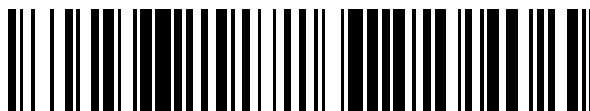


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 765**

51 Int. Cl.:

**C07D 281/10** (2006.01)

**A61K 31/554** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2006 E 09013475 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2177224**

54 Título: **Agentes para evitar y tratar trastornos que implican la modulación de los receptores de RyR**

30 Prioridad:

**25.08.2005 US 212413**

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

**03.06.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 405 765 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

Agentes para evitar y tratar trastornos que implican la modulación de los receptores de RyR.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a compuestos y a su uso para tratar y evitar trastornos y enfermedades asociados con los receptores de rianodina (RyR) que regulan el funcionamiento de los canales de calcio en las células. Más en particular, la invención divulga compuestos que están relacionados con las 1,4-benzotiazepinas y que son útiles para tratar trastornos cardíacos y del músculo esquelético. La invención también divulga composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y artículos de fabricación que comprenden las composiciones farmacéuticas.

**Antecedentes de la invención**

10 El retículo sarcoplásmico (RS) es una estructura en las células que funciona, entre otras cosas, como un almacén de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular especializado. Los canales en el RS denominados receptores de rianodina (RyR) se abren y se cierran para regular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS al citoplasma intracelular de la célula. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma desde el RS incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico. La probabilidad de apertura ( $P_o$ ) de los RyR se refiere a la posibilidad de que el canal de RyR esté abierto en cualquier momento dado, y por lo tanto  
15 pueda liberar  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma desde el RS.

Hay tres tipos de receptores de rianodina, de los que todos son canales de  $\text{Ca}^{2+}$  altamente relacionados: RyR1, RyR2 y RyR3. RyR1 se encuentra predominantemente en el músculo esquelético así como en otros tejidos, RyR2 se encuentra predominantemente en el corazón así como en otros tejidos, y RyR3 se encuentra en el cerebro así como en otros tejidos. Los canales de RyR están formados por cuatro polipéptidos de RyR asociados con cuatro proteínas de unión a FK506 (FKBP), específicamente FKBP12 (calstabilina-1) y FKBP12.6 (calstabilina-2). La calstabilina-1 se une a RyR1, la calstabilina-2 se une a RyR2, y la calstabilina-1 se une a RyR3. Las proteínas FKBP (calstabilina-1 y calstabilina-2) se unen al canal de RyR (una molécula por subunidad de RyR), estabilizan el funcionamiento del canal de RyR, y facilitan el paso acoplado entre canales de RyR próximos, evitando de este modo la activación anormal del canal durante el estado cerrado del canal.

25 Además de las proteínas de unión calstabilina, la proteína cinasa A (PKA) también se une a la superficie citoplásmica de los RyR. La fosforilación por PKA de los RyR provoca la disociación parcial de las calstabinas de los RyR. La disociación de calstabilina del RyR provoca un incremento en la probabilidad de apertura de RyR, y por lo tanto un incremento en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS al citoplasma intracelular.

30 La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS en células del músculo esquelético y células del corazón es un mecanismo fisiológico clave que controla el funcionamiento del músculo, debido a que un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma intracelular provoca la contracción del músculo.

El acoplamiento de excitación-contracción (EC) en los músculos esqueléticos implica la despolarización eléctrica de la membrana plasmática en el túbulo transverso (túbulo T), lo que activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L de paso por voltaje (LTCC). Los LTCC desencadenan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS por medio de la interacción física con RyR1. El incremento resultante en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico induce la interacción actina-miosina y la contracción del músculo. Para permitir la relajación, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se vuelve a bombear hacia el RS por medio de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPasa del RS (SERCA), lo que está regulado por fosfolambano (PLB) que depende del tipo de fibra muscular.

35 Se ha demostrado que las formas de enfermedad que dan como resultado la activación mantenida del sistema nervioso simpático y el incremento en los niveles de catecolamina en plasma provocan la activación inadaptada de las rutas de estrés intracelulares dando como resultado la desestabilización del estado cerrado del canal de RyR1 y la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Se encontró que la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS por medio de canales de RyR1 reducía los almacenes de calcio del RS intracelular, incrementaba el consumo de energía de compensación y daba como resultado una aceleración significativa en la fatiga del músculo. El defecto de músculo inducido por estrés reduce de forma permanente el funcionamiento *in vivo* y del músculo aislado, en particular en situaciones de incremento de la demanda.

También se ha demostrado que la desestabilización del estado cerrado de RyR1 se produce bajo condiciones patológicas de incremento en la activación simpática e implica la reducción en la estabilización de la subunidad del canal de calstabilina-1 (FKBP12). Los experimentos preliminares de eficacia han demostrado que la activación de PKA como efector final de los sistemas nerviosos simpáticos incrementa la fosforilación por PKA de RyR1 en Ser-2843 lo que disminuye la afinidad de unión de calstabilina-1 a RyR1 e incrementa la probabilidad de apertura del canal.

55 En el músculo estriado cardíaco, RyR2 es el principal canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para el acoplamiento de EC y la contracción del músculo. Durante el acoplamiento de EC, la despolarización de la membrana celular del músculo cardíaco durante la fase cero del potencial de acción activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de paso por voltaje. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de paso por voltaje abiertos a su vez inicia la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS

por medio de RyR2. Este proceso se conoce como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ . La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por RyR2 activa entonces las proteínas contráctiles en la célula cardíaca, dando como resultado la contracción del músculo cardíaco.

5 La fosforilación de RyR2 cardíaco por PKA es una parte importante de la respuesta de "lucha o huida" que incrementa la ganancia en el acoplamiento de EC cardíaco aumentando la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  liberado para un desencadenamiento dado. Esta ruta de señalización proporciona un mecanismo por el que la activación del sistema nervioso simpático, en respuesta al estrés, da como resultado un incremento en la salida cardíaca. La fosforilación por PKA de RyR2 incrementa la probabilidad de apertura del canal disociando la calstabilina-2 (FKBP12.6) del complejo del canal. Esto, a su vez, incrementa la sensibilidad de RyR2 para la activación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

10 A pesar de los avances en el tratamiento, la insuficiencia cardíaca sigue siendo una causa importante de mortalidad en los países occidentales. Un rasgo característico importante de la insuficiencia cardíaca es la reducción en la contractilidad miocárdica. En la insuficiencia cardíaca, las anomalías contráctiles resultan, en parte, de alteraciones en la ruta de señalización que permite que el potencial de acción cardíaco desencadene la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de los canales de RyR2 y la contracción del músculo. En particular, en corazones con insuficiencia, la amplitud de la oscilación de  $\text{Ca}^{2+}$  de toda la célula disminuye y la duración se prolonga.

15 La arritmia cardíaca, una característica común de la insuficiencia cardíaca, da como resultado muchas de las muertes asociadas con la enfermedad. La fibrilación auricular (AF) es la arritmia cardíaca más común en humanos, y representa una causa principal de morbilidad y mortalidad. La remodelación estructural y eléctrica (incluyendo el acortamiento de la refractariedad auricular, la pérdida de la adaptación relacionada con la velocidad de la refractariedad, y el acortamiento de la longitud de onda de las ondas pequeñas de reentrada) acompaña a la taquicardia mantenida. Esta remodelación es probablemente importante en el desarrollo, mantenimiento y progresión de la fibrilación auricular. Los estudios sugieren que el control del calcio desempeña un papel en la remodelación eléctrica en la fibrilación auricular.

20 Aproximadamente un 50 % de todos los pacientes con cardiopatía mueren por arritmias cardíacas mortales. En algunos casos, una arritmia ventricular en el corazón es rápidamente mortal (un fenómeno denominado "muerte súbita de origen cardíaco" (MSC). Las arritmias ventriculares mortales y la MSC también se producen en individuos jóvenes, por lo demás sanos, que no saben que tienen una cardiopatía estructural. De hecho, la arritmia ventricular es la causa más común de muerte súbita en individuos por lo demás sanos.

25 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 provoca la MSC). En sujetos con TVPC, el ejercicio físico y/o el estrés inducen taquicardias ventriculares bidireccionales y/o polimórficas que dan lugar a MSC incluso en ausencia de cardiopatía estructural detectable. La TVPC se hereda predominantemente de forma autosómica dominante. Los individuos con TVPC tienen arritmias ventriculares cuando se someten a ejercicio, pero no desarrollan arritmias en reposo. Los estudios han identificado mutaciones en el gen RyR2 humano, en el cromosoma 1q42-q43, en individuos con TVPC.

30 Los corazones con insuficiencia (por ejemplo, en pacientes con insuficiencia cardíaca y en modelos animales de insuficiencia cardíaca) se caracterizan por una respuesta inadaptada que incluye estimulación hiperadrenérgica crónica. En la insuficiencia cardíaca, la estimulación beta-adrenérgica crónica está asociada con la activación de receptores beta-adrenérgicos en el corazón, que, a través del acoplamiento con proteínas G, activan la adenilil ciclasa y de este modo incrementan la concentración de cAMP intracelular. El cAMP activa la PKA dependiente de cAMP, que se ha demostrado que induce la hiperfosforilación de RyR2. Por tanto, la insuficiencia cardíaca crónica es un estado hiperadrenérgico crónico que da como resultado varias consecuencias patológicas, incluyendo la hiperfosforilación por PKA de RyR2.

35 La hiperfosforilación por PKA de RyR2 se ha propuesto como un factor que contribuye a una función contráctil deprimida y a arritmogénesis en la insuficiencia cardíaca. 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 cardíaco.

40 En corazones con insuficiencia, la hiperfosforilación de RyR2 por PKA induce la disociación de FKBP12.6 (calstabilina-2) del canal de RyR2. Esto provoca cambios marcados en las propiedades biofísicas del canal de RyR2, incluyendo el incremento de la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) debido a un incremento en la sensibilidad para la activación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; la desestabilización del canal, dando como resultado estados de subconductancia; y la alteración del paso acoplado de los canales, dando como resultado un acoplamiento de EC defectuoso y disfunción cardíaca. Por tanto, el RyR2 hiperfosforilado por PKA es muy sensible a la estimulación de  $\text{Ca}^{2+}$  de bajo nivel, y esto se manifiesta como una pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  de RS diastólica a través del canal de RyR2 hiperfosforilado por PKA.

45 La respuesta inadaptada al estrés en la insuficiencia cardíaca da como resultado la reducción de FKBP12.6 del complejo macromolecular del canal. Esto da lugar a un desplazamiento hacia la izquierda en la sensibilidad de RyR2 para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , dando como resultado canales que son más activos a concentraciones

de  $Ca^{2+}$  de bajas a moderadas. Con el tiempo, el incremento en la "pérdida" a través de RyR2 da como resultado el reajuste del contenido en  $Ca^{2+}$  de RS a un nivel inferior, lo que, a su vez, reduce la ganancia del acoplamiento de EC y contribuye a la alteración de la contractilidad sistólica.

5 Adicionalmente, una subpoblación de RyR2 que se "filtra" particularmente puede liberar  $Ca^{2+}$  de RS durante la fase de reposo del ciclo cardíaco, la diástole. Esto da como resultado despolarizaciones de la membrana del cardiomiocito conocidas como despolarizaciones secundarias retardadas (DAD), que se sabe que desencadenan arritmias cardíacas ventriculares mortales.

10 En pacientes con mutaciones de TVPC en su RyR2 y corazones por lo demás estructuralmente normales, se produce un fenómeno similar. Específicamente, se sabe que el ejercicio y el estrés inducen la liberación de catecolaminas que activan los receptores beta-adrenérgicos en el corazón. La activación de los receptores beta-adrenérgicos da lugar a la hiperfosforilación por PKA de los canales de RyR2. Las pruebas también sugieren que la hiperfosforilación por PKA de RyR2 que resulta de la activación de los receptores beta-adrenérgicos hace más probable que los canales de RyR2 mutados canales se abran en la fase de relajación del ciclo cardíaco, incrementando la posibilidad de arritmias.

15 Se sabe que las arritmias cardíacas están asociadas con las pérdidas de  $Ca^{2+}$  de RS diastólicas en pacientes con mutaciones de TVPC en su RyR2 y corazones por lo demás estructuralmente normales. En estos casos, el mecanismo más común para la inducción y el mantenimiento de taquicardia ventricular es la automaticidad anormal. Una forma de automaticidad anormal, conocida por desencadenar arritmia, está asociada con la liberación anómala de  $Ca^{2+}$  de RS, lo que inicia DAD. Las DAD son despolarizaciones anormales en cardiomiocitos que se producen después de la repolarización de un potencial de acción cardíaca. La base molecular para la liberación anormal de  $Ca^{2+}$  de RS que da como resultado las DAD no se ha esclarecido completamente. Sin embargo, se sabe que las DAD se bloquean por rianodina, lo que proporciona pruebas de que RyR2 desempeña un papel clave en la patogénesis de esta liberación anómala de  $Ca^{2+}$ .

25 La patente de los Estados Unidos n.º 6.489.125 analiza el 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 o ICP-Calstan 100), una 1,4-benzotiazepina, como nuevo modulador de canales iónicos de calcio de RyR.

30 La solicitud pendiente de publicación de los EE. UU. con n.º de serie 10/763.498 analiza el RyR2 como objetivo para tratar y evitar la insuficiencia cardíaca y arritmias cardíacas, incluyendo la fibrilación auricular y arritmias cardíacas que provocan muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio (MSC). Se descubrió que los canales de RyR2 con 7 mutaciones de TVPC diferentes (por ejemplo S2246L, R2474S, N4104K, R4497C, P2328S, Q4201R, V4653F) tienen defectos funcionales que daban como resultado canales que filtran (es decir, una pérdida de calcio) cuando se estimulan durante el ejercicio. Se ha demostrado que el mecanismo para la VT en la TVPC es el mismo que el mecanismo para la VT en la insuficiencia cardíaca.

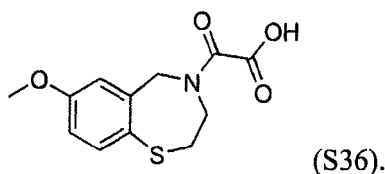
35 Se ha demostrado que las arritmias inducidas por ejercicio y la muerte súbita (en pacientes con TVPC) resultan de una reducción en la afinidad de FKBP12.6 (calstabin-2) para RyR2. Adicionalmente, se ha demostrado que el ejercicio activa el RyR2 como resultado de la fosforilación por proteína cinasa (PKA) dependiente de adenosina 3',5'-monofosfato (cAMP). Los canales de RyR2 mutantes, que tenían una función normal en bicapas lipídicas planas bajo condiciones basales, eran más sensibles a la activación por fosforilación por PKA, lo que presenta un incremento en la actividad (probabilidad de apertura) y estados de apertura prolongados, en comparación con los canales naturales. Además, los canales de RyR2 mutantes fosforilados por PKA era resistentes a la inhibición por  $Mg^{2+}$ , un inhibidor fisiológico del canal, y mostraron una reducción en la unión a FKBP12.6 (también conocida como calstabin-2, que estabiliza el canal en el estado cerrado). Estos hallazgos indican que, durante el ejercicio, cuando el RyR2 se fosforila por PKA, es más probable que los canales de TVPC mutantes se abran en la fase de relajación del ciclo cardíaco (diástole), lo que incrementa la posibilidad de arritmias desencadenadas por pérdidas de  $Ca^{2+}$  de RS.

45 Adicionalmente, la solicitud de patente pendiente de tramitación de los EE. UU. n.º 09/288.606 analiza un procedimiento para regular la contracción del corazón de un sujeto administrando un compuesto que regula la fosforilación por PKA de un RyR2 y disminuye específicamente la fosforilación por PKA. LA solicitud de patente de los EE. UU. pendiente de trámite n.º 10/608.723 también analiza un procedimiento para el tratamiento y la profilaxis para taquiarritmia auricular y arritmias inducidas por ejercicio y estrés por la administración de un agente que inhibe la fosforilación por PKA de RyR2. El documento US 2004/0229781 divulga compuestos para limitar o evitar una disminución de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto.

**Sumario de la invención**

En vista de lo anterior, existe una necesidad de identificar nuevos agentes eficaces para tratar o evitar trastornos y enfermedades asociados con los receptores RyR que regulen el funcionamiento de los canales de calcio en las células, incluyendo trastornos y enfermedades del músculo esquelético y en especial trastornos y enfermedades cardíacos. Más en particular, existe una necesidad de identificar nuevos compuestos que se puedan usar para tratar trastornos asociados a RyR, por ejemplo, reparando la pérdida en los canales de RyR, y potenciando la unión de proteínas FKBP (calstabilina-1 y calstabilina-2) a RyR fosforilado por PKA, y a RyR mutante que por lo demás tienen afinidad reducida para, o no se unen a, FKBP12 y FKBP12.6. Las realizaciones de la invención resuelven alguna de o todas estas necesidades.

En consecuencia, la presente invención proporciona una sal de un compuesto representada por la estructura:



La invención puede comprender además una composición farmacéutica que comprende una sal de un compuesto S36 y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en agentes analgésicos, antioxidantes, agentes aromáticos, tampones, aglutinantes, colorantes, disgregantes, diluyentes, emulsionantes, excipientes, cargas, agentes de mejora del aroma, gelificantes, deslizantes, conservantes, potenciadores de penetración cutánea, solubilizantes, estabilizantes, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes de tonicidad, vehículos, y agentes de incremento de la viscosidad. La composición farmacéutica puede estar en forma de una cápsula, gránulo, polvo, solución, suspensión, o comprimido y está diseñado para la administración por modo oral, sublingual, bucal, parenteral, intravenoso, transdérmico, por inhalación, intranasal, vaginal, intramuscular, o rectal.

La invención también puede proporcionar una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad asociados con un RyR que regula el funcionamiento de los canales de calcio en las células.

La invención también puede proporcionar una sal de un compuesto de S36 para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad asociados con un RyR que regula el funcionamiento de los canales de calcio en las células.

El trastorno o enfermedad se puede seleccionar del grupo que consiste en trastornos y enfermedades cardíacos, trastornos y enfermedades del músculo esquelético, trastornos y enfermedades cognitivos, hipertermia maligna, diabetes, y muerte súbita del lactante. Los trastornos y enfermedades cardíacos se pueden seleccionar del grupo que consiste en trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular; trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio; muerte súbita de origen cardíaco; muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio; insuficiencia cardíaca congestiva; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; y tensión arterial alta. Los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular y los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio se pueden seleccionar del grupo que consiste en arritmia auricular y ventricular; fibrilación auricular y ventricular; taquiarritmia auricular y ventricular; taquicardia auricular y ventricular; taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC); y variantes inducidas por ejercicio de los mismos. Los trastornos y enfermedades del músculo esquelético se pueden seleccionar del grupo que consiste en fatiga del músculo esquelético, fatiga del músculo esquelético inducida por ejercicio, miostrofia, trastornos de la vejiga, e incontinencia. Los trastornos y enfermedades cognitivos se pueden seleccionar del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, formas de pérdida de memoria, y pérdida de memoria dependiente de la edad.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican varias realizaciones de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración.

**Breve descripción de las figuras**

En la figura 1, las realizaciones A, B, C y D son, respectivamente, (A) inmunotransferencias de RyR2 fosforilado por PKA en presencia de FKBP12.6 y concentraciones de JVT-519 incrementadas; (B) inmunotransferencias de RyR2 fosforilado por PKA en presencia de S36 0,5 nM; (C) un gráfico de corriente a través de membrana plasmática, canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo L dependientes de voltaje que están completamente bloqueados por nifedipino pero no por S36 en cardiomiocitos de ratón aislados; y (D) un gráfico de la dependencia con el voltaje de corriente de Ca<sup>2+</sup> de tipo L en canales en presencia de JTV-519 y S36.

La figura 2 demuestra la prevención de arritmias ventriculares inducidas por ejercicio por JTV-519 en ratones haploinsuficientes en calstabilina (FKBP12.6)<sup>+/-</sup>. La figura proporciona gráficos que comparan la dependencia

relacionada con la dosis de los efectos farmacológicos de JTV-519 y S36 con respecto a la muerte súbita de origen cardíaco (izquierda), TV mantenidas (medio) y TV no mantenidas (derecha).

La figura 3 es un gráfico que muestra el acortamiento fraccional (AF) del ventrículo izquierdo evaluado por ecocardiografía de modo M 2 semanas post-infarto de miocardio en ratones tratados.

- 5 La figura 4 es un gráfico que muestra las proporciones de peso de corazón con respecto a peso corporal (HW/BW) y las cuantificaciones de bucles presión-volumen (dP/dt) una semana post-infarto de miocardio de ratones tratados con placebo y S36. El tratamiento con S36 da como resultado una reducción beneficiosa de la proporción HW/BW y un incremento en la velocidad de desarrollo de presión en S36 en comparación con ratones tratados con placebo.

La figura 5 es un gráfico que compara valores de  $CE_{50}$  de JTV-519 y S36.

- 10 En la figura 6, las realizaciones A, B, y C son, respectivamente, (A) trazos de corriente de un solo canal de RyR2-P2328S y RyR2-WT; (B) trazos de corriente de un solo canal de RyR2-P2328S; y (C) análisis de inmunotransferencia de la unión a calstabin-2 de RyR2-P2328S.

- 15 En la figura 7, las realizaciones A, B, C, y D demuestran que la fosforilación por PKA de Ser- 2843 incrementa la probabilidad de apertura y la cinética de paso de los canales de RyR1. La realización A proporciona trazos de corriente de un solo canal y el histograma correspondiente del RyR1 natural. La realización B proporciona trazos de corriente de un solo canal y el histograma correspondiente de RyR1 natural que está fosforilado por PKA. La realización C proporciona trazos de corriente de un solo canal y el histograma correspondiente de RyR1-Ser-2843A. La realización D proporciona trazos de corriente de un solo canal y el histograma correspondiente de RyR1-Ser-2843D.

- 20 En la figura 8, las realizaciones A y B demuestran la hiperfosforilación por PKA y la deficiencia de calstabin-1 de los canales RyR1 después de ejercicio mantenido. La realización A son inmunotransferencias de RyR1, RyR1-pSer<sup>2844</sup>, RyR1-pSer<sup>2849</sup>, y calstabin-1 para ratones control y que nadan después de un régimen de ejercicio. La realización B es un gráfico de barras que resume las cantidades relativas de los compuestos indicados después del régimen de ejercicio.

- 25 En la figura 9, las realizaciones A y B demuestran que la fosforilación por PKA de RyR1 se incrementa después de la exposición a duraciones incrementadas de ejercicio mantenido. La realización A proporciona inmunotransferencias de RyR1 y RyR1 - pSer<sup>2844</sup> después de duraciones incrementadas de ejercicio mantenido. La realización B es un gráfico que muestra la fosforilación por PKA relativa de RyR1 para duraciones variables de ejercicio.

- 30 En la figura 10, las realizaciones A, B, y C demuestran que la fosforilación por PKA de RyR1 se incrementa con la fatiga muscular. Las realizaciones A y B son, respectivamente, trazados del tiempo de fatiga y un gráfico de barras que muestra tiempos de fatiga medios para el músculo sóleo de rata de sujetos con insuficiencia cardíaca y control. La realización C es un gráfico de fosforilación por PKA frente al tiempo de fatiga.

- 35 La figura 11 son tinciones tricrómica y con hematoxilina-eosina de secciones transversales del músculo extensor largo de los dedos (*M. extensor digitorum longus*) de ratón y demuestran una degeneración de miofibras consistente con la remodelación distrófica después de ejercicio mantenido.

La figura 12 muestra un trazo de corriente de hERG de muestra antes (control) y después de la aplicación de ARM036 a 100  $\mu$ M. También se muestra el protocolo de pulso de voltaje usado para provocar corrientes de hERG.

La figura 13 muestra un transcurso de tiempo típico del efecto de ARM036 sobre la amplitud de corriente de hERG. La aplicación de ARM036 10  $\mu$ M se indica por la barra horizontal.

- 40 La figura 14 es un gráfico de concentración-respuesta que muestra el porcentaje de inhibición de corriente de hERG después de la aplicación de ARM036 a varias concentraciones.

La figura 15 es un gráfico de concentración-respuesta que muestra el porcentaje de inhibición de corriente de hERG después de la aplicación de ARM036-Na a varias concentraciones.

#### Descripción detallada de la invención

- 45 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido establezca claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente" incluye una pluralidad de dichos agentes y equivalentes de los mismos conocidos por lo expertos en la técnica, y la referencia a "el polipéptido FKBP12.6" es una referencia a uno o más polipéptidos FKBP12.6 (también denominado calstabin-2) y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc.
- 50

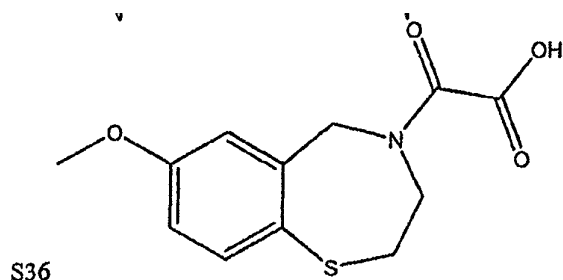
Las siguientes son definiciones de términos usados en la presente memoria descriptiva. La definición inicial proporcionada para un grupo o término en el presente documento se aplica a ese grupo o término en toda la presente memoria descriptiva de forma individual o como parte de otro grupo, a menos que se indique de otro modo.

El compuesto de la invención se denomina usando un sistema de nomenclatura numérico. Este compuesto numerado se denomina usando el prefijo "S" o bien el prefijo "ARM". Por tanto, el compuesto se denomina "S36" o bien "ARM036". Los sistemas de nomenclatura "S" y "ARM" se usan de manera intercambiable en toda la memoria descriptiva, los dibujos y las reivindicaciones.

- 5 El compuesto de la presente invención se aísla y se purifica, posteriormente a su preparación, para obtener una composición que contenga una cantidad en peso igual a o mayor de un 99 % del compuesto (compuesto "sustancialmente puro"), que a continuación se usa o se formula como se describe en el presente documento. Este compuesto "sustancialmente puro" de la presente invención se contempla también en el presente documento como parte de la presente invención.
- 10 La presente invención proporciona una sal de un compuesto S36 que puede tratar y evitar trastornos y enfermedades asociados con los RyR que regulan el funcionamiento de los canales de calcio en las células. Más en particular, la presente invención proporciona una sal de un compuesto S36 que puede tratar o evitar una pérdida en los canales de RyR. "Trastornos y enfermedades asociados con los RyR" quiere decir trastornos y enfermedades que se pueden tratar y/o evitar modulando los receptores de rianodina que regulan el funcionamiento de los canales de calcio en las células. "Trastornos y enfermedades asociados con los RyR" incluyen, sin limitación, trastornos y enfermedades cardíacos, trastornos y enfermedades del músculo esquelético, trastornos y enfermedades cognitivos, hipertermia maligna, diabetes, y muerte súbita del lactante. Los trastornos y enfermedades del músculo esquelético incluyen, pero no se limitan a, fatiga del músculo esquelético, fatiga del músculo esquelético inducida por ejercicio, miodistrofia, trastornos de la vejiga, e incontinencia. Los trastornos y enfermedades cognitivos incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, formas de pérdida de memoria, y pérdida de memoria dependiente de la edad.
- 20

### Compuestos

La presente invención proporciona una sal de un compuesto representado por la estructura:



### Rutas de actividad

- 25 El compuesto de la invención reduce la probabilidad de apertura de RyR incrementando la afinidad de FKBP12 (calstabilina-1) y FKBP12.6 (calstabilina-2) para, respectivamente RyR1 fosforilado por PKA y RyR2 fosforilado por PKA. Además, el compuesto de la invención normaliza el paso de los canales de RyR mutantes, incluyendo canales de RyR2 mutantes asociados a TVPC, incrementando la afinidad de unión a FKBP12 (calstabilina-1) y FKBP12.6 (calstabilina-2). Por lo tanto, el compuesto de la invención evita trastornos y afecciones que implican la modulación de los RyR, en particular los RyR1 y RyR2. Ejemplos de dichos trastornos y afecciones incluyen, sin limitación, trastornos y enfermedades cardíacos, trastornos y enfermedades del músculo esquelético, trastornos y enfermedades cognitivos, hipertermia maligna, diabetes, y muerte súbita del lactante. Los trastornos y enfermedades del músculo esquelético incluyen, pero no se limitan a, fatiga del músculo esquelético, fatiga del músculo esquelético inducida por ejercicio, miodistrofia, trastornos de la vejiga, e incontinencia. Los trastornos y enfermedades cognitivos incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, formas de pérdida de memoria, y pérdida de memoria dependiente de la edad. El compuesto de la invención trata estos trastornos y afecciones incrementando la afinidad de unión a FKBP12 (calstabilina-1)-RyR1 e incrementando la afinidad de unión a FKBP12.6 (calstabilina-2)-RyR2.
- 30
- 35

- La sal del compuesto S36 se puede usar en un procedimiento para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP (calstabilina) unida a RyR en las células de un sujeto. Como se usa en el presente documento, "RyR" incluye RyR1, RyR2 y RyR3. Adicionalmente, FKBP incluye tanto FKBP 12 (calstabilina-1) como FKBP12.6 (calstabilina-2). Por lo tanto, "FKBP unida a RyR" se refiere a FKBP 12 unida a RyR1 (calstabilina-1), FKBP 12.6 FKBP 12 unida a RyR2 (calstabilina-2), y FKBP 12 unida a RyR3 (calstabilina-1).
- 40

- Como se usa en el presente documento, "RyR" también incluye una "proteína RyR" y un "análogo de RyR". Un "análogo de RyR" es una variante funcional de la proteína RyR, que tiene actividad biológica de RyR, que tiene una homología de secuencia de aminoácidos de un 60 % o superior con la proteína RyR. Los RyR de la presente invención están no fosforilados, fosforilados (por ejemplo, por PKA), o hiperfosforilados (por ejemplo, por PKA). Como se usa adicionalmente en el presente documento, el término "actividad biológica de RyR" se refiere a la actividad de una proteína o péptido que demuestra una capacidad para asociarse físicamente con, o unirse a, FKBP 12 (calstabilina-1) en el caso de RyR1 y RyR3, y FKBP12.6 (calstabilina-2) en el caso de RyR2 (es decir, la unión de
- 45

aproximadamente dos veces o, aproximadamente cinco veces, sobre la unión de base de un control negativo), bajo las condiciones de los ensayos descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "FKBP" incluye tanto una "proteína FKBP" como un "análogo de FKBP", tanto si es FKBP 12 (calstabilina-1) o FKBP 12.6 (calstabilina-2). A menos que se indique en el presente documento de otro modo, "proteína" debe incluir una proteína, dominio de proteína, polipéptido o péptido, y cualquier fragmento de los mismos. Un "análogo de FKBP" es una variante funcional de la proteína FKBP, que tiene actividad biológica de FKBP, que tiene una homología de secuencia de aminoácidos de un 60 % o superior con la proteína FKBP, tanto si es FKBP 12 (calstabilina-1) o FKBP12.6 (calstabilina-2). Como se usa adicionalmente en el presente documento, el término "actividad biológica de FKBP" se refiere a la actividad de una proteína o péptido que demuestra una capacidad para asociarse físicamente con, o unirse a, RyR2 no fosforilado o no hiperfosforilado (es decir, la unión de aproximadamente dos veces, o aproximadamente cinco veces, sobre la unión de base de un control negativo), bajo las condiciones de los ensayos descritos en el presente documento.

FKBP se une al canal de RyR, una molécula por subunidad de RyR. En consecuencia, como se usa en el presente documento, el término "FKBP unida a RyR" incluye una molécula de una proteína FKBP 12 (calstabilina-1) que está unida a una subunidad de proteína RyR1 o un tetrámero de FKBP 12 que está asociado con un tetrámero de RyR1, una molécula de proteína FKBP12.6 (calstabilina-2) que está unida a una subunidad de proteína RyR2 o un tetrámero de FKBP12.6 que está asociado con un tetrámero de RyR2, y una molécula de una proteína FKBP12 (calstabilina-1) que está unida a una subunidad de proteína RyR3 o un tetrámero de FKBP 12 que está asociado con un tetrámero de RyR3. Por lo tanto, "FKBP unida a RyR" se refiere a "FKBP 12 unida a RyR1", "FKBP12.6 unida a RyR2" y "FKBP12 unida a RyR3".

Una "disminución" o "trastorno" en el nivel de FKBP unida a RyR en las células de un sujeto se refiere a una disminución, bajada o reducción en el nivel de FKBP unida a RyR en las células del sujeto. Una disminución de este tipo se limita o se evita en las células de un sujeto cuando la disminución está de cualquier modo detenida, obstaculizada, impedida, obstruida o reducida por la administración de los compuestos de la invención, de modo que el nivel de FKBP unida a RyR en las células del sujeto sea mayor de lo que sería de otro modo en ausencia del compuesto administrado.

El nivel de FKBP unida a RyR en un sujeto se detecta por ensayos y técnicas estándar, incluyendo los determinados fácilmente a partir de la técnica anterior (por ejemplo, técnicas inmunológicas, análisis de hibridación, inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western, técnicas de imagen de fluorescencia y/o detección de radiación, etc.), así como cualquier ensayo y procedimiento de detección divulgado en el presente documento. Por ejemplo, la proteína se aísla y se purifica de las células de un sujeto usando procedimientos estándar conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, la extracción de las células (por ejemplo, con un detergente que solubilice la proteína) cuando sea necesario, seguido de 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 se siguen por electroforesis (por ejemplo, sobre SDS-gel de poli(acrilamida)). Una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en un sujeto, o la limitación o prevención del mismo, se determina comparando la cantidad de FKBP unida a RyR detectada antes de la administración de JTV-519 o un compuesto de fórmula I, I-a, I-b, I-c, I-d, I-e, I-f, I-g, I-h, I-i, I-j, I-k, I-l o I-m, (de acuerdo con procedimientos descritos a continuación) con la cantidad detectada un tiempo adecuado después de la administración del compuesto.

Una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en las células de un sujeto se limita o evita, por ejemplo, inhibiendo la disociación de FKBP y RyR en las células del sujeto; incrementando la unión entre FKBP y RyR en las células del sujeto; o estabilizando el complejo RyR-FKBP en las células de un sujeto. Como se usa en el presente documento, el término "inhibir la disociación" incluye bloquear, disminuir, inhibir, limitar o evitar la disociación o separación física de una subunidad de FKBP de una molécula de RyR en las células del sujeto, y bloquear, disminuir, inhibir, limitar o evitar la disociación o separación física de una molécula de RyR de una subunidad de FKBP en las células del sujeto. Como se usa adicionalmente en el presente documento, el término "incrementar la unión" incluye potenciar, incrementar, o mejorar la capacidad del RyR fosforilado para asociarse físicamente con FKBP (por ejemplo, la unión de aproximadamente dos veces o, aproximadamente cinco veces, sobre la unión de base de un control negativo) en las células del sujeto y potenciar, incrementar o mejorar la capacidad de FKBP para asociarse físicamente con RyR fosforilado (por ejemplo, la unión de aproximadamente dos veces, o, aproximadamente cinco veces, sobre la unión de base de un control negativo) en las células del sujeto. Adicionalmente, una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en las células de un sujeto se limita o se evita disminuyendo directamente el nivel de RyR fosforilado en las células del sujeto o disminuyendo indirectamente el nivel de RyR fosforilado en las células (por ejemplo, dirigiendo una enzima (tal como PKA) u otra molécula endógena que regula o modula las funciones o niveles de RyR fosforilado en las células). En una realización, el nivel de RyR fosforilado en las células disminuye al menos en un 10 % en el procedimiento de la presente invención. En otra realización, el nivel de RyR fosforilado disminuye al menos en un 20 %.

El sujeto que se puede tratar en la presente invención son sistemas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo, sin limitación, células o tejidos aislados o cultivados, sistemas de ensayo *in vitro* no celulares y un animal (por ejemplo, un anfibio,



un ave, un pez, un mamífero, un marsupial, un ser humano, un animal doméstico (tal como un gato, perro, mono, ratón o rata) o un animal comercial (tal como una vaca o un cerdo)).

Las células de un sujeto incluyen células del músculo estriado. Un músculo estriado es un músculo en el que las unidades de repetición (sarcómeros) de las miofibrillas contráctiles están dispuestas en registro en toda la célula, dando como resultado estriaciones transversales u oblicuas que se observan al nivel de un microscopio óptico. Los ejemplos de células del músculo estriado incluyen, sin limitación, células del músculo de movimiento voluntario (esquelético) y células miocárdicas. En una realización, la célula usada en el procedimiento de la presente invención es una célula miocárdica humana. Como se usa en el presente documento, el término "célula miocárdica" incluye fibras miocárdicas, tales como las encontradas en el miocardio del corazón. Las fibras miocárdicas están compuestas de cadenas de células miocárdicas o cardiomiocitos, unidas extremo a extremo a discos intercalados. Estos discos poseen dos tipos de uniones celulares: desmosomas expandidos que se extienden a lo largo de sus partes transversales, y uniones comunicantes, de las que las más grandes están a lo largo de sus partes longitudinales.

Una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR se limita o se evita en las células de un sujeto administrando los compuestos de la invención al sujeto; esto también permitiría el contacto entre células del sujeto y los compuestos de la invención. Los compuestos de la invención son moduladores de los canales de iones de calcio. Además de regular los niveles de  $Ca^{2+}$  en células miocárdicas, los compuestos de la invención modulan la corriente de  $Na^+$  y la corriente de  $K^+$  rectificadora hacia dentro en las células, tales como células ventriculares de cobaya, e inhiben la corriente  $K^+$  rectificadora hacia dentro en las células, tales como células auriculares de cobaya.

## Composición farmacéutica

El compuesto de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos humanos en una forma biológicamente compatible adecuada para su administración *in vivo*. De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una sal del compuesto S36, en mezcla con un diluyente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no perjudicial para el receptor del mismo. El vehículo farmacéuticamente aceptable empleado en el presente documento se selecciona de varios materiales orgánicos o inorgánicos que se usan como materiales para formulaciones farmacéuticas y que se incorporan como agentes analgésicos, tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, emulsionantes, excipientes, cargas, deslizantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes de tonicidad, vehículos y agentes de incremento de la viscosidad. Si se necesario, también se añaden aditivos farmacéuticos, tales como antioxidantes, agentes aromáticos, colorantes, agentes de mejora del aroma, conservantes, y edulcorantes. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos aceptables incluyen carboximetilcelulosa, celulosa cristalina, glicerina, goma arábiga, lactosa, estearato de magnesio, metilcelulosa, polvos, solución salina, alginato de sodio, sacarosa, almidón, talco y agua, entre otros.

Las formulaciones farmacéuticas se preparan por procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, la sal del compuesto S36 se mezcla con un vehículo y/o diluyente, como una suspensión o solución. Opcionalmente, también se añaden uno o más ingredientes auxiliares (por ejemplo, tampones, agentes aromatizantes, tensioactivos, y similares). La elección del vehículo se determina por la solubilidad y la naturaleza química de los compuestos, la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar.

La sal del compuesto S36 se administra a un sujeto poniendo en contacto las células objetivo (por ejemplo, células miocárdicas) *in vivo* en el sujeto con el compuesto. El compuesto está en contacto con (por ejemplo, se introducen en) células del sujeto usando técnicas conocidas utilizadas para la introducción y administración de proteínas, ácidos nucleicos y otros fármacos. Los ejemplos de procedimientos para poner en contacto las células con (es decir, tratar las células con) el compuesto de la invención incluyen, sin limitación, absorción, electroporación, inmersión, inyección, introducción, administración de liposomas, transfección, transfusión, vectores y otros vehículos y procedimientos de administración de fármacos. Cuando las células objetivo están localizadas en una parte particular de un sujeto, es deseable introducir el compuesto de la invención directamente a las células, por inyección o por algún otro medio (por ejemplo, introduciendo el compuesto en la sangre u otro fluido corporal). Las células objetivo están contenidas en el tejido de un sujeto y se detectan por procedimientos de detección estándar determinados fácilmente en la técnica conocida, de los que los ejemplos incluyen, sin limitación, técnicas inmunológicas (por ejemplo, tinción inmunohistoquímica), técnicas de imagen de fluorescencia, y técnicas microscópicas.

Adicionalmente, el compuesto de la presente invención se administra a un sujeto humano o animal por procedimientos conocidos incluyendo, sin limitación, administración oral, administración sublingual o bucal, administración parenteral, administración transdérmica, por vía de inhalación o por vía intranasal, vaginal, rectal e intramuscular. El compuesto de la invención se administra por vía parenteral, por inyección epifascial, intracapsular, intracraneal, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravasculosa, intravenosa, parenquimatosa, subcutánea o sublingual, o por medio de catéter. En una realización, el agente se administra al sujeto por medio de la administración en los músculos del sujeto incluyendo pero sin limitarse a, los músculos cardíacos del sujeto. En una realización, el agente se administra al sujeto por medio de la administración dirigida a células miocárdicas por medio de un catéter insertado en el corazón del sujeto.

Para la administración oral, una formulación del compuesto de la invención se puede presentar como cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, o como una suspensión o solución. La formulación tiene aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata. La formulación también se presenta con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábica, almidón de maíz o gelatinas. Adicionalmente, la formulación se presenta con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio. La formulación también se presenta con fosfato de calcio dibásico anhidro o glicolato sódico de almidón. Finalmente, la formulación se presenta con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio.

Para la administración parenteral (es decir, administración por inyección por medio de una vía distinta al canal alimentario), el compuesto de la invención se combina con una solución acuosa estéril que es isotónica con la sangre del sujeto. Una formulación de este tipo se prepara disolviendo un ingrediente 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 condiciones fisiológicas, para producir una solución acuosa, proporcionando después dicha solución estéril. La formulación se presenta en recipientes de dosis unitaria o múltiple, tales como ampollas o viales cerrados. La formulación se administra por cualquier modo de inyección, incluyendo, sin limitación, epifascial, intracapsular, intracraneal, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosa, subcutánea, o sublingual o por medio de catéter en el corazón del sujeto.

Para administración transdérmica, el compuesto de la invención se combina con potenciadores de penetración cutánea, tales como propilenglicol, polietilenglicol, isopropanol, etanol, ácido oleico, N-metilpirrolidona y similares, que incrementan la permeabilidad de la piel a los compuestos de la invención y permite que los compuestos penetren a través de la piel y en la circulación sanguínea. Las composiciones de compuesto/potenciador también se pueden combinar además con una sustancia polimérica, tal como etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etileno/acetato de vinilo, polivinilpirrolidona, y similares, para proporcionar la composición en forma de gel, que se disuelven en un disolvente, tal como cloruro de metileno, evaporado hasta la viscosidad deseada y aplicado a continuación al material de soporte para proporcionar un parche.

En algunas realizaciones, la composición está en forma de dosis unitaria tal como un comprimido, cápsula o vial de dosis individual. Las dosis unitarias adecuadas, es decir cantidades terapéuticamente eficaces, se pueden determinar durante ensayos clínicos diseñados apropiadamente para cada una de las condiciones para las que está indicada la administración de un compuesto elegido y, por supuesto, variarán dependiendo del punto final clínico deseado. La presente solicitud también describe artículos de fabricación para tratar y evitar trastornos, tales como trastornos cardíacos, en un sujeto. Los artículos de fabricación comprenden una composición farmacéutica de una sal de S36. Los artículos de fabricación están envasados con indicaciones para varios trastornos que las composiciones farmacéuticas pueden tratar y/o evitar. Por ejemplo, los artículos de fabricación comprenden una dosis unitaria de un compuesto divulgado en el presente documento que puede tratar o evitar un trastorno muscular, y una indicación de que la dosis unitaria puede tratar o evitar un determinado trastorno.

De acuerdo con un procedimiento de la presente invención, la sal del compuesto S36 se administra al sujeto (o están en contacto con células del sujeto) en una cantidad eficaz para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en el sujeto, en particular en las células del sujeto. Esta cantidad se determina fácilmente por el experto en la técnica, basándose en procedimientos conocidos, incluyendo análisis de curvas de valoración establecidas *in vivo* y procedimientos y ensayos divulgados en el presente documento. En una realización, una cantidad adecuada del compuesto de la invención eficaz para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en el sujeto varía desde aproximadamente 0,01 mg/kg/día hasta aproximadamente 20 mg/kg/día, y/o es una cantidad suficiente para lograr niveles plasmáticos que varían desde aproximadamente 300 ng/ml hasta aproximadamente 1000 ng/ml. En una realización, la cantidad del compuesto de la invención varía desde aproximadamente 10 mg/kg/día hasta aproximadamente 20 mg/kg/día. En otra realización, se administra desde aproximadamente 0,01 mg/kg/día hasta aproximadamente 10 mg/kg/día. En otra realización, se administra desde aproximadamente 0,01 mg/kg/día hasta aproximadamente 5 mg/kg/día. En otra realización, se administra desde aproximadamente 0,05 mg/kg/día hasta aproximadamente 5 mg/kg/día. En otra realización, preferente, se administra desde aproximadamente 0,05 mg/kg/día hasta aproximadamente 1 mg/kg/día.

## Usos

La presente invención proporciona un compuesto para tratamientos terapéuticos para pacientes con varios trastornos que implican modulación de los RyR, en particular trastornos del músculo esquelético (RyR1) y trastornos cognitivos (RyR3).

En una realización de la presente invención, el sujeto aún no ha desarrollado un trastorno. En otra realización de la presente invención, el sujeto necesita tratamiento para un trastorno.

Varios trastornos que los compuestos de la invención tratan o evitan son trastornos y enfermedades del músculo esquelético, trastornos y enfermedades cognitivos, hipertermia maligna, diabetes, y muerte súbita del lactante. Los trastornos y enfermedades del músculo esquelético incluyen, pero no se limitan a, fatiga del músculo esquelético,

5 fatiga del músculo esquelético inducida por ejercicio, miodistrofia, trastornos de la vejiga, e incontinencia. Los trastornos y enfermedades cognitivos incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, formas de pérdida de memoria, y pérdida de memoria dependiente de la edad. Un experto en la técnica reconocerá otras enfermedades, incluyendo pero sin limitarse a, trastornos musculares y cardíacos, para las que los compuestos de la invención pueden ser útiles para tratarlas, de acuerdo con la información proporcionada en el presente documento.

10 Debido a su capacidad para estabilizar la FKBP unida a RyR y mantener y restablecer el equilibrio en el contexto de la fosforilación por PKA dinámica y desfosforilación de RyR, el compuesto de la invención también es útil en el tratamiento de un sujeto que ya ha experimentado síntomas clínicos de varios de estos trastornos. Por ejemplo, si los síntomas del trastorno se observan en el sujeto con suficiente antelación, la sal del compuesto S36 es eficaz para limitar o evitar una disminución adicional en el nivel de FKBP unida a RyR en el sujeto.

Adicionalmente, el compuesto evita trastornos de ritmo cardíaco irregular en sujetos con defectos de heterocigotos en el gen FKBP 12.6.

15 La presente invención también proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en un sujeto que es candidato para un trastorno. La presente invención también proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento para tratar o evitar un trastorno muscular en un sujeto. Además, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento para tratar o evitar trastornos musculares inducidos por ejercicio en un sujeto.

20 Los RyR, incluyendo RyR1, RyR2 y RyR3, han estado implicados en varios acontecimientos biológicos en las células. Por ejemplo, se ha demostrado que los canales de RyR2 desempeñan un papel importante en el acoplamiento de EC y la contractilidad en células miocárdicas. Por lo tanto, está claro que los fármacos preventivos diseñados para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en las células, en particular FKBP12.6 unida a RyR2 en células miocárdicas, son útiles en la regulación de varios acontecimientos biológicos asociados con RyR, incluyendo acoplamiento de EC y contractilidad.

#### Procedimientos de síntesis

25 La presente invención, proporciona, en otro aspecto, procedimientos para la preparación de una sal de un compuesto S36.

30 Algunas de las siguientes síntesis utilizan disolventes. En una realización, el disolvente es un disolvente orgánico. En otra realización, el disolvente orgánico es cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), cloroformo ( $\text{CCl}_4$ ), formaldehído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) o metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Algunas de las siguientes síntesis también utilizan un catalizador básico. En una realización, el catalizador básico es un compuesto de amina. En otra realización, el catalizador básico es una alquilamina tal como trietilamina (TEA). En otra realización más, el catalizador básico es piridina. Algunas de las siguientes síntesis también utilizan soluciones básicas. En una realización, la solución básica es bicarbonato de sodio o carbonato de calcio. En otra realización, la solución básica es bicarbonato de sodio saturado o carbonato de calcio saturado. Algunas de las siguientes síntesis también utilizan soluciones ácidas. En una realización, la solución ácida es una solución de ácido sulfúrico, una solución de ácido clorhídrico o una solución de ácido nítrico. En una realización, la solución es HCl 1 N. Un experto en la técnica apreciará que se usen otros disolventes más, disolventes orgánicos, catalizadores básicos, soluciones básicas y soluciones ácidas en las realizaciones, de acuerdo con la descripción en el presente documento. Los disolventes, disolventes orgánicos, reactivos, catalizadores, soluciones de lavado, etc. se añaden a temperaturas apropiadas (por ejemplo temperatura ambiente o aproximadamente 20 °C-25 °C, 0 °C, etc.).

Las siguientes síntesis usan S26 como material de partida. Los procedimientos para sintetizar S26 se describen en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 10/680.988.

45 Algunas de las siguientes síntesis requieren la purificación de la mezcla de reacción para proporcionar un producto final. La purificación de la mezcla de reacción implica uno o más procedimientos tales como la retirada de cualquier disolvente, cristalización del producto, separación cromatográfica del producto (incluyendo HPLC, cromatografía en gel de sílice, cromatografía en columna, etc), lavado con solución básica, lavado con solución ácida, redisolución del producto en otro disolvente, etc. Un experto en la técnica apreciará que se usen otros procedimientos en las realizaciones, de acuerdo con la descripción en el presente documento.

50 Las reacciones se llevan a cabo el tiempo necesario (por ejemplo, una hora, varias horas, durante una noche, 24 horas, etc.) para obtener los rendimientos deseados u óptimos de los compuestos deseados. A menudo, las mezclas de reacción se agitan. Las reacciones se llevan a cabo a temperaturas apropiadas (por ejemplo temperatura ambiente o aproximadamente 20 °C-25 °C, 0 °C, 100 °C, etc.).

Synthon S26 se prepara de acuerdo con procedimientos descritos en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 10/680.988.

55 S57 se prepara a partir de S26 y cloroacetato de metilo. En una realización, la reacción se produce en presencia de un disolvente, tal como un disolvente orgánico, tal como cloruro de metileno. Un catalizador básico, tal como

piridina, se usa si fuera necesario para facilitar o apurar la reacción. La mezcla de reacción formada mezclando los reactivos se lava con solución básica (por ejemplo, bicarbonato de sodio saturado), solución acidificada (por ejemplo, HCl) y agua. La purificación, tal como con cromatografía en gel de sílice proporciona S57.

5 S36 se prepara a partir de S57 por reacción con hidróxido de sodio. En una realización, la reacción tiene lugar en un disolvente, tal como un disolvente orgánico, tal como metanol. El disolvente se retira de la mezcla de reacción formada mezclando los reactivos y el disolvente, formando de este modo un residuo. El residuo se disuelve en agua y se lava con otro disolvente orgánico, tal como éter, para retirar los compuestos hidrófobos no deseados. La fase acuosa de los lavados básicos se acidifica y el producto se extrae de esto usando un disolvente orgánico, tal como cloruro de metileno. Se usa purificación adicional si fuera necesario.

10 La sal de un compuesto S36 de la presente invención se puede preparar en formas diferentes y la invención incluye todas las formas variantes de los compuestos.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de una sal de S36 con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

15 El término "sal farmacéuticamente aceptable" quiere decir una sal de adición de ácido que es adecuada para o compatible con el tratamiento de un paciente o un sujeto tal como un paciente humano o un animal tal como un perro.

20 El término "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento quiere decir cualquier sal orgánica o inorgánica no tóxica de S36. Los ácidos inorgánicos ilustrativos que forman sales de adición de ácido adecuadas incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, así como sales metálicas tales como monohidrógenoortofosfato de sodio e hidrógenosulfato de potasio. Los ácidos orgánicos ilustrativos que forman sales de adición de ácido adecuadas incluyen ácidos mono-, di-, y tricarbónicos tales como ácidos glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, benzoico, fenilacético, cinámico y salicílico, así como ácidos sulfónicos tales como ácidos p-toluensulfónico y metanosulfónico.

25 Se pueden formar sales mono o bien di-ácidas, y dichas sales existen en forma hidratada, solvatada o bien sustancialmente anhidra. En general, las sales de adición de ácido de los compuestos son más solubles en agua y en varios disolventes orgánicos hidrófilos, y en general, demuestran puntos de fusión más altos en comparación con sus formas de base libre. La selección de una sal apropiada será conocida para un experto en la técnica. Otras sales farmacéuticamente no aceptables, por ejemplo, oxalatos, se usan, por ejemplo, en el aislamiento del compuesto de

30 la invención para uso de laboratorio o para la conversión posterior a una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

El compuesto de la presente invención forma hidratos o solvatos, que están incluidos en el alcance de las reivindicaciones.

35 El término "solvato" como se usa en el presente documento quiere decir una sal del compuesto S36, en la que las moléculas de un disolvente adecuado se incorporan en la red cristalina. Un disolvente adecuado es fisiológicamente tolerable en la dosificación administrada. Los ejemplos de disolventes adecuados son etanol, agua y similares. Cuando el agua es el disolvente, la molécula se denomina "hidrato".

40 El término una "cantidad eficaz", "cantidad suficiente" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente como se usa en el presente documento es esa cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en el que se esté aplicando. La respuesta es preventiva y/o terapéutica. El término "cantidad eficaz" también incluye esa cantidad de la sal del compuesto S36, que es "terapéuticamente eficaz" y que evita o sustancialmente atenúa efectos secundarios no deseados.

45 Como se usa en el presente documento y así como se entiende en la técnica, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución del alcance de la enfermedad, estabilización (es decir, sin empeoramiento) del estado de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado y remisión de la enfermedad (ya sea parcial o total), sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede querer decir la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se

50 recibe tratamiento.

Los términos "animal", "sujeto" y "paciente" como se usa en el presente documento incluyen todos los miembros del reino animal incluyendo pero sin limitarse a, mamíferos, animales (por ejemplo, gatos, perros, caballos, etc.) y seres humanos.

55 La presente solicitud describe además una composición, que comprende la sal radiomarcada del compuesto S36. El marcado de los compuestos se lleva a cabo usando uno de una variedad de marcadores radioactivos diferentes conocidos en la técnica. El marcador radioactivo de la presente invención es, por ejemplo, un radioisótopo. El radioisótopo es cualquier isótopo que emite radiación detectable incluyendo, sin limitación,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ . La

radioactividad emitida por el radioisótopo se puede detectar por técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la emisión gamma del radioisótopo se detecta usando técnicas de formación de imágenes gamma, en particular formación de imágenes de gammagrafía.

5 A modo de ejemplo, los compuesto radiomarcados de la invención se preparan como sigue. Un compuesto de la invención se puede desmetilar en el anillo fenilo usando  $\text{BBr}_3$ . A continuación, se vuelve a metilar el compuesto fenol resultante con un agente de metilación radiomarcado (tal como sulfato de  $^3\text{H}$ -dimetilo) en presencia de una base (tal como  $\text{NaH}$ ) para proporcionar compuestos marcados con  $^3\text{H}$ .

Esta sal del compuesto S36 de la presente invención puede estar asociada con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se describe anteriormente, para formar una composición farmacéutica.

## 10 Demostraciones de eficacia

Como se demuestra por la figura 1, realizaciones A, B, C y D, S36 es más potente al incrementar la unión de FKBP12.6 y RyR2 que JVT-519 y no bloquea el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) o el canal de  $\text{K}^+$  de hERG ( $I_{\text{Kr}}$ ). En la realización A, se genera RyR2 fosforilado por PKA como sigue: se añaden preparaciones de la membrana de RS cardíaca (5  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{g}$ ) a un total de 100  $\mu\text{l}$  de tampón cinasa ( $\text{MgCl}_2$  8 mM, EGTA 10 mM, Tris-PIPES 50 mM, pH 6,8) que contiene MgATP 100  $\mu\text{M}$  y 40 unidades de PKA, y se incuba a temperatura ambiente. Se centrifugan las muestras a 95.000 g durante 10 min y los sedimentos se lavan tres veces en 0,2 ml de tampón imidazol. Los sedimentos finales se agrupan y se resuspenden en tampón de imidazol (concentración final  $\approx$  10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Para someter a prueba la eficacia de unión a FKBP12.6 de JTV-519, se incuba RS cardíaco fosforilado por PKA (50 mg) durante 30 minutos a temperatura ambiente con los compuestos de prueba y FKBP 12.6 250 nM en tampón de imidazol 10 mM, pH 7.0. A continuación se centrifugan las muestras a 100.000 g durante 10 minutos y los sedimentos se lavan 3 veces con tampón de imidazol. Después del lavado, las proteínas se fraccionan por tamaño en PAGE al 15%. Se desarrollan inmunotransferencias usando un anticuerpo anti-FKBP (dilución 1:3.000). Se cuantifica la cantidad de unión usando densitometría de transferencia Western y se compara con la cantidad de FKBP asociado con RyR en RS no fosforilado. Se determinan las  $\text{CE}_{50}$  para los compuestos generando datos de unión a FKBP usando concentraciones de compuestos que varían de 0,5-1000 nM. En la realización B, se registran corrientes a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L en cardiomiocitos de ratón aislados usando condiciones para registros de pinzamiento zonal de membrana total con  $\text{Ba}^{2+}$  como el vehículo de carga. La solución extracelular contiene (en mM): N-metil-D-glucamina, 125;  $\text{BaCl}_2$ , 20; CsCl, 5;  $\text{MgCl}_2$ , 1; HEPES, 10; glucosa, 5; pH 7,4 (HCl). La solución intracelular contiene (in mM): CsCl, 60;  $\text{CaCl}_2$ , 1; EGTA, 11;  $\text{MgCl}_2$ , 1;  $\text{K}_2\text{ATP}$ , 5; HEPES, 10; ácido aspártico, 50; pH 7,4 (CsOH). Bajo estas condiciones, se espera que la corriente medida sea llevada principalmente por  $\text{Ba}^{2+}$  a través de canales de calcio de tipo L lo que se denomina  $I_{\text{Ca,L}}$ . Los fármacos se aplican por un cambiador de solución local y llegan a la membrana celular en 1 s. Los efectos de nifedipino y S36 se someten a prueba con etapas de fijación de voltaje de 20 ms a +10 o +20 mV (máximo de relación corriente-voltaje para cada célula individual) de potenciales de control de -80 mV o -40 mV. En la realización C, se miden y se presentan la dependencia con relación al voltaje de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L bloqueada por JVT-519 (1  $\mu\text{M}$ ) y S36 (1  $\mu\text{M}$ ).

Como se demuestra en la figura 2, S36 evita la muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio a niveles de plasma inferiores en comparación con JVT-519. Se muestra la dependencia con relación a la dosis de los efectos farmacológicos de JVT-519 y S36. Los niveles de plasma de JVT-519 1  $\mu\text{M}$  evitan arritmias cardíacas y muerte súbita de origen cardíaco en ratones FKBP12.6<sup>+/-</sup>. Los niveles de plasma de S36 1  $\mu\text{M}$  y 0,02  $\mu\text{M}$  también evitan arritmias cardíacas y muerte súbita de origen cardíaco en ratones FKBP12.6<sup>+/-</sup>.

Como se demuestra por la figura 3, Rycal evita el desarrollo de insuficiencia cardíaca aguda post-infarto de miocardio. Los ratones tratados con placebo o tratados con Rycal (concentraciones plasmáticas de 100 nM o 200 nM) se someten a ligamiento permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda dando como resultado un infarto de miocardio. Rycal mejora significativamente el acortamiento fraccional evaluado por ecocardiografía de modo M 2 semanas post-infarto de miocardio, en comparación con placebo.

Como se demuestra en la figura 4, S36 mejora la función cardíaca en insuficiencia cardíaca crónica post-infarto de miocardio. Los ratones naturales se someten a ligamiento permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda dando como resultado un infarto de miocardio. Siete días después del infarto de miocardio, los ratones se tratan con S36 (concentración plasmática de 200 nM) o placebo. Las proporciones de peso del corazón con relación al peso corporal (HW/BW) y las cuantificaciones de bucle presión-volumen (dP/dt, pendiente de la derivada máxima de cambio en la presión sistólica con el tiempo) muestran la remodelación inversa y la mejora de la contractilidad cardíaca en ratones tratados con S36 en comparación con placebo.

La figura 5 es un gráfico resumen de valores de  $\text{CE}_{50}$  de JVT-519 y del compuesto S36. El ensayo de unión de FKBP 12.6 descrito anteriormente se usa para determinar la cantidad de unión de FKBP 12.6 a RyR2 fosforilado por PKA a varias concentraciones (0,5- 1000 nM) de los compuestos mostrados. Los valores de  $\text{CE}_{50}$  están calculados usando el ajuste de curva de Michaelis-Menten.

Como se demuestra en la figura 6, realizaciones A, B, y C, S36 normaliza la función y estructura del canal de RyR2-P2328S asociado a TVPC. En la realización A se muestran trazos de corriente de un solo canal representativos de

RyR2-P2328S y RyR2-WT tratados con Rycal mostrando que no hay influencia de JVT-519 en la función del canal de referencia. Sin embargo, en RyR2-P2328S fosforilado por PKA, como se muestra en la realización B, Rycal normaliza el estado cerrado de un solo canal hasta niveles que se aproximan a los observados en la realización A, reduciendo la probabilidad de apertura de un 14,4 % a un 0,3 % después de la administración de 0,1  $\mu\text{mol/l}$  de S36. Los recuadros en las realizaciones A y B muestran aperturas de canal  $> 1$  pA a una mayor resolución. La realización C muestra un análisis de inmunotransferencia de unión a calstabilina-2 de RyR2-P2328S en presencia o ausencia de PKA y 0,1  $\mu\text{mol/l}$  de S36, como se indica. RyR2-P2328S se inmunoprecipita y se fosforila por PKA *in vitro* como se describe anteriormente.

La figura 7, realización A, B, C, y D demuestra que Ser-2843 es el único sitio de fosforilación por PKA en los canales de RyR1 esqueléticos. (A) Trazos de un solo canal representativos de RyR1 natural, (B) efecto de fosforilación por PKA exógena de RyR1 (wt RyR1-P), (C) PKA no afecta a RyR1-S2843A que contiene un sitio de fosforilación por PKA no funcional. Puesto que PKA no incrementa la actividad de RyR1-S2843A, parece que Ser-2843 constituye el único sitio de fosforilación por PKA en los canales de RyR1 en el músculo esquelético. En consecuencia, (D) RyR1-S2843D constitutivamente fosforilado imita la fosforilación por PKA exógena mostrada en (B) lo que confirma que Ser-2843 es el único sitio de fosforilación por PKA en los canales de RyR1 esqueléticos. Los registros de un solo canal de RyR1 en bicapas lipídicas planas muestran la actividad de los canales a 150 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cis}}$  (lado citosólico) con ATP 1 mM. Los registros fueron a 0 mV, el estado cerrado de los canales como se indica por 'c', y las aperturas de los canales son deflexiones hacia arriba. Todos los histogramas de amplitud puntuales se muestran a la derecha. La probabilidad de apertura ( $P_o$ ) y los tiempos de permanencia cerrado ( $T_c$ ) y abierto ( $T_o$ ) medios se indican sobre cada trazado de canal.

La figura 8, realizaciones A y B, demuestra la reducción en la estabilización de calstabilina-1 y la hiperfosforilación por PKA de los canales de RyR1 a partir del ejercicio mantenido. El ejercicio aeróbico se puede definir como una forma de ejercicio físico que incrementa la frecuencia cardíaca y potencia la captación de oxígeno para mejorar el rendimiento. Son ejemplos de ejercicio aeróbico correr, montar bicicleta y nadar. Durante el estudio de la figura 8, se sometió a los ratones a ejercicio aeróbico (se les obliga a nadar) durante 90 min dos veces al día. Se acostumbró a los animales a nadar en sesiones de entrenamiento: día -3 dos veces 30 min, día -2 dos veces 45 min, día -1 dos veces 60 min, día 0 y siguientes dos veces 90 min. Después, los ratones se sometieron a ejercicio durante 1, 7 o 21 días consecutivos adicionales durante 90 min dos veces al día. Entre las sesiones de natación separadas por un periodo de descanso de 4 horas, se mantuvo a los ratones calientes y se les dio alimento y agua. Se usó una piscina con agua corriente ajustable para someter a los ratones a ejercicio por natación. Se usó una piscina acrílica (90 cm de largo x 45 cm de ancho x 45 cm de profundidad) llenada con agua hasta una profundidad de 25 cm. Se generó una corriente en la piscina con una bomba. La velocidad de la corriente durante la sesión de natación fue a una velocidad constante de 1 l/min de caudal. Se mantuvo la temperatura del agua a 34 °C con un calentador eléctrico. Se usaron ratones con mismo peso y edad para excluir las diferencias en la flotabilidad por la grasa corporal.

Usando la natación forzada como protocolo eficaz para incrementar la capacidad aeróbica del músculo esquelético en ratones, se han investigado la composición y el estado de fosforilación del complejo del canal RyR1 esquelético. Inesperadamente, después de 3 semanas nadando 90 min dos veces al día, los ratones naturales C57B16 mostraron un incremento significativo de fosforilación por PKA de RyR1 mientras que la fosforilación de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina cinasa II (CaMKII) no cambió lo que indica que la especificidad de la expresión de la proteína RyR1 de ruta de estrés era estable, sin embargo, se redujeron los canales de RyR1 de la subunidad de estabilización calstabilina-1 (FKBP12). Se ha demostrado que la hiperfosforilación de RyR1 y la reducción de calstabilina-1 son consistentes con el filtrado en los canales de RyR1 que provocan una pérdida intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de RS.

Después de 3 semanas nadando 90 min dos veces al día, los canales de RyR1 están hiperfosforilados por PKA y con reducción de la subunidad de calstabilina-1 de estabilización. Como se observa en la realización A, el complejo del canal macromolecular de RyR1 inmunoprecipitado muestra un incremento de fosforilación por PKA en Ser-2844 (correspondiente a RyR1-Ser-2843 humana) mientras que la fosforilación de CaMKII en Ser-2849 (correspondiente a RyR1-Ser-2848 humana) no cambia. Concomitante con el incremento de la hiperfosforilación por PKA de RyR1-Ser-2844, se reduce la calstabilina-1 del complejo del canal. Como se observa en la realización B, la normalización de la fosforilación y del contenido en calstabilina-1 para cuatro subunidades del complejo del canal tetrámero muestra un incremento en la fosforilación por PKA y reducción de la subunidad de calstabilina-1 de estabilización. Ratones de control, no sometidos a ejercicio; ratones que nadan, sometidos a ejercicio 90 min dos veces al día durante 3 semanas (datos preliminares).  $P < 0,05$ .

En la figura 9, las realizaciones A y B demuestran que la fosforilación por PKA se incrementa para duraciones incrementadas de ejercicio mantenido. Para investigar la influencia de la duración de ejercicio mantenido sobre el defecto en el canal de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de RyR1, los ratones se expusieron a natación durante 1, 7 o 21 días, después se sacrificaron de inmediato. Una mayor exposición a ejercicio mantenido da como resultado un incremento significativo de la hiperfosforilación por PKA de RyR1 que comenzó a los 7 días y saturó a los 21 días.

En la figura 9, realización A, el complejo del canal de RyR1 inmunoprecipitado muestra un incremento significativo y por encima de los niveles fisiológicos en la fosforilación por PKA en Ser-2844 (correspondiente a RyR1-Ser-2843 humana) después de 7 días de ejercicio por natación. En la figura 9, realización B, la normalización de fosforilación

de RyR2-Ser-2844 dentro del complejo del canal tetramero documenta un incremento significativo en la fosforilación por PKA. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,005$ .

5 En resumen, los datos de la figura 9 muestran que el ejercicio mantenido da como resultado un incremento significativo de la fosforilación de RyR1 por proteína cinasa A (PKA) que contribuye a la reducción de la subunidad de calstabilina-1 de estabilización del complejo del canal como la causa de un defecto en la ganancia de función.

10 La figura 10 proporciona datos que muestran que el incremento crónico en la estimulación simpática de los músculos esqueléticos, da como resultado la pérdida intracelular de  $Ca^{2+}$  dependiente de RyR1 y un incremento significativo en la fatiga muscular. ¿Cuál es la consecuencia funcional de un incremento crónico en la hiperfosforilación por PKA de RyR1? Como se muestra en la figura 10 para ratones y ratas con insuficiencia cardíaca por infarto de miocardio, la hiperfosforilación por PKA de RyR1 crónica da como resultado un incremento en la fatiga muscular.

15 En la realización A, se puede observar que el músculo esquelético con insuficiencia cardíaca se fatiga antes que el control. Se montó el músculo sóleo de rata ( $n = 5$  control,  $n = 8$  HF) en un baño de tejido para evaluar la función contráctil. Se muestra el trazado de tiempo de fatiga representativo para músculos esqueléticos de control e IC. El gráfico de barras muestra el tiempo medio ( $\pm$  D.E.) para una fatiga del 40 %. \*,  $P < 0,05$ . En la realización B, se puede observar que el músculo esquelético con insuficiencia cardíaca logró una fuerza tetánica máxima más lentamente que los músculos esqueléticos de control. Se indujo fuerza tetánica por estimulación de campo de alta frecuencia. El gráfico de barras muestra un tiempo de contracción del 50 %. \*\*,  $P < 0,01$ . La realización C demuestra la correlación entre el tiempo para la fatiga y la fosforilación por PKA de RyR1 ( $r = 0,88$ ) en músculo esquelético de rata de animales del grupo quirúrgico de referencia y con insuficiencia cardíaca. Se evaluaron la función muscular u  
20 la fosforilación por PKA de RyR1 usando músculos sóleos contralaterales de cada animal.

En resumen, la figura 10 proporciona datos que muestran que el ejercicio mantenido provoca la hiperfosforilación por PKA de RyR1 y la reducción de calstabilina-1, y la figura 10 muestra que se produce el defecto idéntico en formas de enfermedad con un incremento en la actividad simpática lo que provoca una pérdida intracelular de  $Ca^{2+}$  de RS y una aceleración significativa en la fatiga del músculo esquelético.

25 Un problema adicional durante el ejercicio mantenido y el estrés es la degeneración del músculo esquelético lo que contribuye además a la disminución en el rendimiento del músculo esquelético. Para evaluar los cambios estructurales durante el ejercicio mantenido, se han caracterizado cambios histológicos en los músculos de contracción rápida de ratones expuestos a 3 semanas de ejercicio por natación. Los resultados se muestran en la figura 11. Las secciones transversales del músculo extensor largo de los dedos (EDL) mostraron cambios  
30 histológicos consistentes con la degeneración de miofibras de la sobrecarga intracelular de  $Ca^{2+}$  de los canales de RyR1 defectuosos. Por lo tanto, el ejercicio mantenido durante 90 min dos veces al día desencadena un fenotipo distrófico en los músculos EDL de ratones C57B16 normales.

35 La tinción tricrómica muestra miofibras empaquetadas de dimensión seccional similar en ratones de (WT) no sometidos a ejercicio (izquierda). Tres semanas de natación da como resultado la degeneración de miofibras y depósitos de colágeno intersticial con tamaño de fibras irregular. La tinción con hematoxilina-eosina (H&E) indica cambios nucleares y muerte de miofibras. Estos cambios son consistentes con la remodelación distrófica.

40 El canal de potasio rectificador retardado rápido (I(Kr)) es importante para la repolarización del potencial de acción cardíaco. HERG es la subunidad de formación de poro del canal I(Kr). La supresión de la función de I(Kr), por ejemplo como efecto secundario de un fármaco o el resultado de una mutación en hERG, puede dar lugar al síndrome de QT-largo (LQT), que está asociado con un incremento en el riesgo de arritmias potencialmente mortales. El compuesto de la presente invención presenta un menor nivel de actividad bloqueante de hERG que JTV-519, como se demuestra en las figura 12. Por tanto, se espera que el compuesto de la presente invención sea menos tóxico y/o presente menos efectos secundarios que JTV-519.

45 Las figuras 12 a 15 ilustran el efecto del compuesto ARM036 (también denominado S36) y ARM036-Na (una sal sódica de ARM036) sobre las corrientes de hERG).

50 La figura 12 muestra un registro de corriente de fijación de voltaje de hERG típica antes (control) y después de la aplicación de ARM036 a 100  $\mu$ M. El protocolo de pulso de voltaje usado para activar las corrientes de hERG se ilustra debajo del trazo de corriente. se puede observar que, después de la activación por el prepulso de acondicionamiento (a +20 mV), la repolarización parcial (pulso de prueba de -50 mV) de la membrana provoca una gran corriente de cola externa que decae lentamente. La aplicación de ARM036 redujo mínimamente la corriente de cola externa en de manera dependiente de la concentración y del tiempo.

La figura 13 muestra un transcurso de tiempo típico del efecto de ARM036 a 100 mM sobre la amplitud de corriente del canal de hERG.

55 La figura 14 es un gráfico que muestra la dependencia de la concentración del efecto de ARM036 sobre la corriente de hERG. La tabla 1 proporciona los datos numéricos que se ilustran gráficamente en la figura 14. Debido a que la mayor concentración de ARM036 sometida a prueba dio como resultado una inhibición de corriente menor del 50 %, no fue posible determinar un valor de  $CI_{50}$  para ARM036.

Tabla 1

| Concentración (µM) | Media | DE   | EEM  | N |
|--------------------|-------|------|------|---|
| 10                 | 0,7%  | 0,3% | 0,2% | 3 |
| 100                | 0,9%  | 0,7% | 0,4% | 3 |

La figura 15 es un gráfico que muestra la dependencia de la concentración del efecto de ARM036-Na sobre la corriente de hERG. La tabla 2 proporciona los datos numéricos que se ilustran gráficamente en la figura 15. Debido a que la mayor concentración de ARM036-Na sometida a prueba dio como resultado una inhibición de corriente menor del 50 %, no fue posible determinar un valor de  $CI_{50}$  para ARM036-Na.

5

Tabla 2

| ID del artículo de prueba | $CI_{50}$ (µM) | Conc. (µM) | % inhibición de hERG medio | % desviación estándar | % error estándar | n | Datos individuales (% inhibición) |
|---------------------------|----------------|------------|----------------------------|-----------------------|------------------|---|-----------------------------------|
| ARM036-Na                 | ND             | 0,01       | 0,2 %                      | 0,2 %                 | 0,2 %            | 2 | 0,0 %                             |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 0,3 %                             |
|                           |                | 0,1        | 6,0 %                      | 7,1 %                 | 5,0 %            | 2 | 10,0 %                            |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 0,0 %                             |
|                           |                | 1          | 5,5 %                      | 4,4 %                 | 3,1 %            | 2 | 2,4 %                             |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 6,6 %                             |
|                           |                | 10         | 6,7 %                      | 2,2 %                 | 1,6 %            | 2 | 6,1 %                             |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 8,2 %                             |

La tabla 3 proporciona los datos numéricos que se ilustran gráficamente en la figura 23. El valor de  $CI_{50}$  para JTV-519 fue de 0,463 µM.

Tabla 3

| ID del artículo de prueba | $CI_{50}$ (µM) | Conc. (µM) | % inhibición de hERG medio | % desviación estándar | % error estándar | n | Datos individuales (% inhibición) |
|---------------------------|----------------|------------|----------------------------|-----------------------|------------------|---|-----------------------------------|
| ARM0XX                    | 0 463          | 0,01       | 5,0 %                      | 0,3 %                 | 0,2 %            | 2 | 5,2 %                             |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 4,8 %                             |
|                           |                | 0,1        | 18 1 %                     | 11,4 %                | 8,1 %            | 2 | 10 0 %                            |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 26,1 %                            |
|                           |                | 1          | 68,4 %                     | 19,1 %                | 13,5 %           | 2 | 81,9 %                            |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 54,9 %                            |
|                           |                | 10         | 92 8 %                     | 5,8 %                 | 4,1 %            | 2 | 96,9 %                            |
|                           |                |            |                            |                       |                  |   | 88,7 %                            |

10 El fármaco antiarrítmico E-4031, un bloqueante conocido de corrientes de hERG, se usó como control positivo. E-4031 bloqueó la corriente de hERG con una  $CI_{50}$  de 0,5 µM (n = 6).

En resumen, una sal del compuesto S36 de la presente invención presenta una reducción en la actividad bloqueante de hERG en comparación con JTV-519. Por tanto, se espera que el compuesto de la invención sea menos tóxico y/o presenten menos efectos secundarios que JTV-519.

15 La tabla 4 a continuación proporciona un valor de  $CE_{50}$  para un compuesto S36. Los datos de  $CE_{50}$  se obtuvieron usando el ensayo de reunión de FKBP 12.6 descrito anteriormente para determinar la cantidad de unión de FKBP 12.6 a RyR2 fosforilado por PKA a varias concentraciones (0,5- 1000 nM) del compuesto S36. El valor de  $CE_{50}$  está calculado usando el ajuste de curva de Michaelis-Menten.



Tabla 4

| Compuesto N.º: | CE <sub>50</sub> (nM) |
|----------------|-----------------------|
| 36             | 15                    |

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Fosforilación por PKA de RyR2 y unión de FKBP12.6

Se preparan membranas RS cardíacas, como se describe previamente (Marx, et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP 12.6 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/Ca<sup>(2+)</sup>-release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78:990-97,1996). Se generó FKBP12.6 marcado con <sup>35</sup>S usando el sistema de transcripción/traducción TNT™ Quick Coupled de Promega (Madison, WI). Se usó la unión a [<sup>3</sup>H] rianodina para cuantificar los niveles de RyR2. Se diluyeron 100 µg de microsomas en 100 µl de tampón de imidazol 10 mM (pH 6,8), incubados con [<sup>35</sup>S]-FKBP12.6 250 nM (concentración final) a 37 °C durante 60 min, después se desactivó con 500 µl de tampón de imidazol enfriado con hielo. Se centrifugaron las muestras a 100.000 g durante 10 min y se lavaron tres veces en tampón imidazol. Se determina la cantidad de [<sup>35</sup>S]-FKBP12.6 unido por recuento de centelleo líquido del sedimento.

### Ejemplo 2 - Inmunotransferencias

Se realizan inmunotransferencias de microsomas (50 µg) como se describe, con 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 de P2809-fosfoepitopo es un anticuerpo de conejo policlonal purificado por afinidad, fabricado por encargo por Zymed Laboratories (San Francisco, CA) usando el péptido, CRTRRI-(pS)-QTSQ, que corresponde a RyR2 fosforilado por PKA en Ser<sup>2809</sup>. Después de la incubación con IgG anti-conejo marcada con HRP (dilución 1:5.000; Transduction Laboratories, Lexington, KY), se desarrollan las transferencias usando ECL (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ).

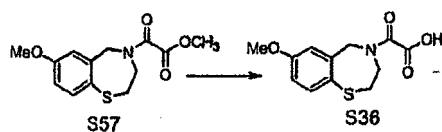
### Ejemplo 3 - Registros de un solo canal

Los registros de un solo canal de RyR2 naturales de corazones de ratón, o RyR2 recombinante, se adquieren bajo condiciones de fijación de voltaje a 0 mV, como se describe previamente (Marx, et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP 12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101:365-76, 2000). Las soluciones simétricas usadas para los registros de canal son: compartimento trans - HEPES, 250 mmol/l; Ba(OH)<sub>2</sub>, 53 mmol/l (en algunos experimentos, Ba(OH)<sub>2</sub> se sustituye por Ca(OH)<sub>2</sub>); pH 7,35; y compartimento cis - HEPES, 250 mmol/l; Tris-base, 125 mmol/l; EGTA, 1,0 mmol/l; y CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mmol/l; pH 7,35. A menos que se indique de otro modo, los registros de un solo canal se realizan en presencia de 150 nM [Ca<sup>2+</sup>] y 1,0 mM [Mg<sup>2+</sup>] en el compartimento cis. Se aplica rianodina (5 mM) al compartimento cis para confirmar la identidad de todos los canales. Se analizan los datos a partir de registros de corriente digitalizados usando el programa informático Fetchan (Axon Instruments, Union City, CA). Todos los datos se expresan como media ± EM. Se usa la prueba de la T para datos independientes para la comparación estadística de los valores medios entre experimentos. Un valor de p<0,05 se considera estadísticamente significativo.

### Ejemplo 4 - Compuestos y procedimientos para su síntesis

Se preparó Synthron S26 de acuerdo con procedimientos descritos en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 10/680.988.

Esquema 1: Síntesis de S36



Síntesis de S26 (esquema 1): A una solución agitada de S36 (0,85 g, 4,4 mmol) y piridina (0,70 g, 8,8 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) a 0 °C se le añade gota a gota cloroacetato de metilo (0,81 g, 6,6 mmol). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 2 horas, a continuación se lava con bicarbonato de sodio saturado, HCl 1 N y agua. La cromatografía de columna en gel de sílice proporciona S57 como un sólido de color blanco (1,1 g, rendimiento del 90 %). Se disuelve S57 (1,1 g, 3,9 mmol) en metanol (10 ml) y a continuación, se añade una solución de hidróxido de sodio (0,3 g, 7,5 mmol) en agua (10 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una

hora. Después de retirar el disolvente, se disuelve el residuo en agua (10 ml) y se lava con éter (2x10 ml). Se acidifica la fase acuosa con HCl 1 N hasta pH = 2. Se extrae el producto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x10 ml). La retirada del disolvente proporciona el producto S36 como un sólido de color blanco (1,0 g, rendimiento del 100 %). El producto se puede purificar adicionalmente por cristalización.

#### 5 Ejemplo 5 - Procedimiento de cribado ultrarrápido

Se han desarrollado ensayos para cribar moléculas pequeñas biológicamente activas. Estos ensayos se basan en la reunión de la proteína FKBP 12 a RyR.

Se desarrolla un ensayo altamente eficaz para el cribado ultrarrápido para moléculas pequeñas por inmovilización de FKBP 12.6 (proteína de fusión GST) sobre una placa de 96 pocillos recubierta con glutatona. El receptor de rianodina fosforilado por PKA de tipo 2 (RyR2) se carga sobre la placa recubierta con FKBP12.6, y se incuba con análogos de JTV-519 a varias concentraciones (10-100 nM) durante 30 min. Después de esto, se lava la placa para retirar el RyR2 no unido, y a continuación se incuba con anticuerpo anti-RyR2 durante 30 min. Se lava de nuevo la placa para retirar el anticuerpo anti-RyR2 no unido, y después se trata con anticuerpo secundario con marcado fluorescente. Se lee la placa por un lector de placas fluorescente automático para determinar la actividad de unión.

En un ensayo alternativo, RyR2 está fosforilado por PKA en presencia de 32P-ATP. Se carga el RyR2 fosforilado por PKA radioactivo sobre una placa de 96 pocillos recubierta con FKBP12.6, en presencia de análogos de JTV-519 a varias concentraciones (10-100 nM) durante 30 min. Se lava la placa para retirar el RyR2 radiomarcado no unido, y a continuación se lee por un lector de placas automático.

#### Ejemplo 6 - Efecto de los compuestos sobre corrientes de hERG

Se estudiaron los efectos de los compuestos de la invención sobre corrientes de hERG usando células cultivadas de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) que se habían transfectado de forma estable con ADNc de hERG. Las células HEK 293 no expresan hERG endógeno. Se transfectaron células HEK293 con un plásmido que contenía el ADNc de hERG y un gen de resistencia a neomicina. Se seleccionaron los transfectantes estables cultivando las células en presencia de G418. Se mantuvo la presión de selección por cultivo continuado en presencia de G418. Se cultivaron las células en medio Eagle modificado de Dulbecco/Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F-12) complementado con suero fetal bovino al 10 %, 199 U/ml de penicilina G sodio, 10 µg/ml de sulfato estreptomycin y 500 µg/ml de G418. Se cultivaron las células para su uso en electrofisiología en platos de 35 mm.

Se realizaron registros electrofisiológicos (usando el procedimiento de pinzamiento zonal de membrana total) a temperatura ambiente (18 °C-24 °C). Cada célula actuó como su propio control. Se evaluó el efecto de ARM036 en dos concentraciones: 10 y 100 µM. Se sometió a prueba cada concentración en al menos tres células (n ≥ 3). Se usó cisaprida 90 nM (disponible comercialmente de TOCRIS Bioscience) como control positivo para el bloqueo de hERG. Para el registro, se transfectaron células a la cámara de registro y se supercondensó con solución de control de vehículo. La solución de pipeta de parche para registros de célula completa contenía aspartato de potasio 130 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 5 mM, ATP 4 mM y HEPES 10 mM. Se ajustó el pH hasta 7,2 con KOH. Se preparó la solución de pipeta en lotes, se alícuotó y se almacenó congelada. Se descongeló una alícuota y se usó cada día. Las pipetas de parche se fabricaron de tubos de capilaridad de vidrio usando un extractor de micropipeta P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA). Se usó un amplificador de pinzamiento zonal de membrana comercial para los registros de célula completa. Antes de la digitalización, se filtraron con paso bajo registros de corriente a un quinto de la frecuencia de muestra.

Se midió el bloqueo de inicio y de equilibrio de corriente de hERG usando un patrón de pulso con amplitudes fijas (acondicionamiento prepulso: +20 mV durante 2 segundos; pulso de prueba: -50 mV durante 2 segundos) repetido a intervalos de 10 segundos, a partir de un potencial de control de -80 mV. Se midió la corriente máxima de cola durante la etapa de 2 segundos a -50 mV. Se mantuvo un equilibrio durante al menos 30 segundos antes de aplicar el compuesto de prueba o el control positivo. Se monitorizó la corriente máxima de cola hasta que se logró un nuevo equilibrio. Se aplicaron las concentraciones del compuesto de prueba de forma cumulativa en orden ascendente sin lavado entre aplicaciones.

Se realizó un análisis de adquisición de datos usando el paquete informático de pCLAMP (Vre. 8.2) (Axon Instruments, Union City, CA). Se definió el equilibrio por la velocidad constante limitante de cambio con el tiempo (dependencia lineal con el tiempo). El equilibrio antes y después de la aplicación de los compuestos de prueba o de control se usó para calcular el porcentaje de corriente que inhibía cada concentración. Se ajustaron los datos de concentración-respuesta a una ecuación de la forma:

$$\% \text{Bloqueo} = \{1 - 1/[prueba]/IC_{50})^N\} \times 100$$

donde [prueba] es la concentración del compuesto de prueba, IC<sub>50</sub> (concentración inhibidora 50) es la concentración del compuesto de prueba que produce la mitad de la inhibición máxima, N es el coeficiente de Hill, y % Bloqueo es el porcentaje de corriente de hERG inhibida a cada concentración del compuesto de prueba. Los ajustes cuadrados no lineales se resolvieron con el complemento Solver de Excel 2000 (Microsoft, Redmond, WA). Para algunos

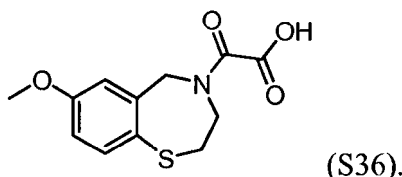
compuestos no fue posible determinar la  $CI_{50}$  porque la mayor concentración del compuesto de prueba usado no bloqueó el canal de hERG en un 50 % o más.

**Ejemplo 7 - Efecto de varios compuestos sobre corrientes de hERG**

- 5 Se sometió a prueba el compuesto de la invención para determinar su efecto sobre corrientes de hERG. El compuesto sometido a prueba fue ARM036-Na. A modo de comparación, también se sometió a prueba el efecto de JTV-519 (denominado en las figuras ARM00X) sobre corrientes de hERG. Se realizaron registros electrofisiológicos usando el sistema de pinzamiento zonal de membrana paralelo automático PatchXpress 7000A (Molecular Devices). Se sometió a prueba cada compuesto a 0,01, 0,1, 1 y 10 mM, con cada concentración probada en 2 células ( $n > 2$ ).
- 10 La duración de exposición para cada concentración de prueba fue de 5 minutos. Otros aspectos de los protocolos experimentales fueron esencialmente similares a los descritos en el ejemplo 6. Para ARM036-Na no fue posible determinar la  $CI_{50}$  porque la mayor concentración del compuesto de prueba usado no bloqueó el canal de hERG en un 50 % o más.

## REIVINDICACIONES

1. Una sal de un compuesto representado por la estructura:



2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la sal es una sal de sodio.
3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en agentes analgésicos, antioxidantes, agentes aromáticos, tampones, aglutinantes, colorantes, disgregantes, diluyentes, emulsionantes, excipientes, cargas, agentes de mejora del aroma, gelificantes, deslizantes, conservantes, potenciadores de penetración cutánea, solubilizantes, estabilizantes, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes de tonicidad, vehículos, y agentes de incremento de la viscosidad.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en forma de una cápsula, gránulo, polvo, solución, suspensión, o comprimido y está diseñado para la administración por modo oral, sublingual, bucal, parenteral, intravenoso, transdérmico, por inhalación, intranasal, vaginal, intramuscular, o rectal.
5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar o evitar un trastorno o enfermedad asociados con un RyR que regula el funcionamiento de los canales de calcio en las células.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que el trastorno o enfermedad está seleccionado del grupo que consiste en trastornos y enfermedades cardíacos, trastornos y enfermedades del músculo esquelético, trastornos y enfermedades cognitivos, hipertermia maligna, diabetes, y muerte súbita del lactante.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los trastornos y enfermedades cardíacos están seleccionados del grupo que consiste en trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular; trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio; muerte súbita de origen cardiaco; muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio; insuficiencia cardíaca congestiva; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; tensión arterial alta,
- preferentemente en la que los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular y los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio están seleccionados del grupo que consiste en arritmia auricular y ventricular; fibrilación auricular y ventricular; taquiarritmia auricular y ventricular; taquicardia auricular y ventricular; taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC); y variantes inducidas por ejercicio de los mismos.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los trastornos y enfermedades del músculo esquelético están seleccionados del grupo que consiste en fatiga del músculo esquelético, fatiga del músculo esquelético inducida por ejercicio, miodistrofia, trastornos de la vejiga, e incontinencia.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que los trastornos y enfermedades cognitivos están seleccionados del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, formas de pérdida de memoria, y pérdida de memoria dependiente de la edad.
10. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para tratar o evitar un trastorno o enfermedad asociados con un RyR que regular el funcionamiento de los canales de calcio en las células.
11. El uso de la reivindicación 10, en el que el trastorno o enfermedad está seleccionado del grupo que consiste en trastornos y enfermedades cardíacos, trastornos y enfermedades del músculo esquelético, trastornos y enfermedades cognitivos, hipertermia maligna, diabetes, y muerte súbita del lactante.
12. El uso de la reivindicación 11, en el que los trastornos y enfermedades cardíacos están seleccionados del grupo que consiste en trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular; trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio; muerte súbita de origen cardiaco; muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio; insuficiencia cardíaca congestiva; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; y tensión arterial alta,
- preferentemente en la que los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular y los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio están seleccionados del grupo que consiste en

arritmia auricular y ventricular; fibrilación auricular y ventricular; taquiarritmia auricular y ventricular; taquicardia auricular y ventricular; taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC); y variantes inducidas por ejercicio de los mismos.

- 5
13. El uso de la reivindicación 11, en el que los trastornos y enfermedades del músculo esquelético están seleccionados del grupo que consiste en fatiga del músculo esquelético, fatiga del músculo esquelético inducida por ejercicio, miodistrofia, trastornos de la vejiga, e incontinencia.
  14. El uso de la reivindicación 11, en el que los trastornos y enfermedades cognitivos están seleccionados del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, formas de pérdida de memoria, y pérdida de memoria dependiente de la edad.

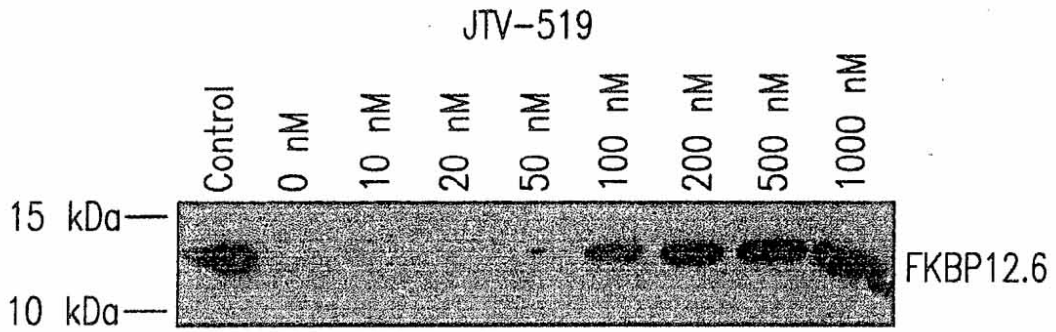


FIG. 1A

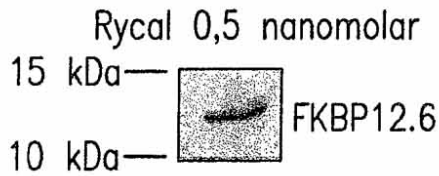


FIG. 1B

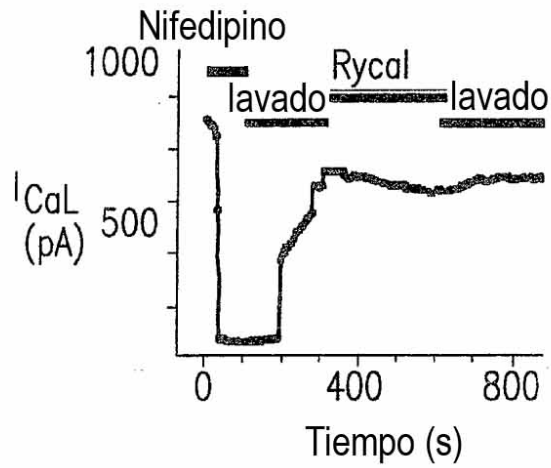


FIG. 1C

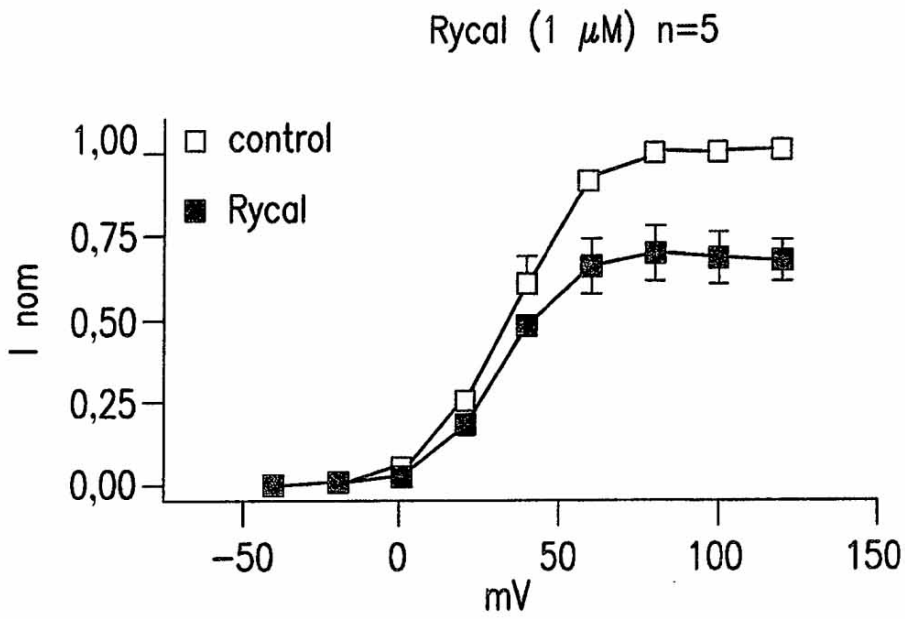
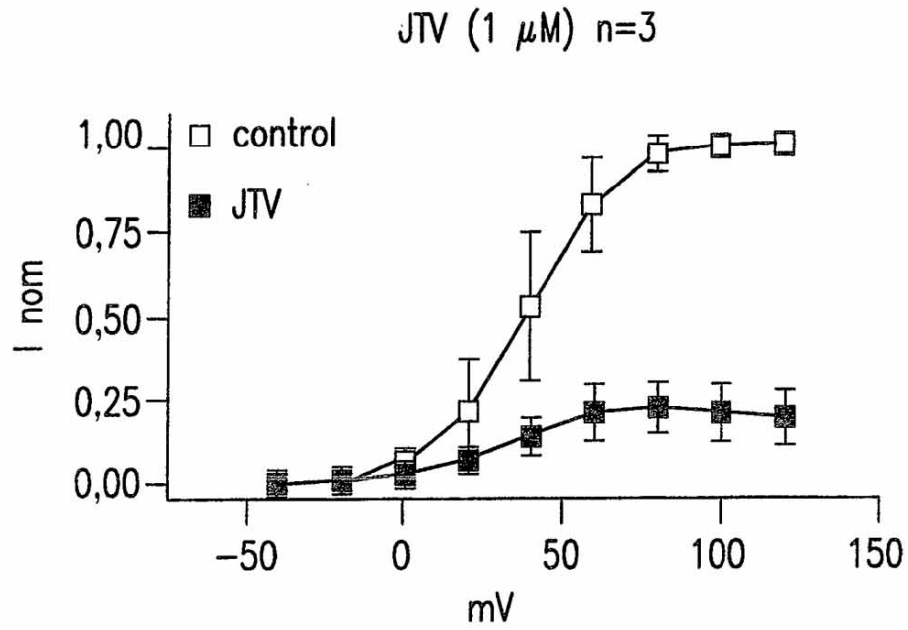


FIG. 1D

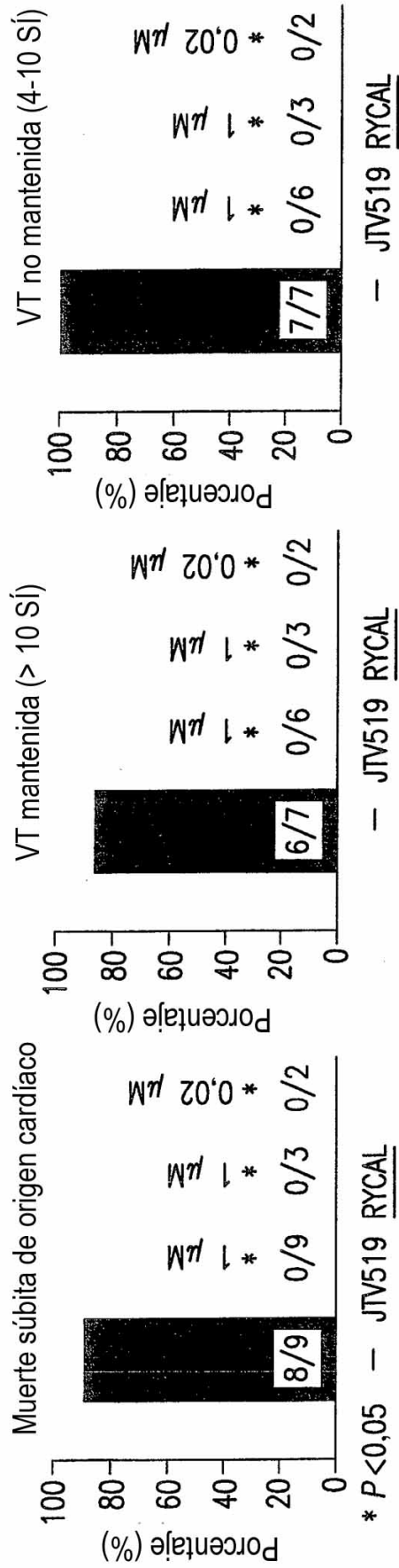


FIG. 2



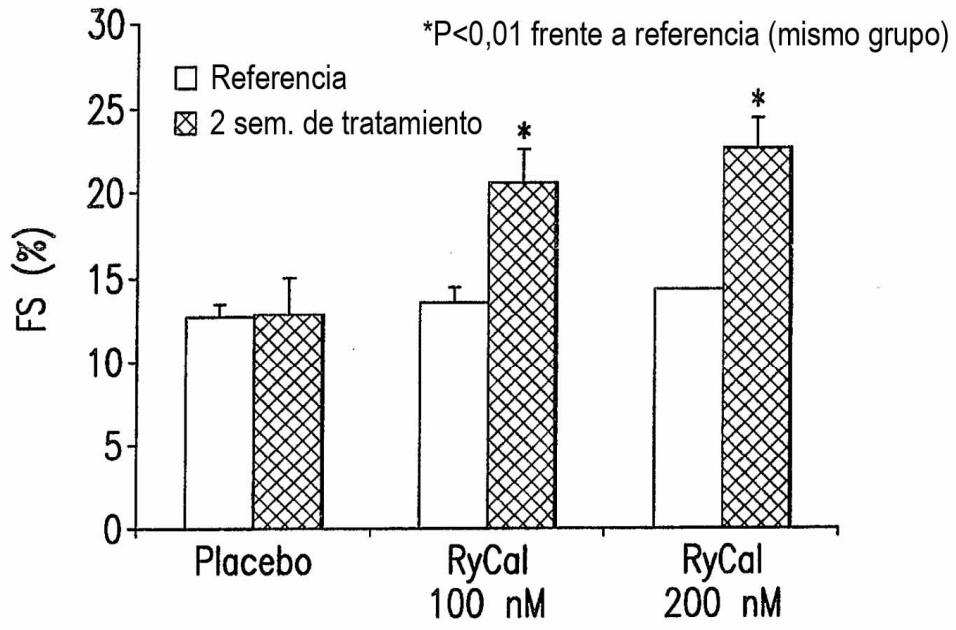


FIG. 3

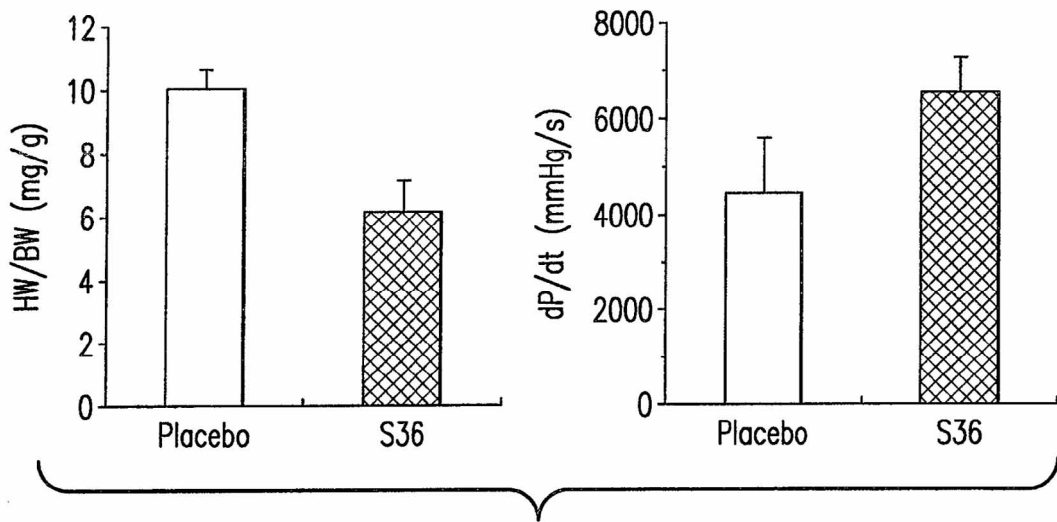


FIG. 4

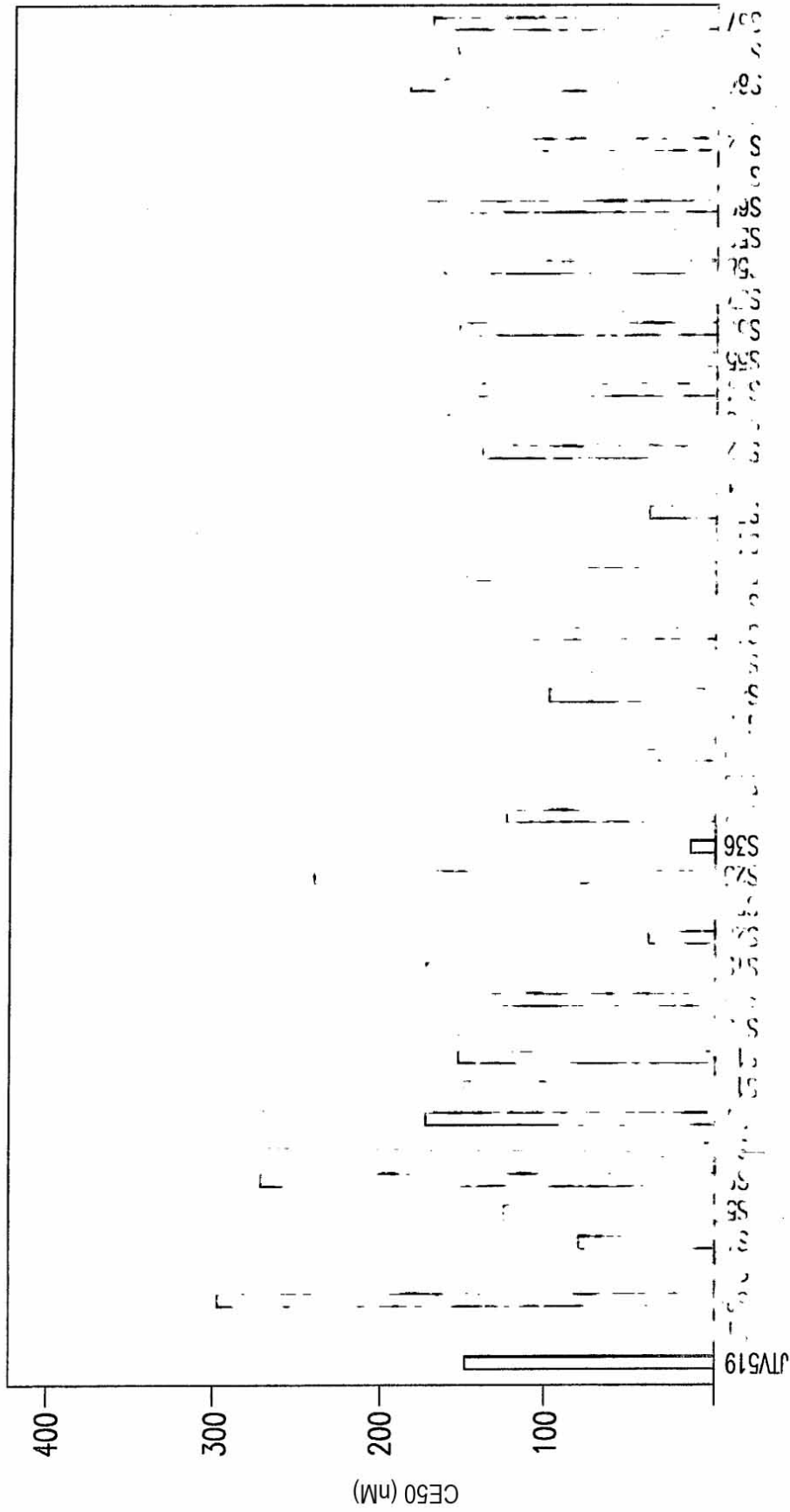


FIG. 5

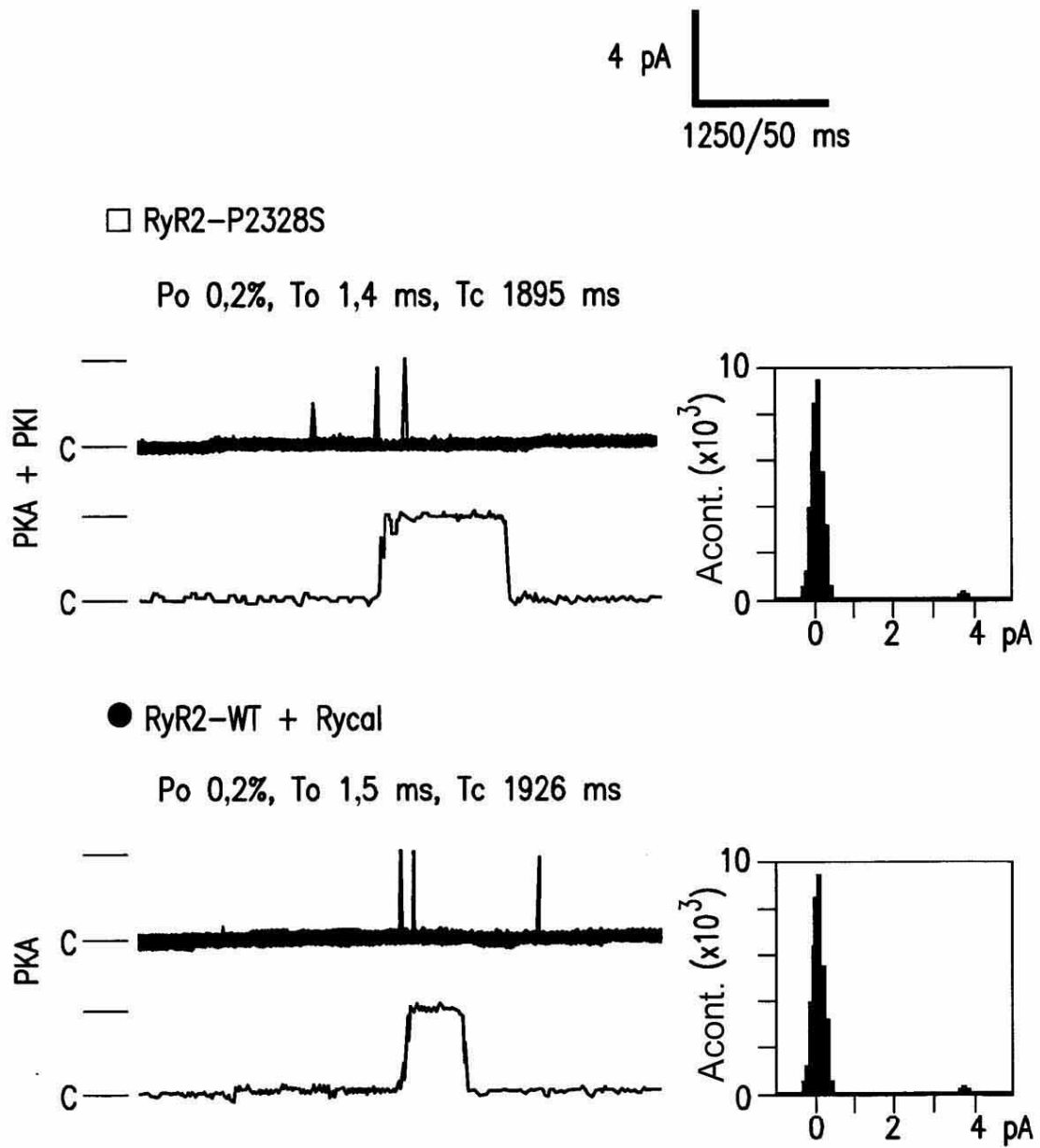


FIG. 6A

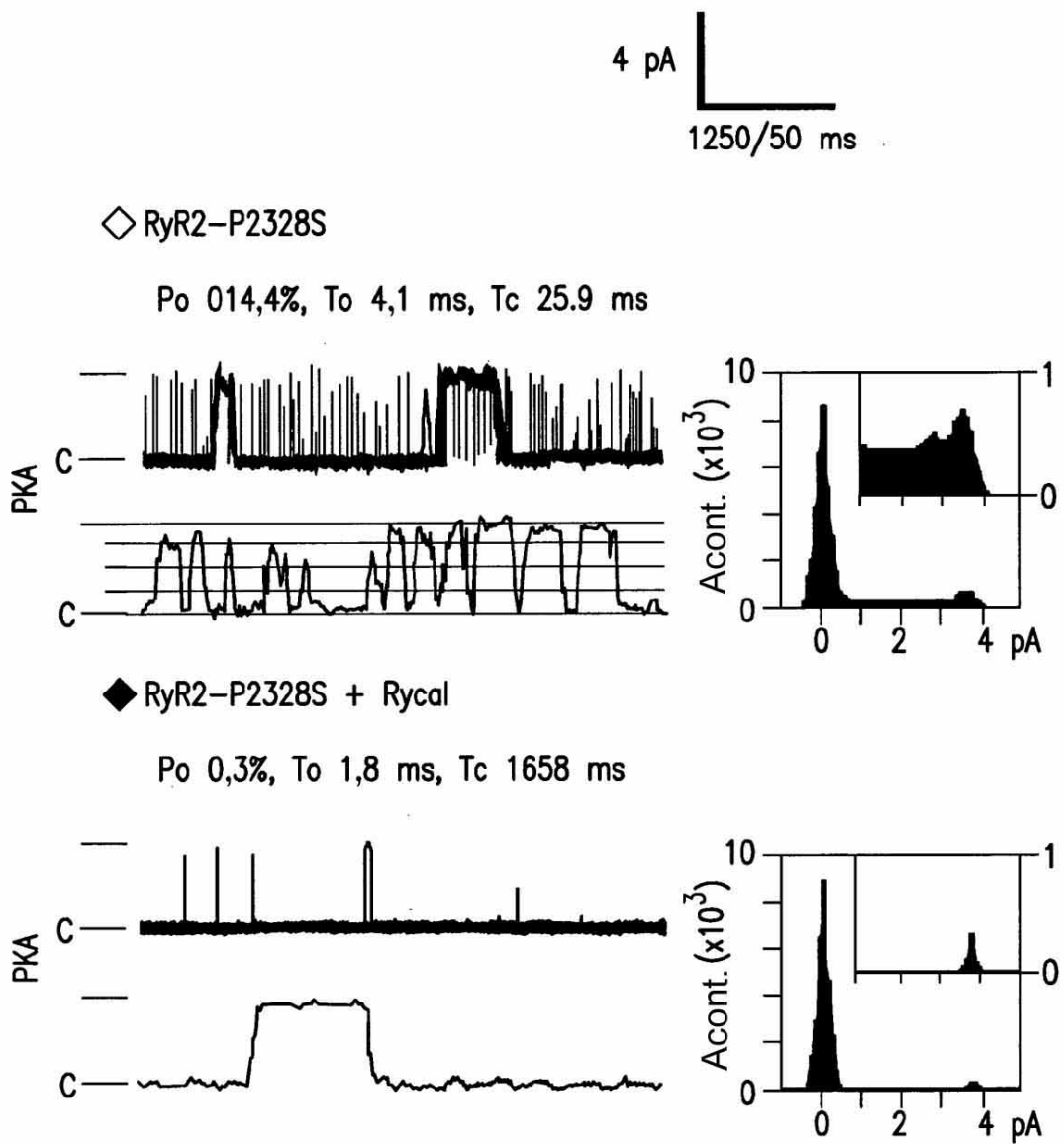


FIG. 6B

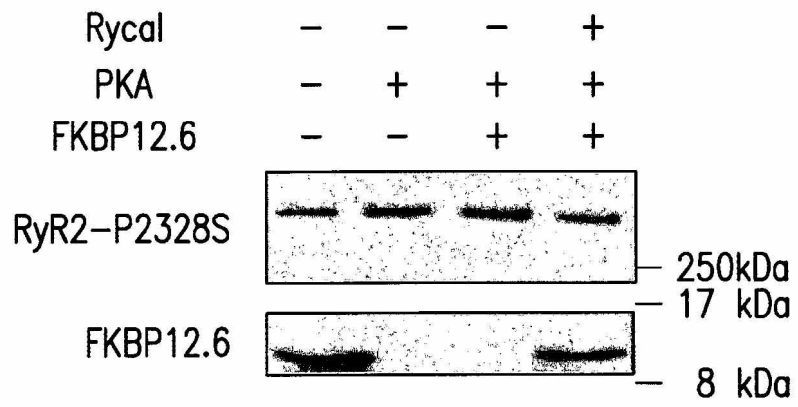


FIG. 6C

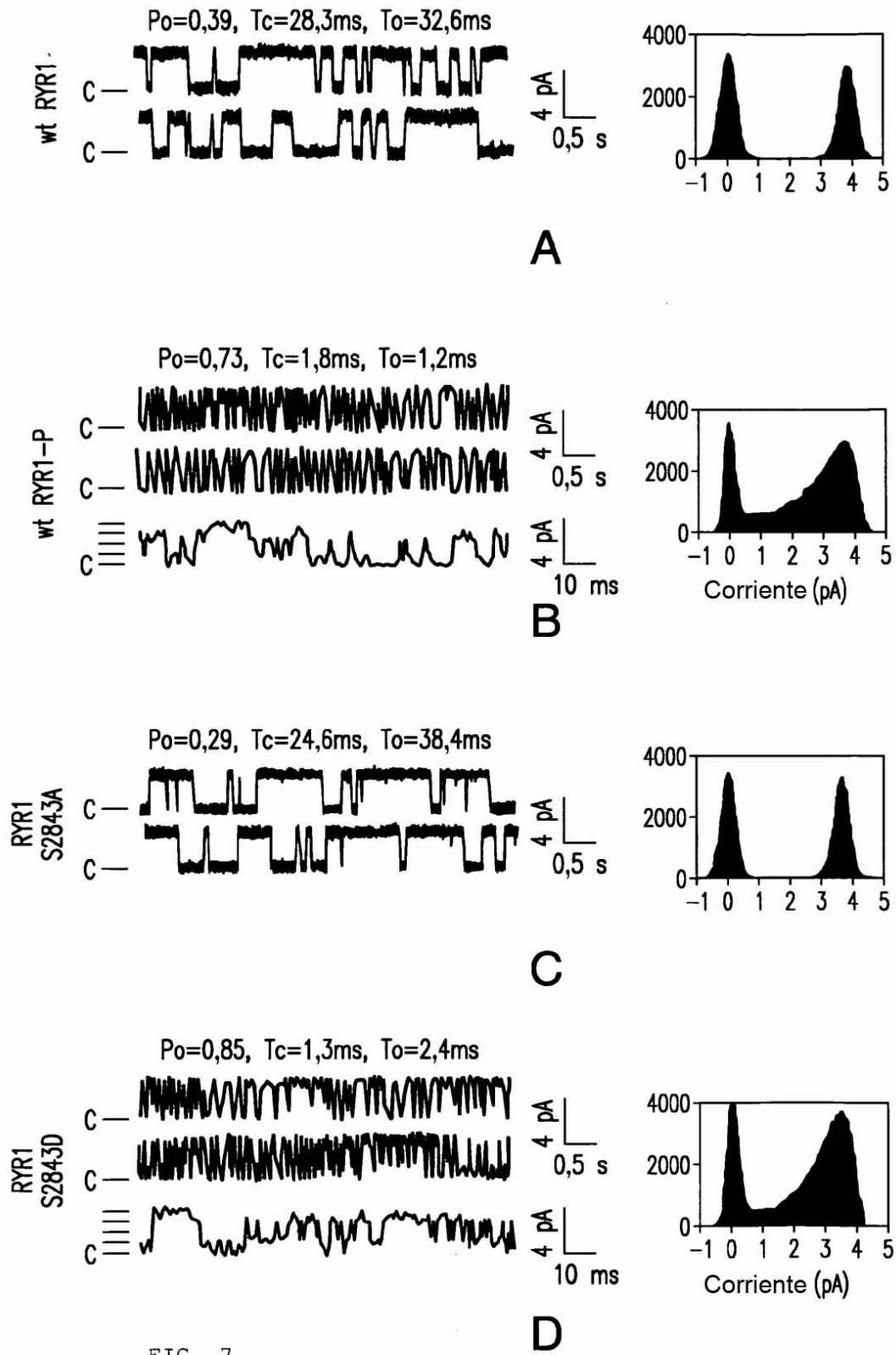
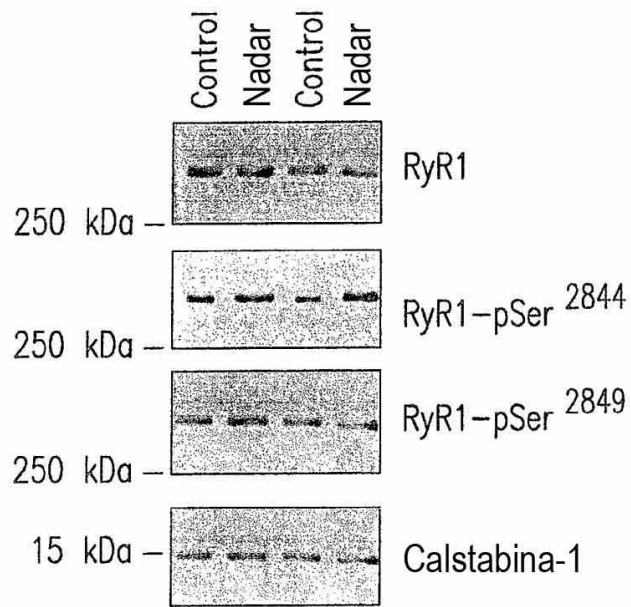
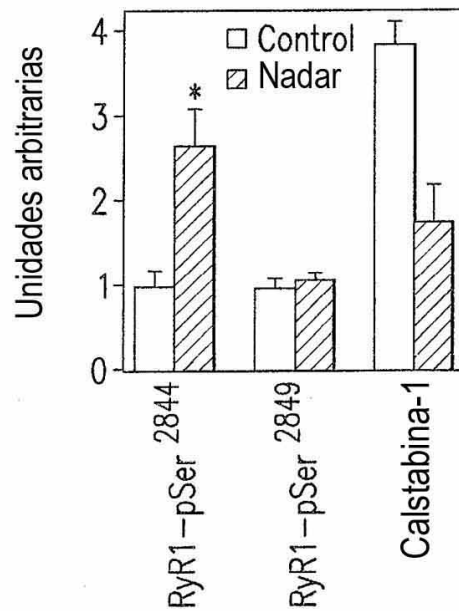


FIG. 7



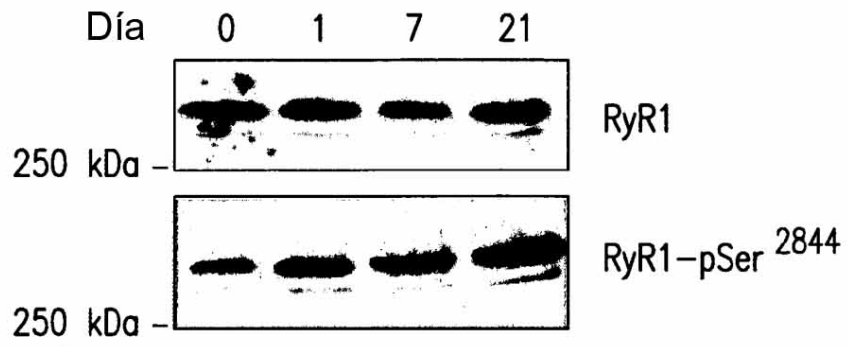
A



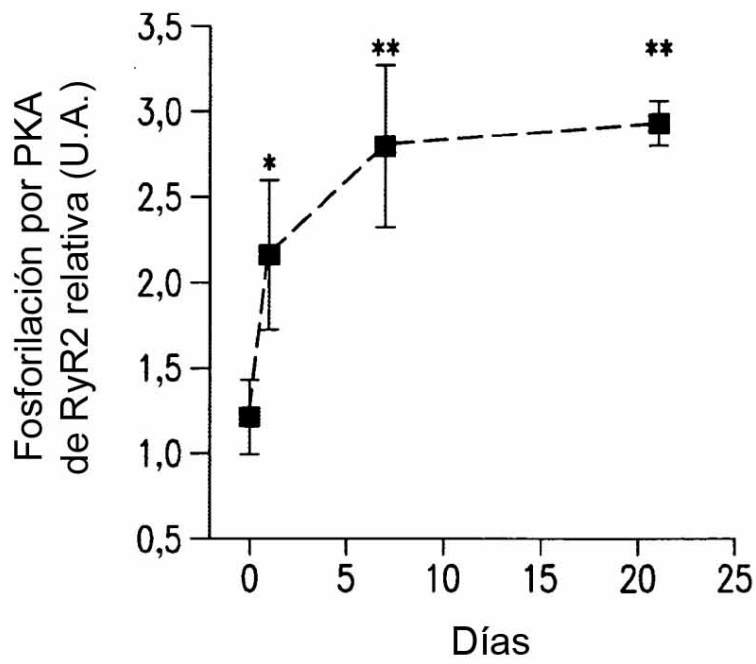
B

FIG. 8



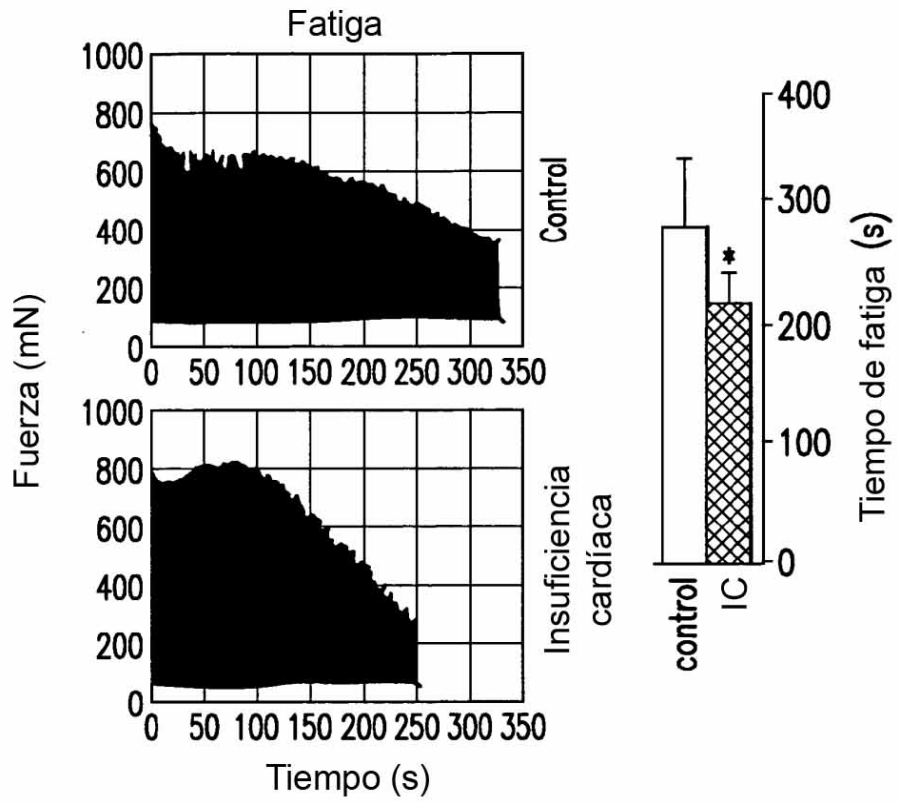


A

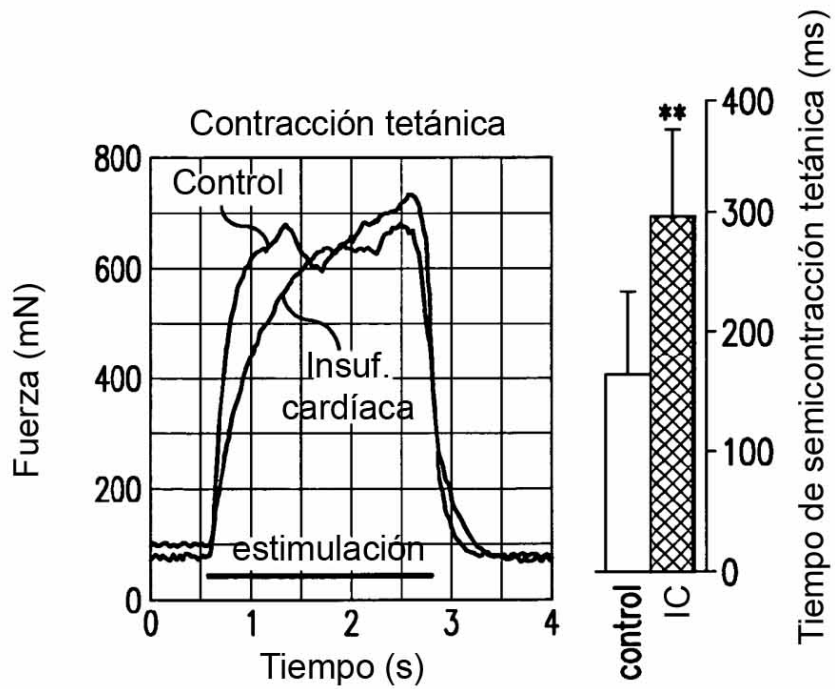


B

FIG. 9



**A**



**B**

FIG.10

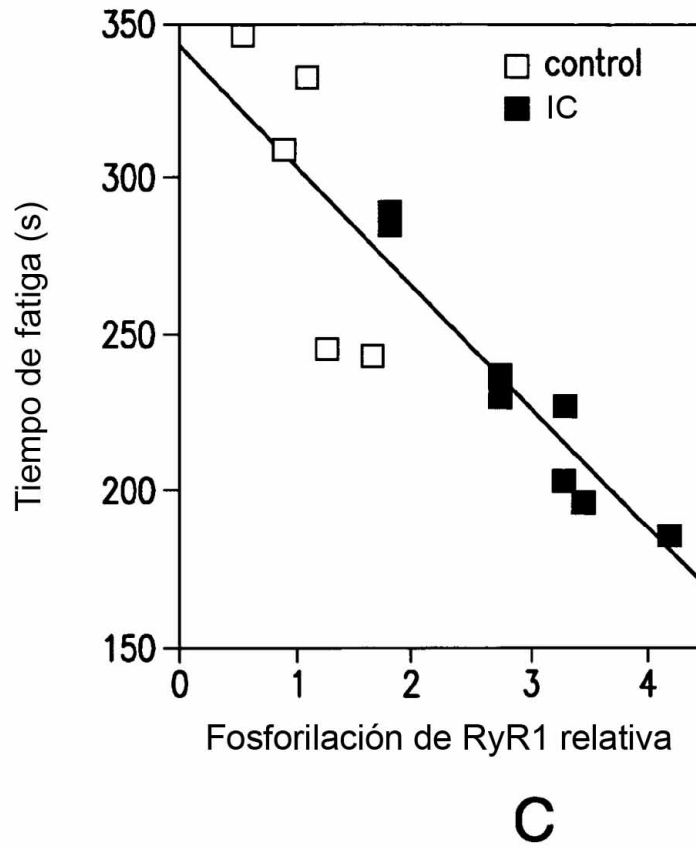


FIG. 10

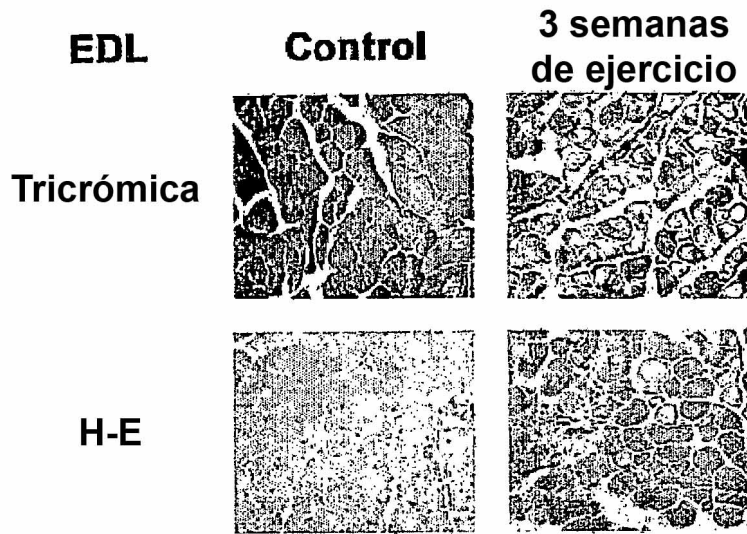


FIG. 11

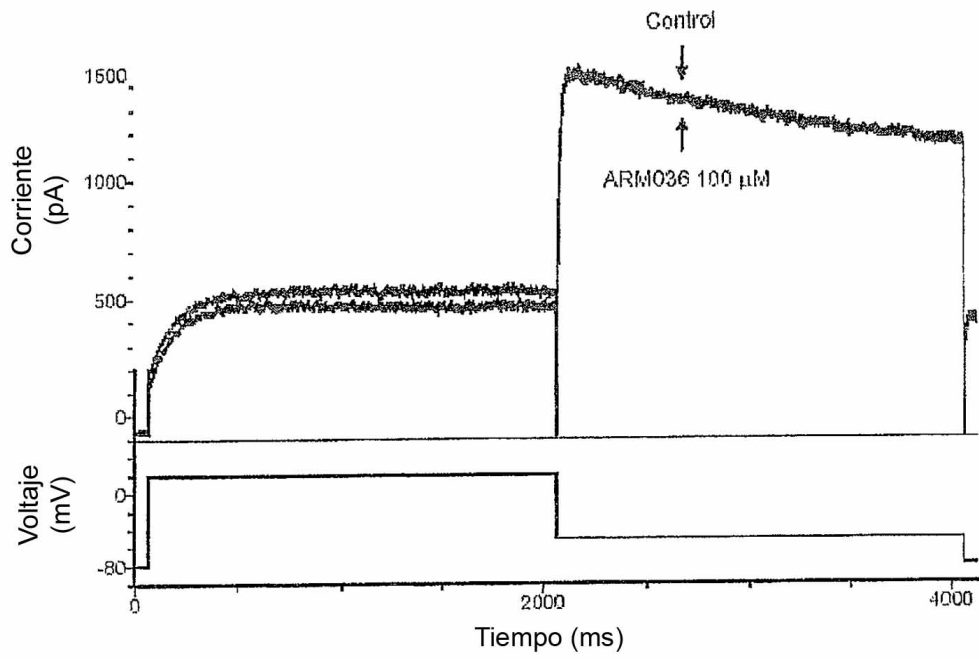


FIG. 12

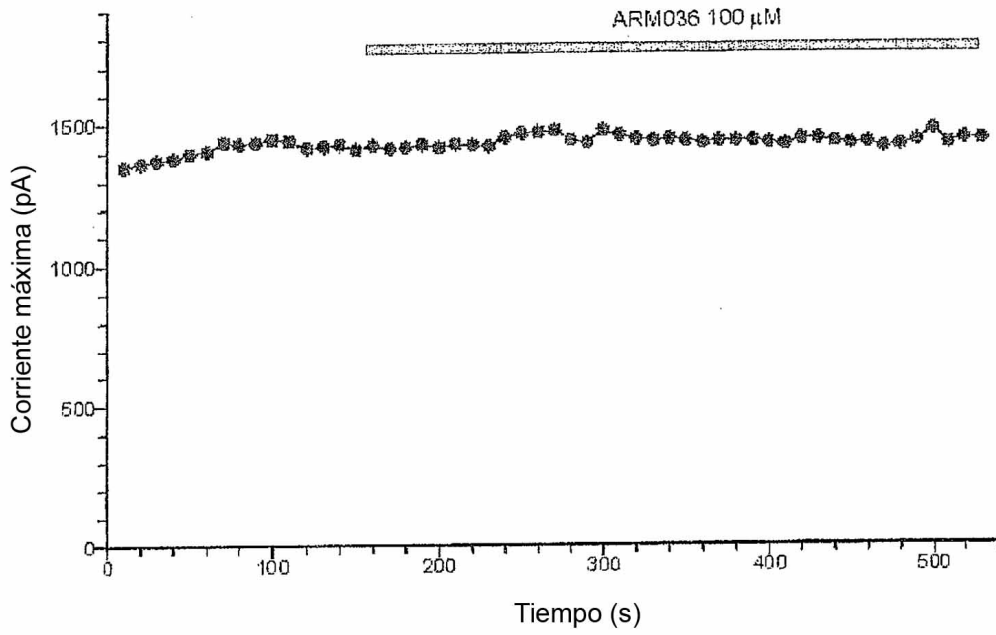


FIG. 13

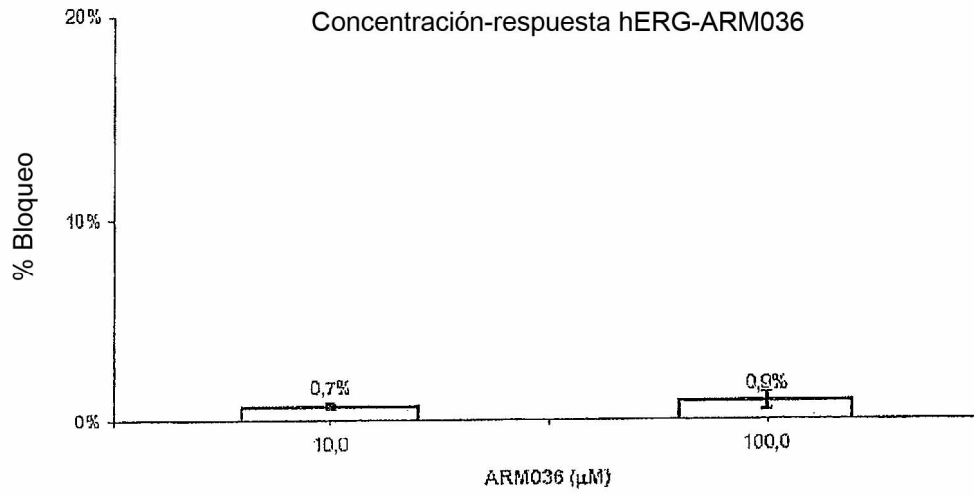


FIG. 14

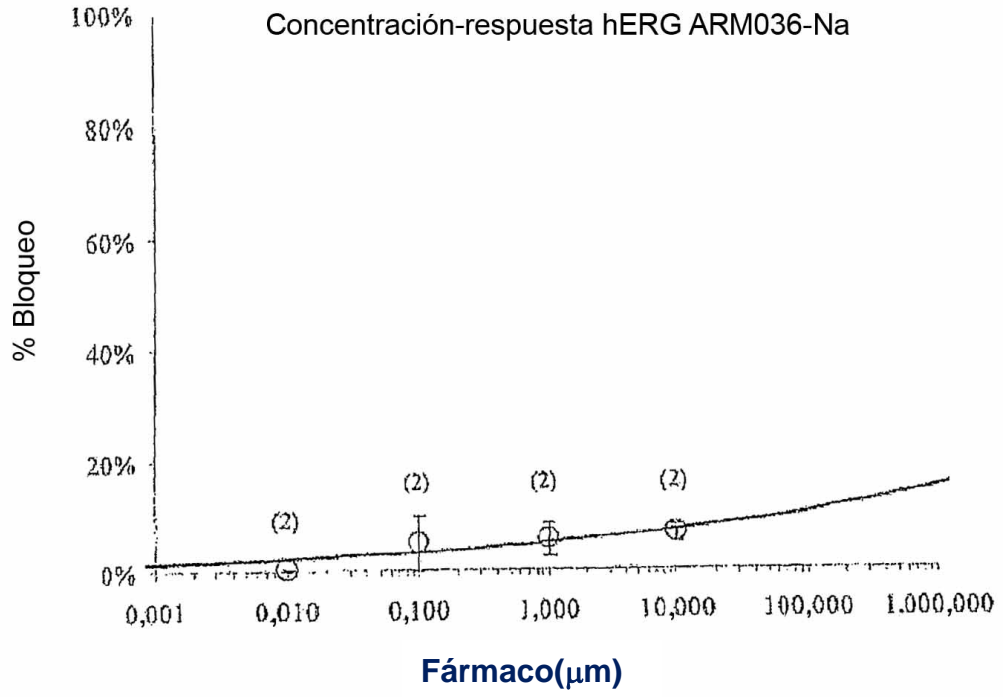


FIG. 15