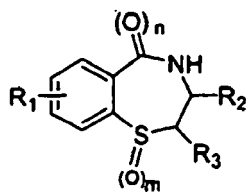
5 en la que R = $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ o $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, y X = N o S, y n = 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que m = 1 ó 2;



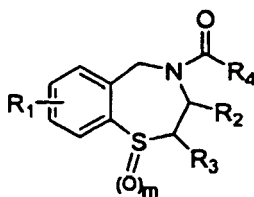
en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que X = NH u O;



10 en la que R₁ = OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o H; en la que R₂ = H, alquilo o arilo; y en la que R₃ = H, alquilo o arilo;



15 en la que R₁ = H, OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o acilo; en la que R₂ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que R₃ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que m = 0, 1 ó 2; y en la que n = 0 ó 1;



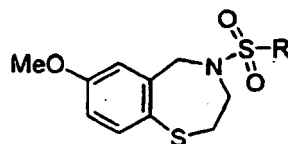
en la que R₁ = H, OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o acilo; en la que R₂ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que R₃ = H, alquilo, alquenilo o arilo; en la que R₄ = H, haluro, alquenilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que m = 0, 1 ó 2;

2; y

(h) cualquier forma oxidada de los mismos.

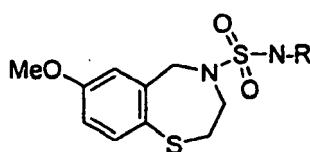
29. Método para tratar o prevenir una arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en un sujeto, que comprende administrar un agente al sujeto, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en el sujeto, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en:

5



(a)

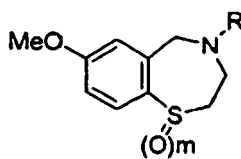
en la que R = arilo, alquenoilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



(b)

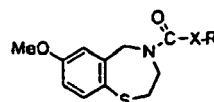
10

en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo;



(c)

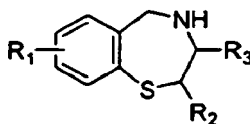
en la que R = $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ o $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, y X = N o S, y n = 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que m = 1 ó 2;



(d)

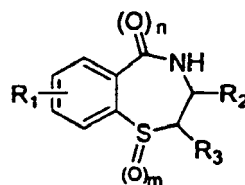
15

en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ y n = 0, 1, 2 ó 3, y R' = alquilo o cicloalquilo; y en la que X = NH u O;



(e)

en la que R₁ = OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' = alquilo, arilo o H; en la que R₂ = H, alquilo o arilo; y en la que R₃ = H, alquilo o arilo;

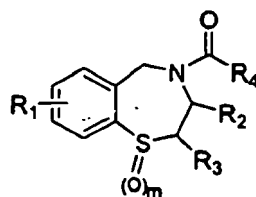


(f)

20

en la que R₁ = H, OR', SR', NR', alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y R' =

alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y en la que $n = 0$ ó 1 ;

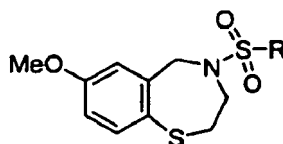


(g)

5 en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_4 = H$, haluro, alquenilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y

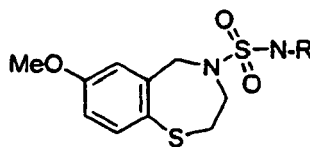
(h) cualquier forma oxidada de los mismos.

- 10 30. Método según la reivindicación 29, en el que la arritmia cardiaca es una arritmia auricular o una arritmia ventricular.
31. Método según la reivindicación 30, en el que la arritmia auricular es fibrilación auricular.
32. Método según la reivindicación 30, en el que la arritmia ventricular es arritmia ventricular inducida por ejercicio.
- 15 33. Método según la reivindicación 29, en el que la cantidad de agente eficaz para tratar o prevenir una arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en el sujeto es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 20 mg/kg/día.
34. Método según la reivindicación 29, en el que el agente es S4, S7, S-20, S-24, S-25, S-26, S-27 o S36.
35. Método según la reivindicación 34, en el que el agente es S36.
- 20 36. Uso de un agente en un método para tratar o prevenir una arritmia cardiaca, insuficiencia cardiaca y/o muerte súbita cardiaca inducida por ejercicio en un sujeto, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en:



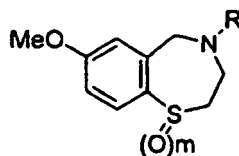
(a)

en la que $R =$ arilo, alquenilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo;



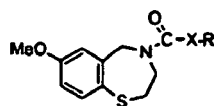
(b)

25 en la que $R =$ arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$ o $-(CH_2)_nSR'$, y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo;



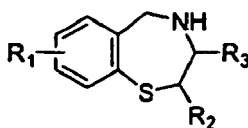
(c)

en la que $R = CO(CH_2)_nXR'_2, SO_2(CH_2)_nXR'_2$ o $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, y $X = N$ o S , y $n = 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que $m = 1$ ó 2 ;



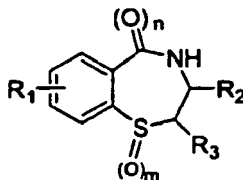
(d)

en la que R = arilo, alquilo, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ y $n = 0, 1, 2$ ó 3 , y $R' =$ alquilo o cicloalquilo; y en la que X = NH u O;



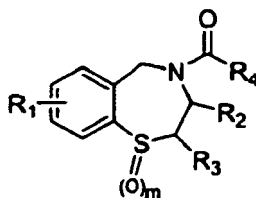
(e)

5 en la que $R_1 = OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o H; en la que $R_2 = H$, alquilo o arilo; y en la que $R_3 = H$, alquilo o arilo;



(f)

10 en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y en la que $n = 0$ ó 1 ;



(g)

15 en la que $R_1 = H, OR', SR', NR'$, alquilo o haluro, en la posición 2, 3, 4 ó 5 en el anillo de fenilo, y $R' =$ alquilo, arilo o acilo; en la que $R_2 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_3 = H$, alquilo, alquenilo o arilo; en la que $R_4 = H$, haluro, alquenilo, ácido carboxílico o un alquilo que contiene O, S o N; y en la que $m = 0, 1$ ó 2 ; y

(h) cualquier forma oxidada de los mismos.

37. Método para identificar un agente para su uso en el tratamiento o la prevención de fibrilación auricular o insuficiencia cardiaca, que comprende las etapas de:

(a) obtener o generar un cultivo de células que contienen RyR2;

20 (b) poner en contacto las células con un agente candidato;

(c) exponer las células a una o más condiciones de las que se sabe que aumentan la fosforilación de RyR2 en las células; y

(d) determinar si el agente limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en las células.

25 38. Método según la reivindicación 37, que comprende además la etapa de:

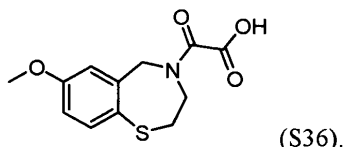
(e) determinar si el agente tiene un efecto sobre un acontecimiento biológico asociado con RyR2 en las células.

39. Agente identificado mediante el método según la reivindicación 37.
40. Método para identificar un agente para su uso en el tratamiento o la prevención de fibrilación auricular o insuficiencia cardíaca, que comprende las etapas de:
- 5 (a) obtener o generar un animal que contiene RyR2;
- (b) administrar un agente candidato al animal;
- (c) exponer el animal a una o más condiciones de las que se sabe que aumentan la fosforilación de RyR2 en las células; y
- (d) determinar si el agente limita o impide una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en el animal.
- 10 41. Método según la reivindicación 40, que comprende además la etapa de:
- (e) determinar si el agente tiene un efecto sobre un acontecimiento biológico asociado con RyR2 en el animal.
42. Agente identificado mediante el método según la reivindicación 40.

15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la estructura:



- 5 2. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según la reivindicación 1 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el portador comprende carboximetilcelulosa, celulosa cristalina, glicerina, goma arábiga, lactosa, estearato de magnesio, metilcelulosa, solución salina, alginato de sodio, sacarosa, almidón, talco o agua.
- 10 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en forma de una cápsula, comprimido, polvo, gránulo o suspensión.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende además un aditivo.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que el aditivo es uno o más de un antioxidante, colorante, agente de mejora del aroma, conservante, edulcorante, aglutinante o lubricante.
- 15 7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un estado cardíaco en un sujeto.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, siendo el estado cardíaco arritmia cardíaca, taquicardia, arritmia auricular, taquiarritmia auricular, fibrilación auricular, fibrilación auricular sostenida, fibrilación auricular no sostenida, arritmia ventricular, fibrilación ventricular, taquicardia ventricular, taquicardia ventricular sostenida, taquicardia ventricular no sostenida, taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC), insuficiencia cardíaca, muerte súbita cardíaca o muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio.
- 20 9. Compuesto según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado cardíaco en un sujeto.
10. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un estado cardíaco en un sujeto.
- 25 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el estado cardíaco se selecciona del grupo que consiste en arritmia cardíaca, taquicardia, arritmia auricular, taquiarritmia auricular, fibrilación auricular, fibrilación auricular sostenida, fibrilación auricular no sostenida, arritmia ventricular, fibrilación ventricular, taquicardia ventricular, taquicardia ventricular sostenida, taquicardia ventricular no sostenida, taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC), insuficiencia cardíaca, muerte súbita cardíaca y muerte súbita cardíaca inducida por ejercicio.
- 30

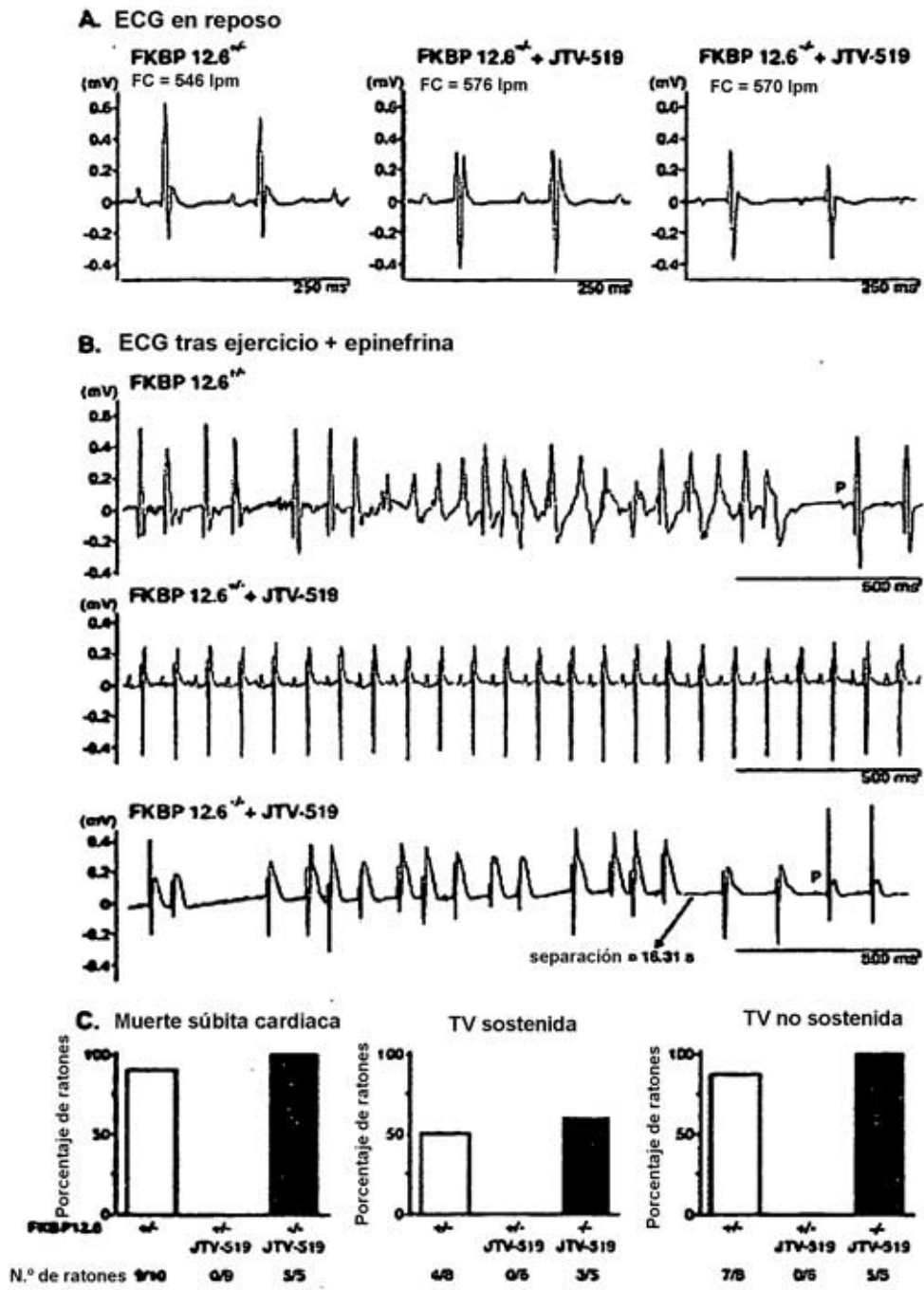


FIG. 1

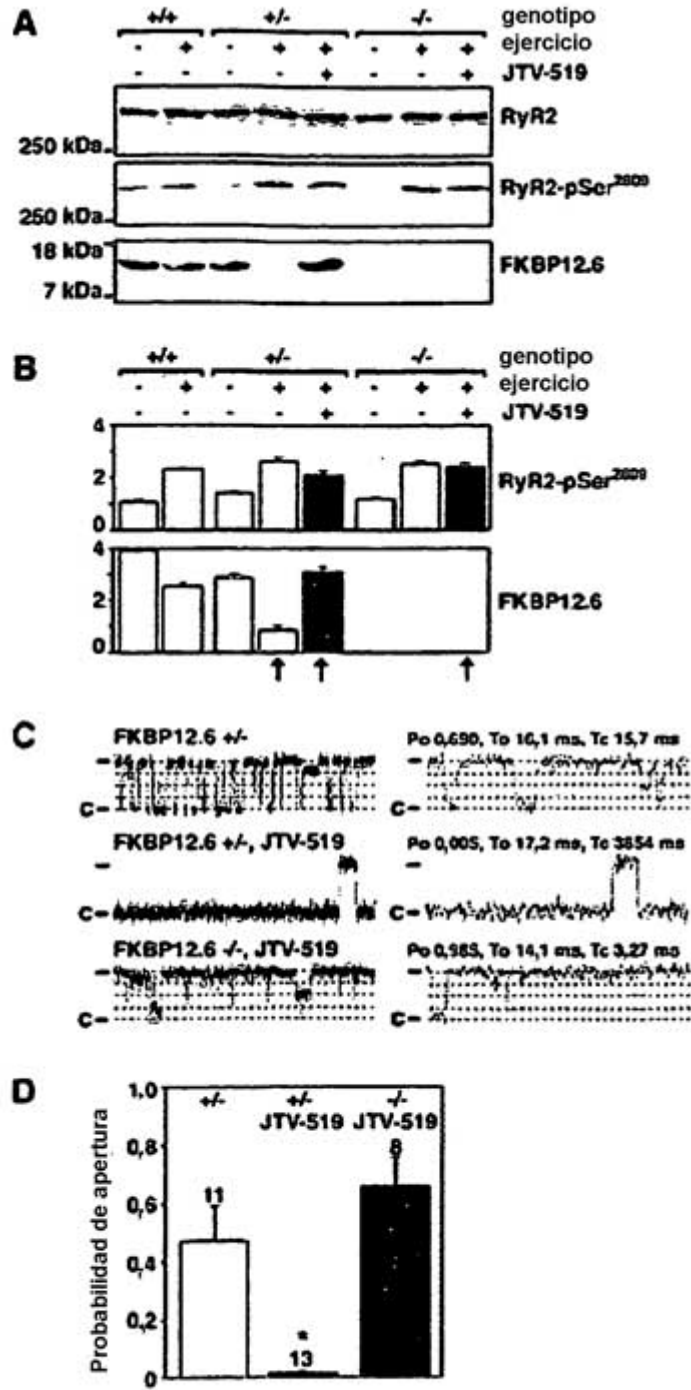


FIG. 2

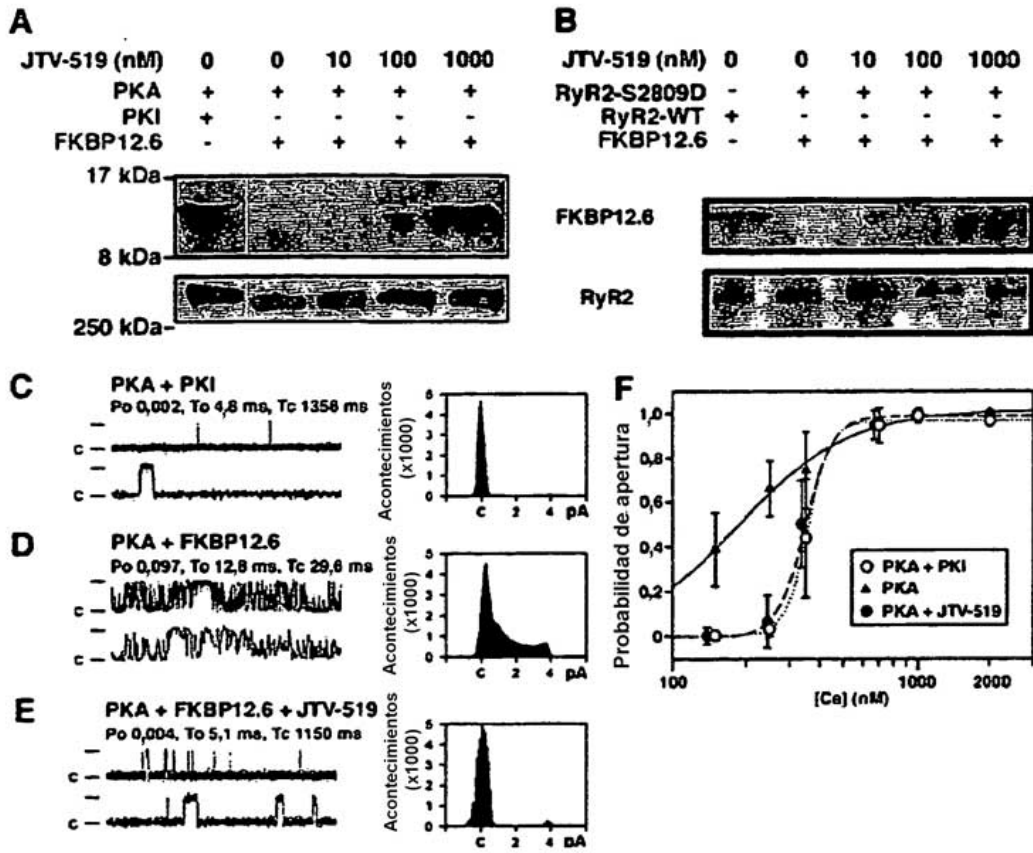


FIG. 3

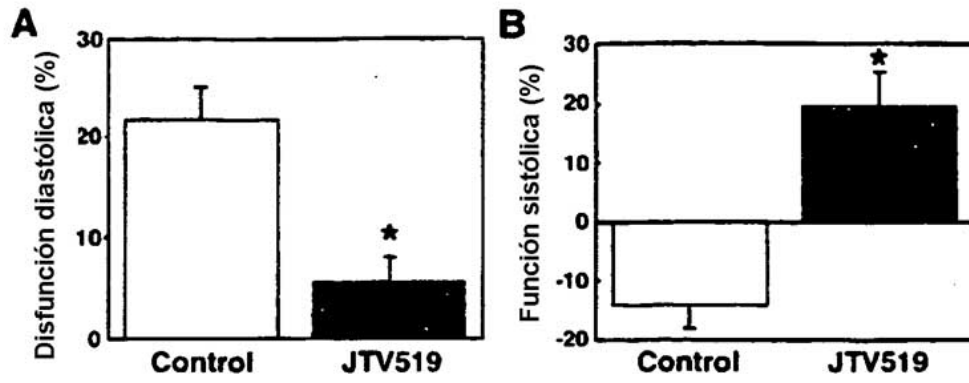


FIG. 4

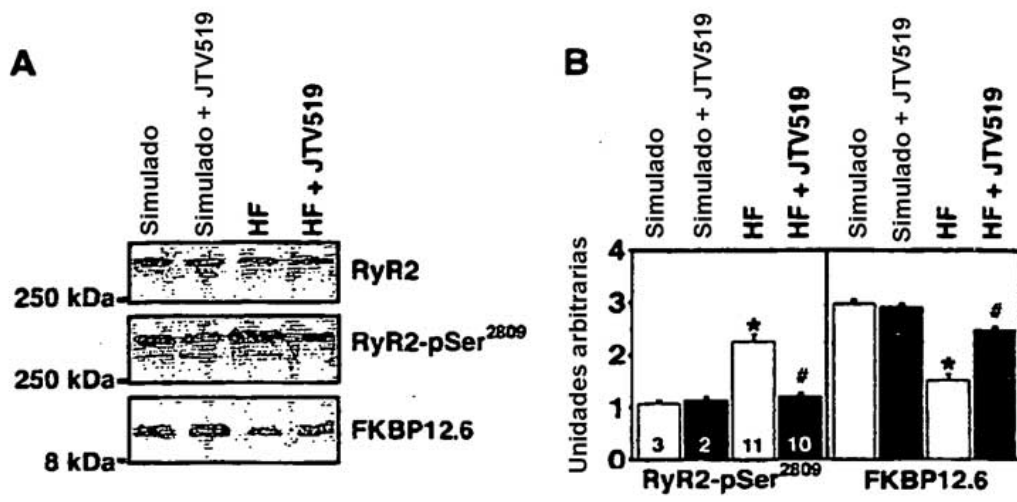


FIG. 5

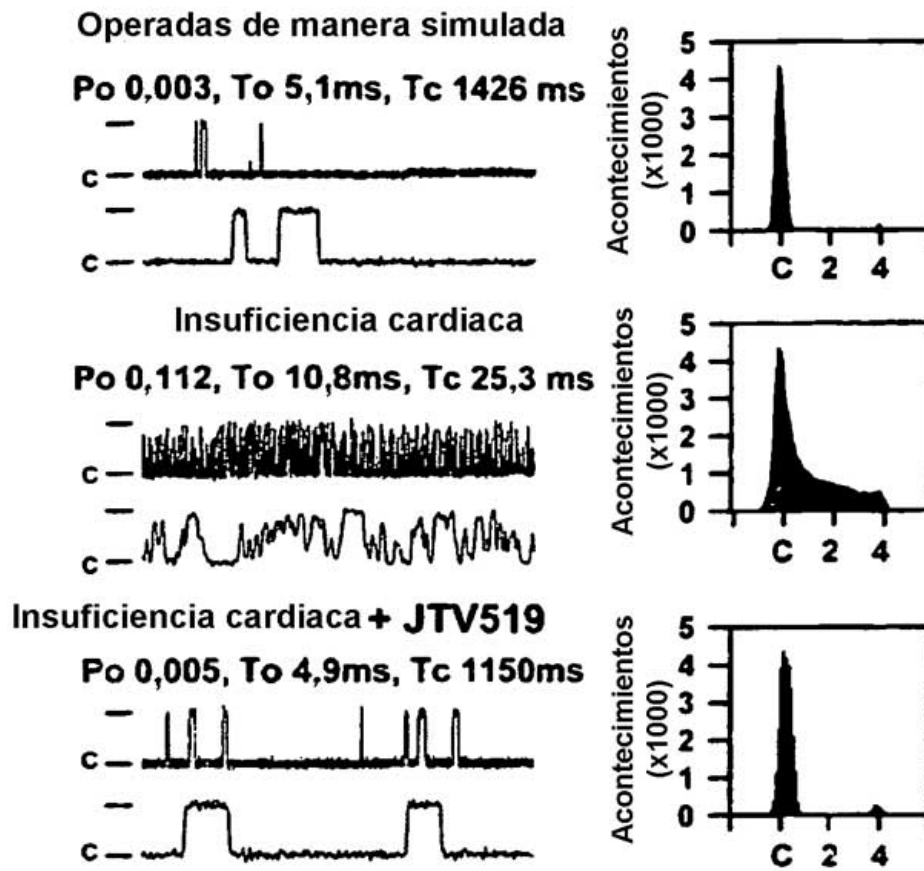


FIG. 6

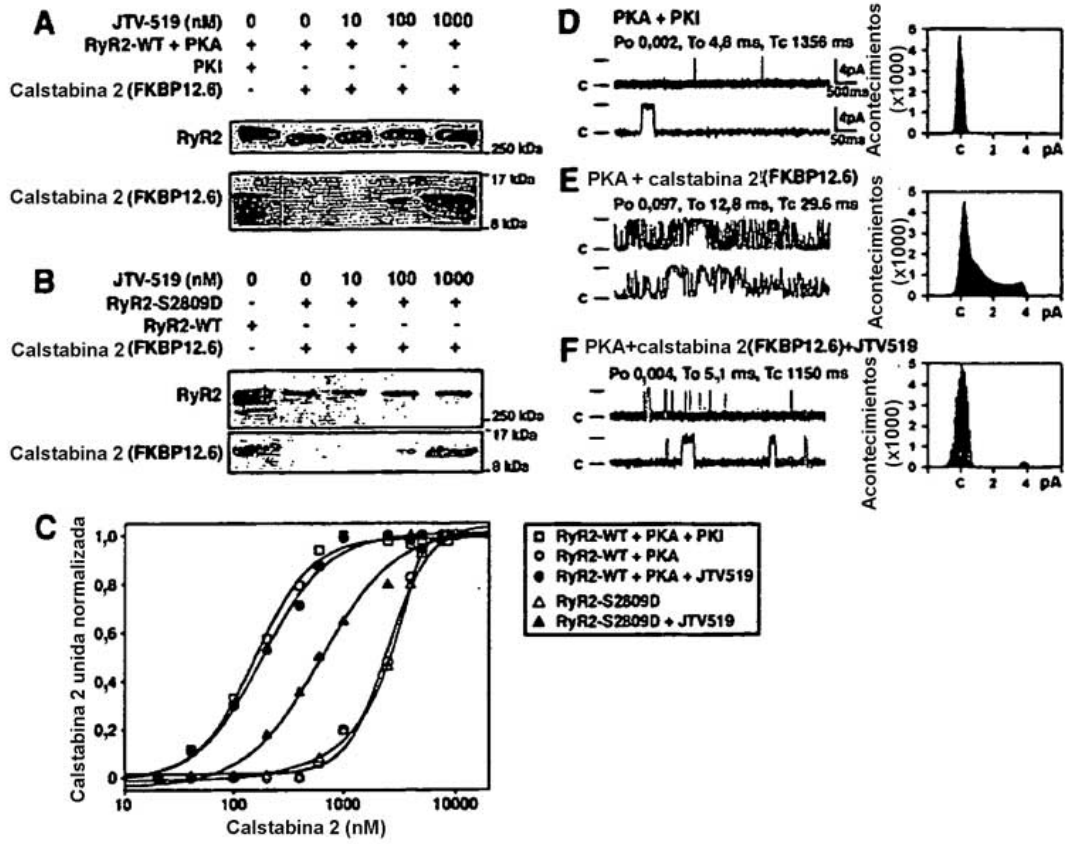


FIG. 7

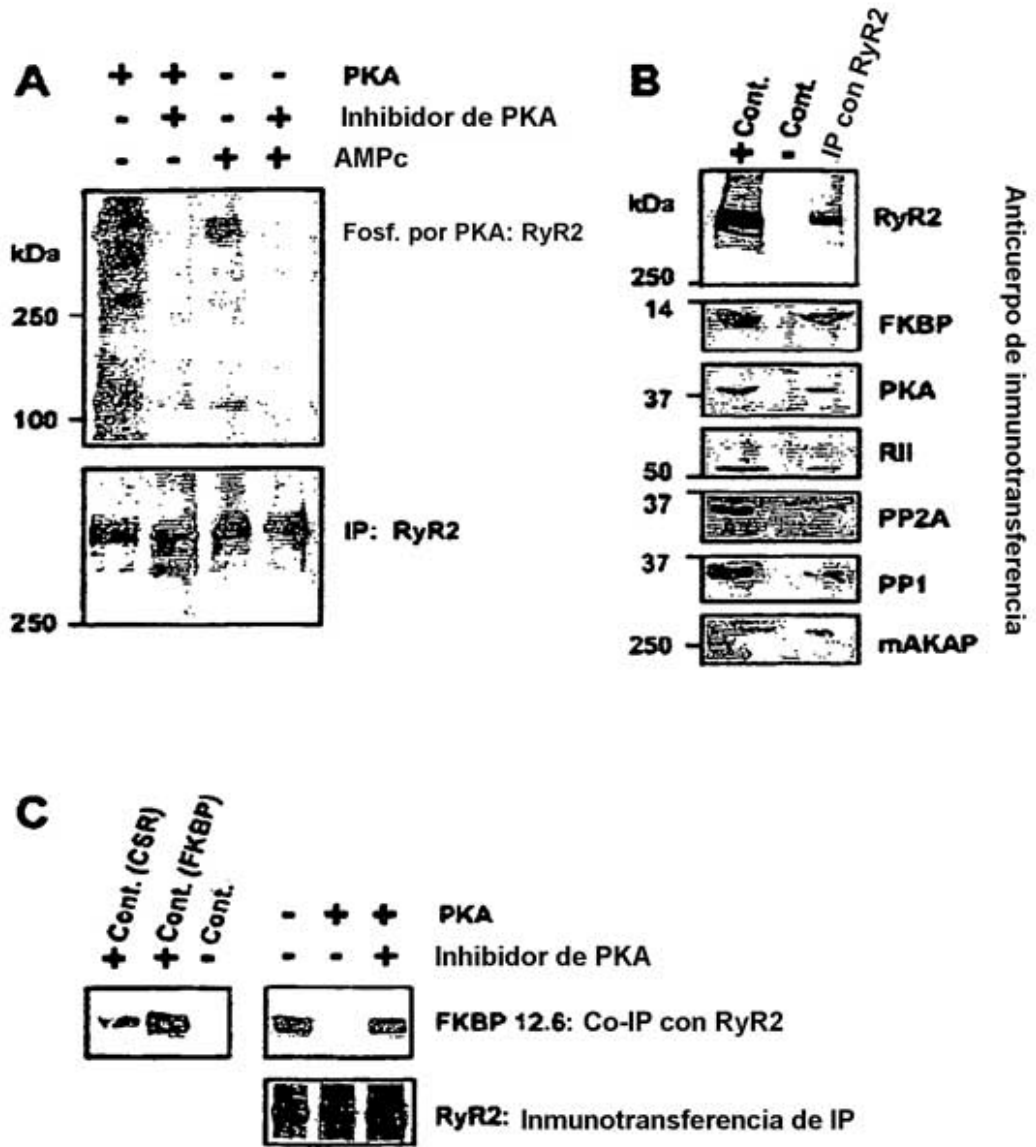


FIG. 8

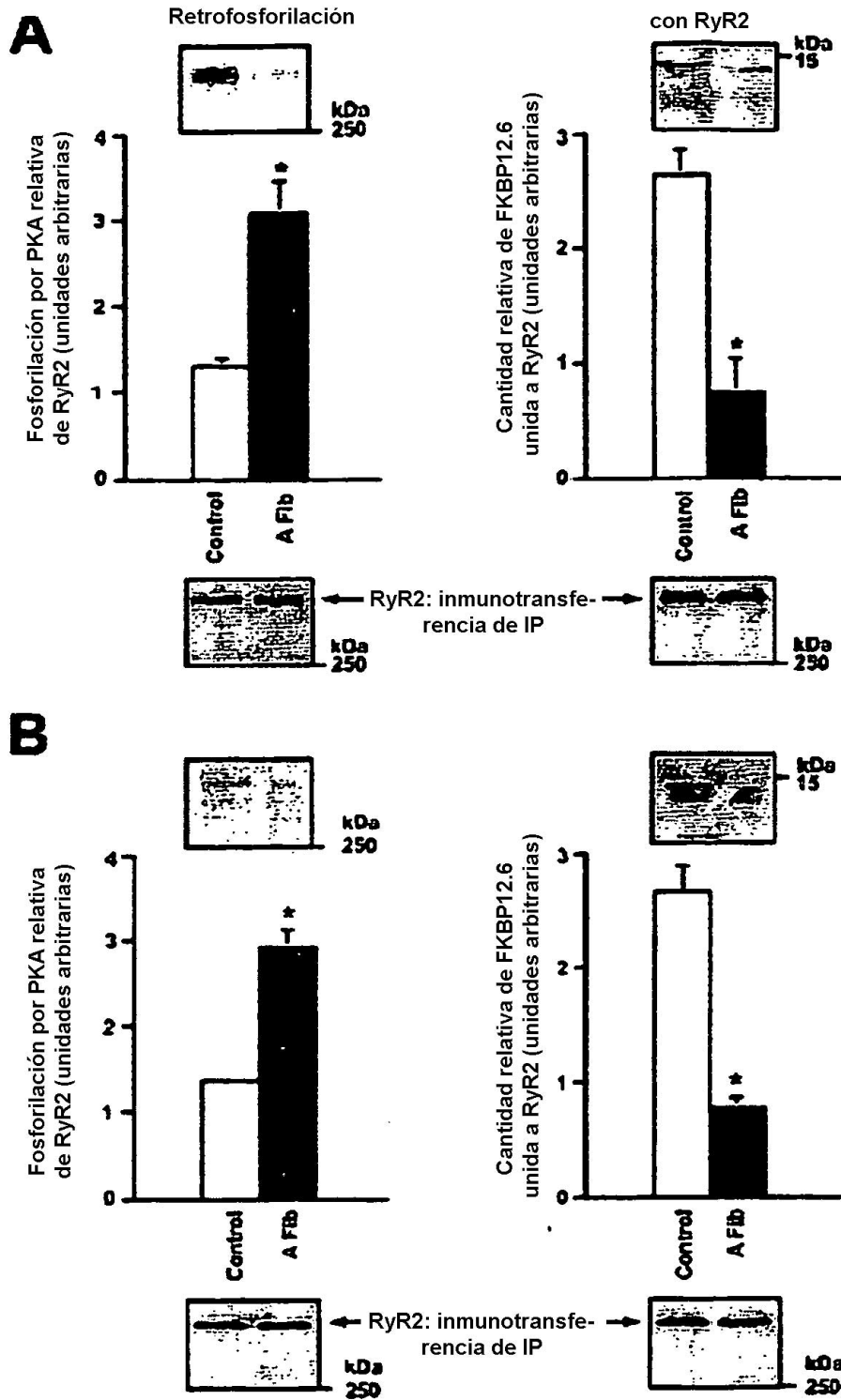


FIG. 9

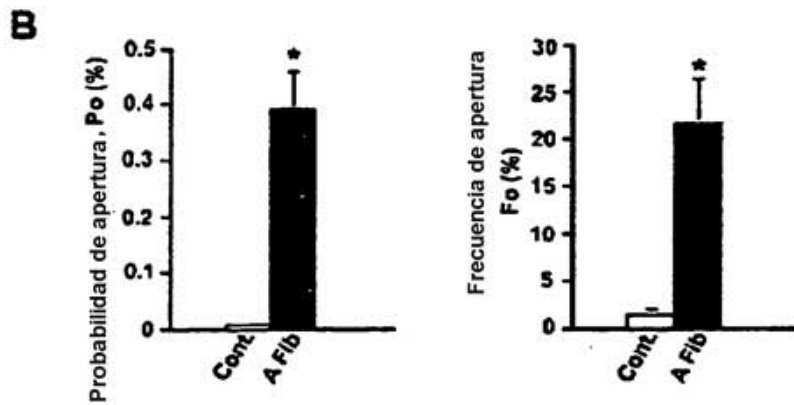
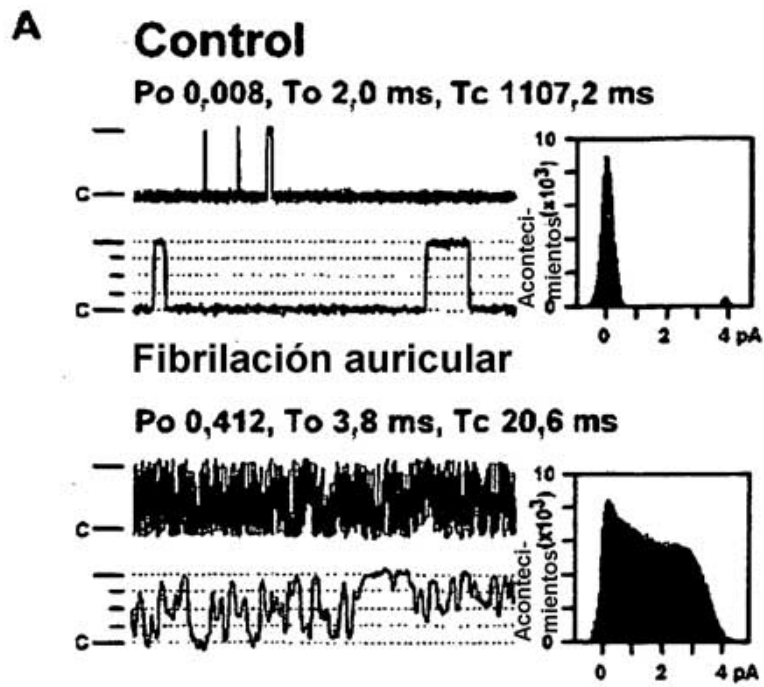


FIG. 10

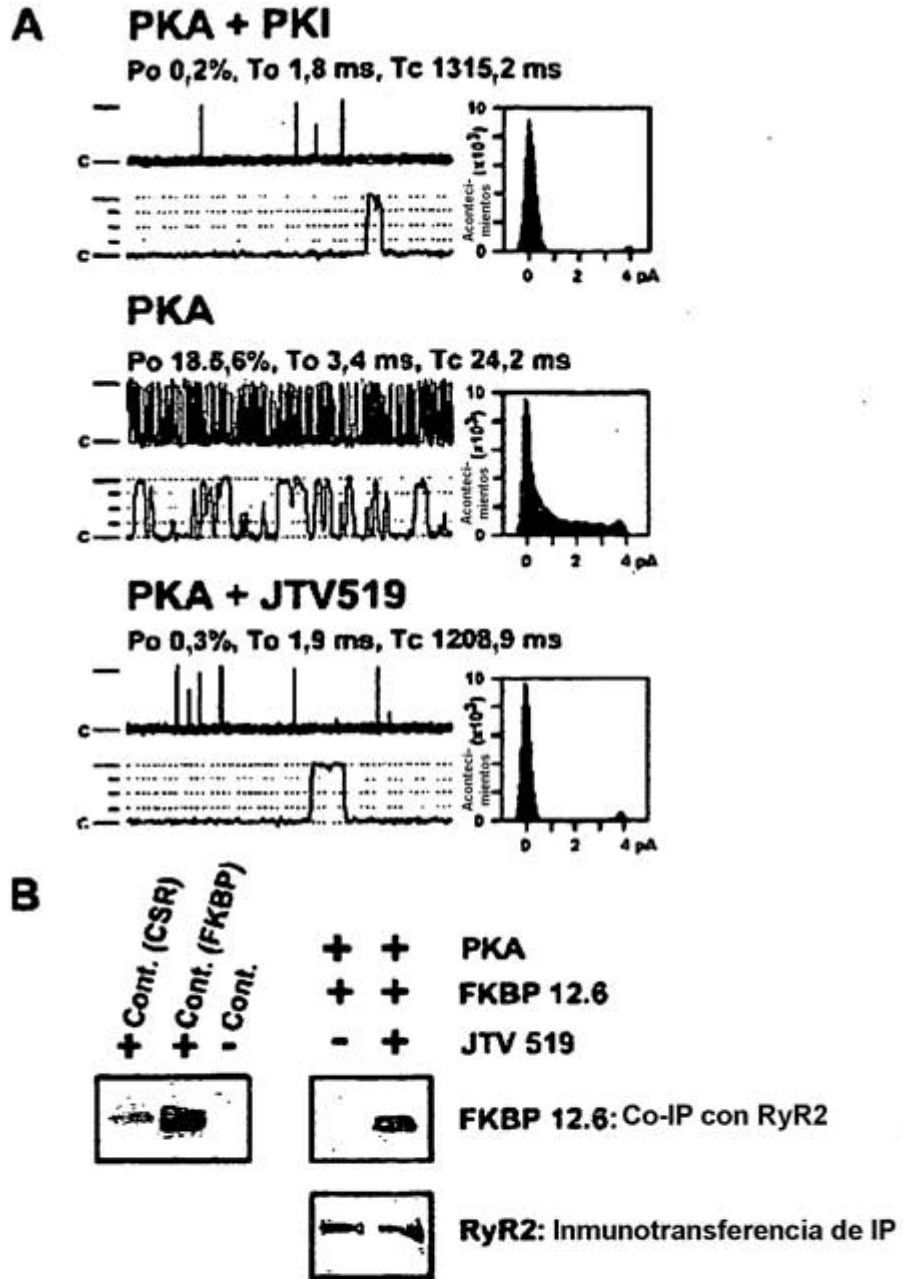


FIG. 11

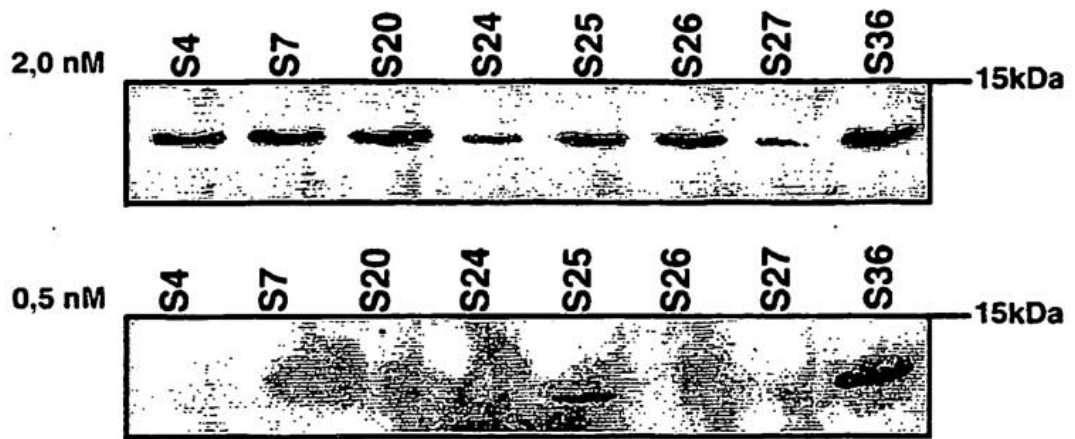


FIG. 12

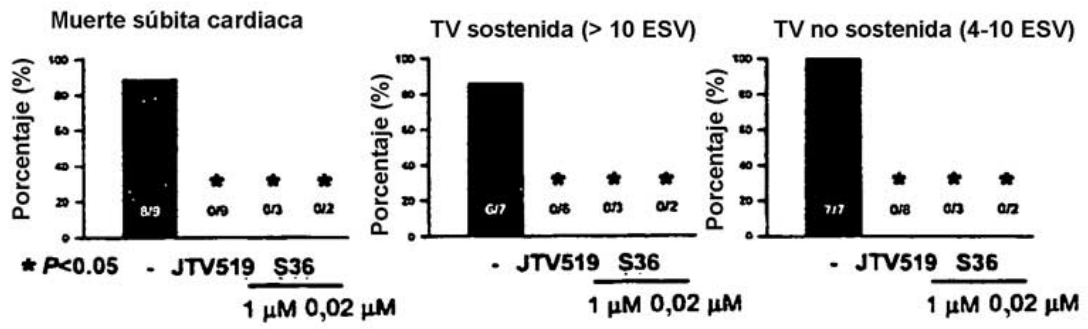


FIG. 13

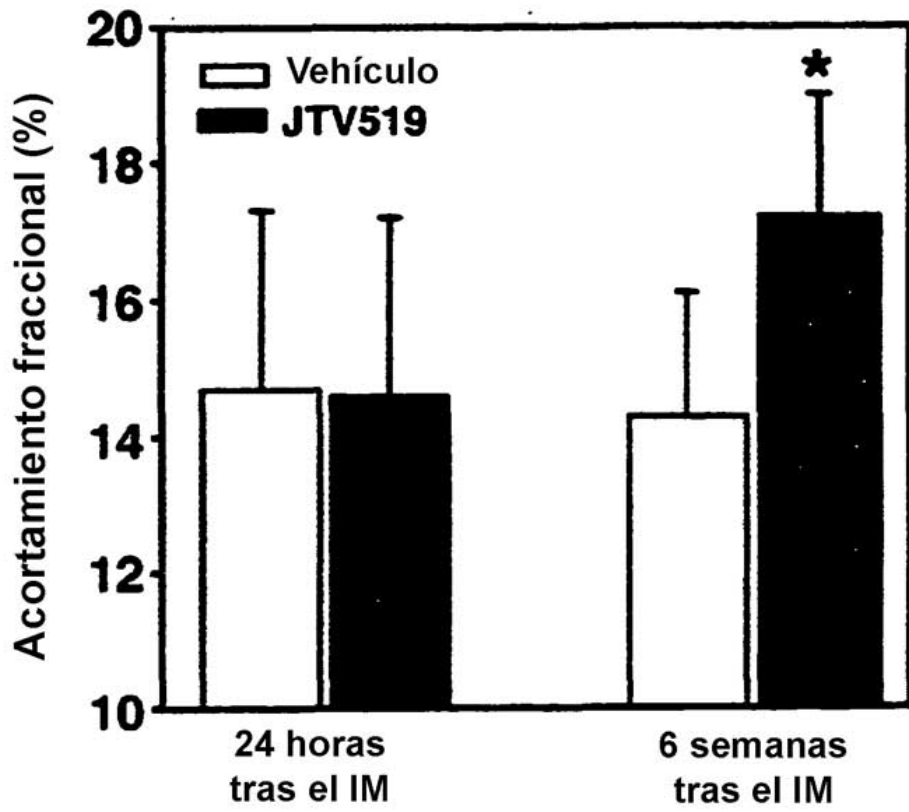
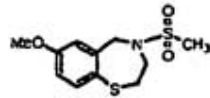
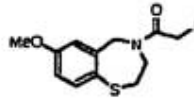


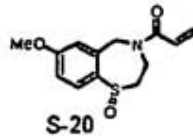
FIG. 14



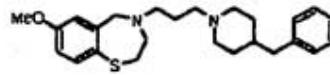
S4



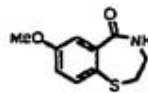
S7



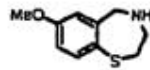
S-20



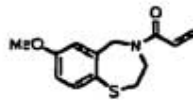
S-24



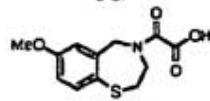
S-25



S-26



S-27



S36

FIG. 15