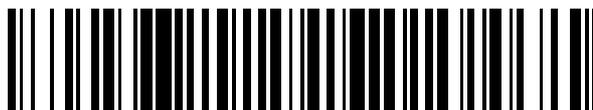


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 159**

51 Int. Cl.:

C07D 281/10 (2006.01)

A61K 31/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2006 E 06801887 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1928850**

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:
29.08.2013

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 421 159 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 (Ca^{2+}) intracelular especializado. Los canales en el RS denominados receptores de rianodina (RyR) se abren y se cierran para regular la liberación de Ca^{2+} desde el RS al citoplasma intracelular de la célula. La liberación de Ca^{2+} en el citoplasma desde el RS incrementa la concentración de 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 Ca^{2+} en el citoplasma desde el RS.

Hay tres tipos de receptores de rianodina, de los que todos son canales de 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 calstabilinas 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 Ca^{2+} desde el RS al citoplasma intracelular.

30 La liberación de 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 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 Ca^{2+} de tipo L de paso por voltaje (LTCC). Los LTCC desencadenan la liberación de Ca^{2+} desde el RS por medio de la interacción física con RyR1. El incremento resultante en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico induce la interacción actina-miosina y la contracción del músculo. Para permitir la relajación, el Ca^{2+} intracelular se vuelve a bombear hacia el RS por medio de bombas de 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 Ca^{2+} intracelular. Se encontró que la pérdida de 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.

40 En el músculo estriado cardíaco, RyR2 es el principal canal de liberación de 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 Ca^{2+} de paso por voltaje. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales de paso por voltaje abiertos a su vez inicia la liberación de Ca^{2+} desde el RS
55

por medio de RyR2. Este proceso se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . La liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mediada por RyR2 activa entonces las proteínas contráctiles en la célula miocárdica, 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 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 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 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 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 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 Ca^{2+} de bajo nivel, y esto se manifiesta como una pérdida de 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 Ca^{2+} inducida por 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
20 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 cardiaco 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 (calstabilina-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
40 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 calstabilina-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

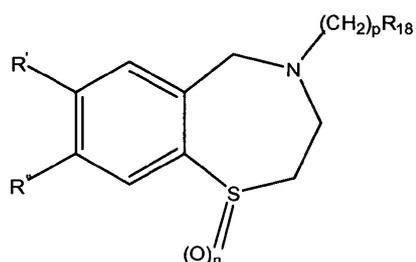
Adicionalmente, la solicitud de patente pendiente de tramitación de los EE. UU. n.º 09/288.606 analiza un procedimiento para regular la contracción del corazón de un sujeto administrando un compuesto que regula la fosforilación por PKA de un RyR2 y disminuye específicamente la fosforilación por PKA. 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
50 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 EP0565721 analiza un compuesto derivado de 1,4-benzotiazepina que inhibe la muerte celular cinética de los músculos cardíacos sin inhibir las funciones cardíacas. Los documentos WO2005/037195 y WO2005/094457 proporcionan un procedimiento para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP12.6 unida a RyR2 en un sujeto, un procedimiento para tratar o evitar la arritmia cardíaca inducida por
55 ejercicio en un sujeto, y un procedimiento para evitar la muerte súbita de origen cardiaco inducida por ejercicio en un sujeto. También se proporcionan usos de JTV-519 en estos procedimientos. El documento WO91/04328 divulga un procedimiento para aislar un ADNc específico para el receptor humano de rianodina.

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 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.

5 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.

10 En consecuencia, en general, la presente invención proporciona compuestos representados por la estructura de la fórmula I-k:



(fórmula I-k)

en la que R' y R'' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, -OH, -NH₂, -NO₂, -CN, -CF₃, -OCF₃, -N₃, -SO₃H, -S(=O)₂alquilo, -S(=O)alquilo, -OS(=O)₂CF₃, acilo, alquilo, alcoxilo, alquilamino, alquiltio, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, alquenilo, alquinilo, (hetero)arilo, (hetero)ariltio, y (hetero)arilamino; y en la que cada acilo, alquilo, alcoxilo, alquilamino, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, alquenilo, alquinilo, (hetero)arilo, (hetero)ariltio puede estar sustituido;

15

n es 0, 1 o 2; y

p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10;

20 en la que:

cuando p es 0, R₁₈ es alquilo C₁-C₄; y

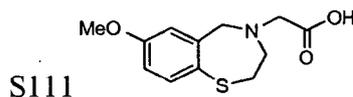
cuando p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10;

R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en -(C=O)OR₁₅, -OR₁₅, alquilo, arilo, en la que cada alquilo y arilo puede estar sustituido; y

25 R₁₅ se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquenilo, alcoxilo, OH, NH₂, alquilo, alquilamino, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, heterociclilo, y heterocicilalquilo, en la que cada acilo, alquenilo, alcoxilo, alquilo, alquilamino, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, heterociclilo, y heterocicilalquilo puede estar sustituido;

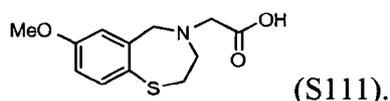
30 y enantiómeros, diastereómeros, tautómeros, sales, hidratos, solvatos, y complejos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto representado por la estructura:



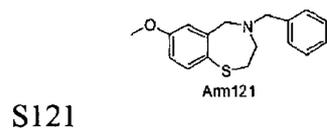
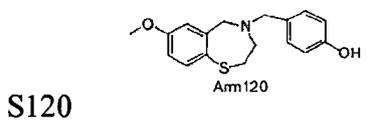
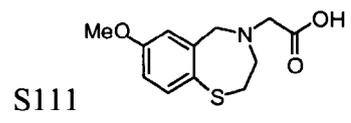
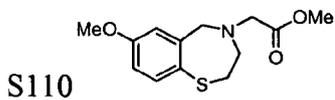
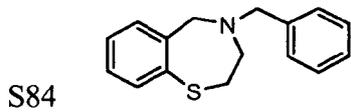
o un hidrato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, la presente invención proporciona una sal farmacéuticamente aceptable de



35

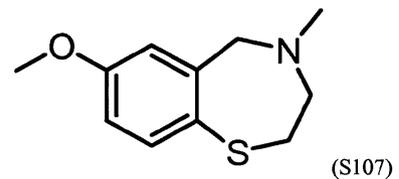
En una realización, la presente invención proporciona un compuesto representado por la estructura:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

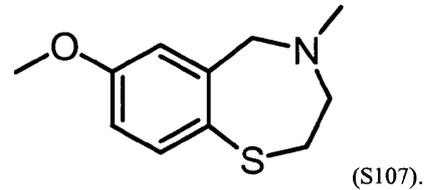
- 5 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I-k, en la que p es 0, y R₁₈ es alquilo C₁-C₄.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto representado por la estructura:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 En una realización, la presente invención proporciona una sal farmacéuticamente aceptable de



- 15 La invención puede comprender además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I-k y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en 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 un compuesto de fórmula I-k o una composición que comprende un compuesto de fórmula I-k para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad asociados con un RyR que regular 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, miodistrofia, 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.

La invención también puede proporcionar el uso de un compuesto de fórmula I-k o una composición que comprende un compuesto de fórmula I-k 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.

En una realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en S84, S107, S110, S111, S120, y S121.

La presente invención también proporciona procedimientos para la síntesis de compuestos de fórmula I-k, y sales, hidratos, solvatos y complejos de los mismos.

La presente invención proporciona además compuestos para tratar o evitar varios trastornos y enfermedades en un sujeto que están asociados con RyR, tales como trastornos musculares y cardíacos, que comprenden administrar al sujeto una cantidad de un compuesto eficaz para evitar o tratar un trastorno o enfermedad asociados con los RyR, en los que el compuesto es de fórmula I-k, o sales, hidratos, solvatos, complejos y profármacos del mismo.

También se proporcionan compuestos para evitar o tratar una pérdida en un RyR2 en un sujeto, incluyendo administrar al sujeto una cantidad de un compuesto eficaz para evitar o tratar una pérdida en el RyR2, en los que el compuesto es de fórmula I-k, o sales, hidratos, solvatos, complejos y profármacos del mismo. El sujeto es, por ejemplo, un sistema *in vitro* (por ejemplo, células o tejidos cultivados) o un sistema *in vivo* (por ejemplo, animal o humano).

Además, la presente invención proporciona compuestos para modular la unión de RyR y FKBP en un sujeto, incluyendo administrar al sujeto una cantidad de un compuesto eficaz para modular el nivel de FKBP unido a RyR, en los que el compuesto es de fórmula I-k o sales, hidratos, solvatos, complejos y profármacos del mismo. El sujeto es, por ejemplo, un sistema *in vitro* (por ejemplo, células o tejidos cultivados) o un sistema *in vivo* (por ejemplo, animal o humano).

La presente invención también proporciona artículos de fabricación para tratar y evitar trastornos y enfermedades asociados con los RyR, tales como trastornos musculares y cardíacos, en un sujeto. Los artículos de fabricación comprenden una composición farmacéutica de uno o más de los compuestos de fórmula I-k, o sales, hidratos, solvatos y complejos. Los artículos de fabricación están envasados con indicaciones para varios trastornos que las composiciones farmacéuticas pueden tratar y/o evitar.

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, 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) trazos de inmunotransferencia de la unión a calstabinina-2 de RyR2-P2328S.

En la figura 2, las realizaciones A y B son, respectivamente, (A) una inmunotransferencia de RyR2 inmunoprecipitado con un anticuerpo frente a RyR2, y inmunotransferencias de fosforilación por PKA de RyR2 en Ser-2809 y calstabinina-2; y (B) un gráfico de barras que cuantifica la cantidad relativa de RyR2 fosforilado por PKA en Ser-2808 (correspondiente a Ser-2809 humana) unida a RyR2 en ratones naturales (control) y ratones deficientes en calstabinina-2 (FKBP12.6^{-/-}).

En la figura 3, las realizaciones A, B, y C son, respectivamente, gráficos de barras de (A) ecocardiogramas en modo M *in vivo* cuantitativos que comparan la fracción de expulsión (FE) antes y después de la operación del grupo

- quirúrgico de referencia o de la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) en ratones naturales y activados con RyR2-S2808A; (B) cuantificación del bucle presión-volumen *in vivo* del cambio máximo de presión con el tiempo (dP/dt) en ratones naturales y activados con RyR2-S2808A después de la operación del grupo quirúrgico de referencia o de la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD); y (C) evaluación ecocardiográfica en modo M cuantitativa del diámetro telesistólico (DTS) en ratones naturales y activados con RyR2-S2808A después de la operación del grupo quirúrgico de referencia o de la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD).
- En la figura 4, las realizaciones A, B, C, D, E, y F demuestran que la función del canal de RyR1 se incrementa y normaliza en ratones *mdx* tratados con JTV-519. Las realizaciones A y B son, respectivamente, un trazo de corriente de un solo canal y un histograma de amplitud de RyR1 del músculo sóleo de un ratón de control (natural) bajo condiciones de reposo. Las realizaciones C y D son, respectivamente, un trazo de corriente de un solo canal y un histograma de amplitud de RyR1 del músculo sóleo de un ratón *mdx*. Las realizaciones E y F son, respectivamente, un trazo de corriente de un solo canal y un histograma de amplitud de RyR1 del músculo sóleo de un ratón *mdx* tratado con JTV-519.
- En la figura 5, las realizaciones A y B son, respectivamente, inmunotransferencias de RyR1, RyR1- pSer²⁸⁴³, y calstabina-1 asociada a RyR1 en ratones *mdx* y ratones naturales; y gráficos de barras de las cantidades relativas de RyR1-pSer²⁸⁴³ y calstabina-1 en ratones *mdx* y naturales.
- En la figura 6, las realizaciones A, B, y C demuestran que una pérdida de Ca²⁺ RS es detectable en los músculos esqueléticos de animales con insuficiencia cardíaca. Las realizaciones A y B son imágenes de barrido lineal de fluorescencia de trazas de Ca²⁺ en miofibras de, respectivamente, ratas del grupo quirúrgico de referencia y post-infarto de miocardio (PIM). La realización C proporciona gráficos de barras que resumen la amplitud, tiempo de subida, FDHM, y FWHM de las trazas de Ca²⁺ para las ratas del grupo quirúrgico de referencia (símbolos abiertos) y PIM (símbolos cerrados).
- 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.
- En la figura 8, las realizaciones A y B demuestran la hiperfosforilación por PKA y la deficiencia de calstabina-1 de los canales RyR1 después de ejercicio mantenido. La realización A son inmunotransferencias de RyR1, RyR1-pSer²⁸⁴⁴, RyR1-pSer²⁸⁴⁹, y calstabina-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.
- 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 - pSer²⁸⁴⁴ 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.
- 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.
- 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 es un gráfico de concentración-respuesta que muestra el porcentaje de inhibición de corriente de hERG después de la aplicación de ARM 107 a varias concentraciones.
- La figura 13 es un gráfico de concentración-respuesta que muestra el porcentaje de inhibición de corriente de hERG después de la aplicación de JTV-519 ("ARM00X") a varias concentraciones.

Descripción detallada de la invención

- 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 los expertos en la técnica, y la referencia a "el polipéptido FKBP12.6" es una referencia a uno o más polipéptidos

FKBP12.6 (también denominado calstabilina-2) y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc.

5 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.

Como se usa en el presente documento, el término "compuestos RyCal" se refiere a compuestos de la fórmula I-k general, como se proporciona por la invención, y denominados en el presente documento "compuesto(s) de la invención".

10 Los compuestos de la invención se denominan usando un sistema de nomenclatura numérico, proporcionándose en el presente documento los números de compuesto de 1 a 123. Estos compuestos numerados se denominan usando el prefijo "S" o bien el prefijo "ARM". Por tanto, el primer compuesto numerado se denomina "S1" o bien "ARM001", el segundo compuesto numerado se denomina "S2" o bien "ARM002", el tercer compuesto numerado se denomina "S3" o bien "ARM003", etc. Los sistemas de nomenclatura "S" y "ARM" se usan de manera intercambiable en toda la memoria descriptiva, los dibujos y las reivindicaciones.

15 El término "alquilo" como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, y neohexilo. El término "alquilo C₁-C₄" se refiere a un radical alcano (hidrocarburo) de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, e isobutilo.

20 El término "alqueno" como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. En una realización, el alqueno tiene uno o dos dobles enlaces. El resto de alqueno puede existir en la conformación E o Z y los compuestos de la presente invención incluyen ambas conformaciones.

25 El término "alquino" como se usa en el presente documento se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono.

El término "arilo" como se usa en el presente documento se refiere a un grupo aromático que contiene de 1 a 3 anillos aromáticos, condensados o unidos.

30 El término "grupo cicloalquilo" como se usa en el presente documento se refiere a un anillo de carbono saturado o parcialmente insaturado de tres a siete miembros. Cualquier posición de anillo adecuada del grupo cicloalquilo puede estar unida covalentemente a la estructura química definida. Los grupos cicloalquilo ejemplares incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

El término halógeno, tal como se usa en el presente documento, se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

35 El término "grupo heterocíclico" o "heterocíclico" o "heterocidilo" o "heterociclo" como se usa en el presente documento se refiere a grupos cíclicos incluyendo aromáticos (es decir, "heteroarilo") totalmente saturados, o parcial o totalmente insaturados (por ejemplo, sistemas de anillo monocíclicos de 4 a 7 miembros, bicíclicos de 7 a 11 miembros, o tricíclicos de 10 a 16 miembros) que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo que contiene átomos de carbono. Cada anillo del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede tener 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados de átomos de nitrógeno, átomos de oxígeno y/o átomos de azufre, en los que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y los heteroátomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados. El grupo heterocíclico puede estar unido al resto de la molécula en cualquier heteroátomo o átomo de carbono del anillo o sistema de anillos. Los grupos heterocíclicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, azepanilo, azetidino, aziridino, dioxolanilo, furanilo, furazanilo, homopiperazinilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, piperazinilo, piperidinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazolilo, piridoimidazolilo, piridotiazolilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, quinuclidinilo, tetrahydrofuranilo, tiadiazinilo, tiadiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiomorfolinilo, tiofenilo, triazinilo, y triazolilo. Los grupos heterocíclicos bicíclicos ejemplares incluyen indolilo, isoindolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzotienilo, quinuclidinilo, quinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzopiranilo, indolizino, benzofurilo, benzofurazanilo, cromonilo, coumarinilo, benzopiranilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridinilo (tales como furo[2,3-c]piridinilo, furo[3,2-b]piridinilo) o furo[2,3-b]piridinilo), dihydroisoindolilo, dihydroquinazolinilo (tales como 3,4-dihidro-4-oxo-quinazolinilo), triazinilazepinilo, tetrahydroquinolinilo y similares. Los grupos heterocíclicos tricíclicos ejemplares incluyen carbazolilo, bencidolilo, fenantrolinilo, acridinilo, fenantridinilo, xantenilo y similares.

55 Los términos mencionados anteriormente "alquilo", "alqueno", "alquino", "arilo", "fenilo", "grupo cíclico", "cicloalquilo", "heterocidilo" y "heterociclo" pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes. Los sustituyentes ejemplares incluyen pero no se limitan a uno o más de los siguientes grupos: hidrógeno, halógeno, CF₃, OCF₃, ciano, nitro, N₃, oxo, cicloalquilo, alqueno, alquino, heterociclo, arilo, alquilarilo,

heteroarilo, OR_a , SR_a , $S(=O)R_e$, $S(=O)_2R_e$, $P(=O)_2R_e$, $S(=O)_2OR_a$, $P(=O)_2OR_a$, NR_bR_c , $NR_bS(=O)_2R_e$, $NR_bP(=O)_2R_e$, $S(=O)_2NR_bR_c$, $P(=O)_2NR_bR_c$, $C(=O)OR_a$, $C(=O)R_a$, $C(=O)NR_bR_c$, $OC(=O)R_a$, $OC(=O)NR_bR_c$, $NR_bC(=O)OR_a$, $NR_dC(=O)NR_bR_c$, $NR_dS(=O)_2NR_bR_c$, $NR_dP(=O)_2NR_bR_c$, $NR_bC(=O)R_a$, o $NR_bP(=O)_2R_e$, en los que R_a es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alquilarilo, heteroarilo, heterociclo, o arilo; R_b , R_c y R_d son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alquilarilo, heteroarilo, heterociclo, arilo, o dichos R_b y R_c junto con el N al que están unidos forman opcionalmente un heterociclo; y R_e es alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, alquilarilo, heteroarilo, heterociclo, o arilo. En los sustituyentes ejemplares mencionados anteriormente, los grupos tales como alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquenilo, alquilarilo, heteroarilo, heterociclo y arilo pueden estar por sí mismos opcionalmente sustituidos.

El término "nitrógeno cuaternario" se refiere a un átomo de nitrógeno cargado positivamente tetravalente que incluye, por ejemplo, el nitrógeno cargado positivamente en un grupo tetraalquilamonio (por ejemplo, tetrametilamonio, N-metilpiridinio), el nitrógeno cargado positivamente en una especie de amonio protonada (por ejemplo, trimetilhidroamonio, N-hidropiridinio), el nitrógeno cargado positivamente en amina-N-óxidos (por ejemplo, N-metil-morfolin-N-óxido, piridin-N-óxido), y el nitrógeno cargado positivamente en un grupo N-amino-amonio (por ejemplo, N-aminopiridinio).

En toda la memoria descriptiva, a menos que conste de otro modo, el nitrógeno en el anillo de benzotiazepina de los compuestos de la presente invención puede ser opcionalmente un nitrógeno cuaternario.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en su forma tautómera. Todas estas formas tautómeras están contempladas en el presente documento como parte de la presente invención.

Todos los estereoisómeros de los compuestos de la presente invención (por ejemplo, lo que pueden existir debido a carbonos asimétricos en varios sustituyentes), incluyendo formas enantiómeras y formas diastereómeras, están contemplados dentro del alcance de la presente invención. Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la invención pueden estar, por ejemplo, sustancialmente libres de otros isómeros (por ejemplo, como un isómero óptico puro o sustancialmente puro que tiene una actividad especificada), o pueden estar mezclados, por ejemplo, como racematos o con todos los demás estereoisómeros, o con otros estereoisómeros seleccionados. Los centros quirales de la presente invención pueden tener la configuración S o R como se define por las recomendaciones de 1974 de la IUPAC. Las formas racémicas se pueden resolver por procedimientos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccional, separación, o cristalización de derivados diastereoméricos o separación por cromatografía en columna quiral. Los isómeros ópticos individuales se pueden obtener a partir de los racematos por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo sin limitación, procedimientos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de sales con un ácido ópticamente activo seguido de cristalización.

Preferentemente, los compuestos de la presente invención se aíslan y se purifican, 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. Dichos compuestos "sustancialmente puros" de la presente invención se contemplan también en el presente documento como parte de la presente invención.

Se contemplan todos los isómeros configuracionales de los compuestos de la presente invención, en mezcla o bien en forma pura o sustancialmente pura. La definición de los compuestos de la presente invención abarca los isómeros de alqueno tanto cis (Z) como trans (E), así como los isómeros cis y trans de anillos heterocíclicos y de hidrocarburo cíclicos.

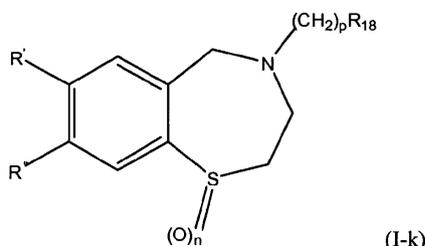
En toda la memoria descriptiva, se pueden elegir los grupos y sustituyentes de los mismos para proporcionar restos y compuestos estables.

La presente invención proporciona compuestos que pueden 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 compuestos que pueden 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 RyR 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 cardíacos incluyen, pero no se limitan a, trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular; trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio; muerte de origen cardíaco súbita; 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 incluyen y los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio incluyen, pero no se limitan a, 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 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.

Compuestos

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de fórmula I-k:



5 en la que R' y R'' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, -OH, -NH₂, -NO₂, -CN, -CF₃, -OCF₃, -N₃, -SO₃H, -S(=O)₂alquilo, -S(=O)alquilo, -OS(=O)₂CF₃, acilo, alquilo, alcoxilo, alquilamino, alquiltio, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, alquenilo, alquinilo, (hetero)arilo, (hetero)ariltio, y (hetero)arilamino; y en la que cada acilo, alquilo, alcoxilo, alquilamino, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, alquenilo, alquinilo, (hetero)arilo, (hetero)ariltio puede estar sustituido o no sustituido;

10 R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en -(C=O)OR₁₅, -OR₁₅, alquilo, arilo, en la que cada alquilo, arilo, puede estar sustituido o no sustituido;

15 R₁₅ y R₁₆ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, acilo, alquenilo, alcoxilo, OH, NH₂, alquilo, alquilamino, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, heterociclilo, y heterocicilalquilo; en la que cada acilo, alquenilo, alcoxilo, alquilo, alquilamino, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, heterociclilo, y heterocicilalquilo puede estar opcionalmente sustituido; y opcionalmente R₁₅ y R₁₆ junto con el N al que están unidos pueden formar un heterociclo que puede estar sustituido; en la que p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10;

y n es 0, 1 o 2;

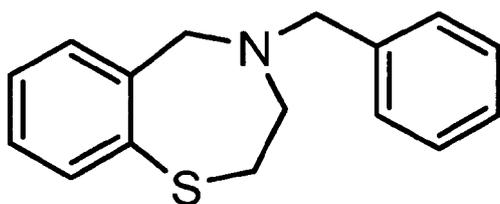
20 y enantiómeros, diastereómeros, tautómeros, sales, hidratos, solvatos, y complejos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos de fórmula I-k, en la que R' y R'' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, -OH, OMe, -NH₂, -NO₂, -CN, -CF₃, -OCF₃, -N₃, -S(=O)₂C₁-C₄alquilo, -S(=O)-alquilo C₁-C₄, -S-alquilo C₁-C₄, -OS(=O)₂CF₃, Ph, -NHCH₂Ph, -C(=O)Me, -OC(=O)Me, morfolinilo y propenilo; y n es 0, 1 o 3. En algunos casos, R' es H o OMe, y R'' es H.

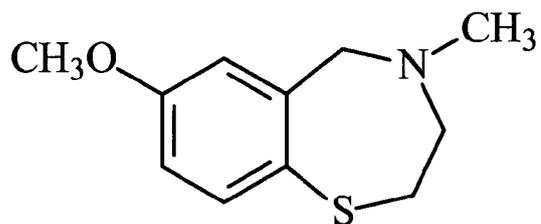
25 En otras realizaciones, la presente invención proporciona compuestos de fórmula I-k, en la que R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en -(C=O)OR₁₅, -OR₁₅, alquilo, arilo, y en la que cada alquilo y arilo puede estar sustituido o no sustituido. En algunos casos, m es 1, y R₁₈ es Ph, C(=O)OMe, C(=O)OH, aminoalquilo, NH₂, NHOH, o NHCbz. En otros casos, m es 0, y R₁₈ es alquilo C₁-C₄, tal como Me, Et, propilo, y butilo.

Los compuestos de fórmula I-k tratan y evitan trastornos y enfermedades asociados con los RyR.

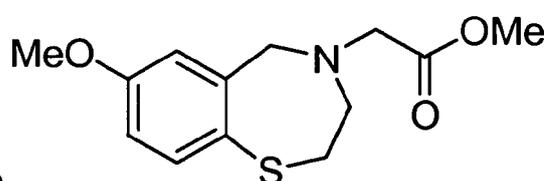
30 Los ejemplos de dichos compuestos incluyen, sin limitación, S84, S107, S110, S111, S120, y S121. Estos compuestos tienen las siguientes estructuras:



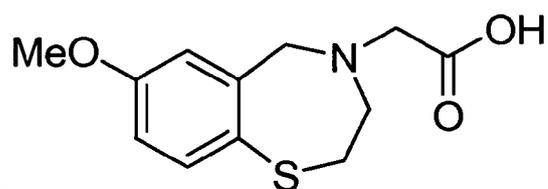
S84



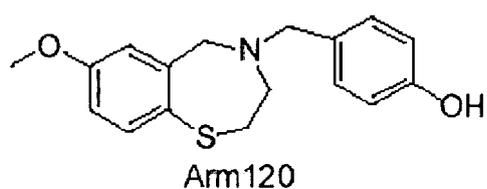
S107



S110

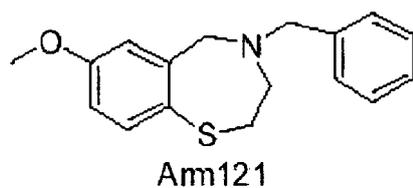


S111



Am120

S120



Am121

S121

Rutas de actividad

5 Los compuestos de la invención, tales como los compuestos de fórmula I-k, reducen la probabilidad de apertura de RyR incrementando la afinidad de FKBP12 (calstabina-1) y FKBP12.6 (calstabina-2) para, respectivamente RyR1

- fosforilado por PKA y RyR2 fosforilado por PKA. Además, los compuestos de la invención normalizan el paso de los canales de RyR mutantes, incluyendo canales de RyR2 mutantes asociados a TVPC, incrementando la afinidad de unión a FKBP12 (calstabina-1) y FKBP12.6 (calstabina-2). Por lo tanto, los compuestos de la invención evitan 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 cardíacos incluyen, pero no se limitan a, trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular; trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio; muerte de origen cardíaco súbita; 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 incluyen y los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio incluyen, pero no se limitan a, 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 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. Los compuestos de la invención tratan estos trastornos y afecciones incrementando la afinidad de unión a FKBP12 (calstabina-1)-RyR1 e incrementando la afinidad de unión a FKBP12.6 (calstabina-2)-RyR2.
- Los compuestos de la invención se pueden usar para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP (calstabina) 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 (calstabina-1) como FKBP12.6 (calstabina-2). Por lo tanto, "FKBP unida a RyR" se refiere a FKBP 12 unida a RyR1 (calstabina-1), FKBP 12.6 unida a RyR2 (calstabina-2), y FKBP 12 unida a RyR3 (calstabina-1).
- 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 (calstabina-1) en el caso de RyR1 y RyR3, y FKBP12.6 (calstabina-2) en el caso de RyR2 (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.
- Como se usa en el presente documento, "FKBP" incluye tanto una "proteína FKBP" como un "análogo de FKBP", tanto si es FKBP 12 (calstabina-1) o FKBP 12.6 (calstabina-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 (calstabina-1) o FKBP12.6 (calstabina-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 (calstabina-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 (calstabina-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 (calstabina-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".
- De acuerdo con el uso de los compuestos de la presente invención, 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 poliacrilamida). 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-k, (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 uso de los compuestos de la presente invención. En otra realización, el nivel de RyR fosforilado disminuye al menos en un 20 %.

Los sujetos que se pueden someter a prueba 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

Los compuestos de la invención se formulan 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 compuestos de fórmula I-k, 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 arábica, lactosa, estearato de magnesio, metilcelulosa, polvos, solución salina, alginato de sodio, sacarosa, almidón, talco y agua, entre otros.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se preparan por procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, los compuestos de fórmula I-k se mezclan 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.

Los compuestos de fórmula I-k se administran a un sujeto poniendo en contacto las células objetivo (por ejemplo, células miocárdicas) *in vivo* en el sujeto con los compuestos. Los compuestos están 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) los compuestos 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 los compuestos de la invención directamente a las células, por inyección o por algún otro medio (por ejemplo, introduciendo los compuestos 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, los compuestos de la presente invención se administran 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. Los compuestos de la invención se administran por vía parenteral, por inyección epifascial, intracapsular, intracraneal, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, 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 de los compuestos 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), los compuestos de la invención se combinan 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, los compuestos de la invención se combinan 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 uno o más de los compuestos de fórmula I-k, como se describe en el presente documento. 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, por ejemplo una arritmia.

De acuerdo con el uso de los compuestos de la presente invención, los compuestos de fórmula I-k se administran 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 de los compuestos 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 de compuestos 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 compuestos para una nueva variedad de tratamientos terapéuticos para pacientes con varios trastornos que implican modulación de los RyR, en particular trastornos del músculo esquelético (RyR1), trastornos cardíacos (RyR2) y trastornos cognitivos (RyR3).

En una realización de la presente invención, el sujeto aún no ha desarrollado un trastorno, tal como trastornos cardíacos (por ejemplo, arritmia cardíaca inducida por ejercicio). En otra realización de la presente invención, el sujeto necesita tratamiento para un trastorno, incluyendo un trastorno cardíaco.

Varios trastornos que los compuestos de la invención tratan o evitan incluyen, pero no se limitan a, 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 incluyen, pero no se limitan a, trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular; trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio; muerte de origen cardíaco súbita; 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 incluyen y los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio incluyen, pero no se limitan a, 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 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. 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.

La cantidad de compuestos de la invención eficaz para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR2 en el sujeto es una cantidad eficaz para evitar la arritmia cardíaca inducida por ejercicio en el sujeto. La arritmia cardíaca es una alteración de la actividad eléctrica del corazón que se manifiesta como una anomalía en la frecuencia cardíaca o en el ritmo del corazón. Como se usa en el presente documento, una cantidad de compuestos de la invención "eficaz para evitar la arritmia cardíaca inducida por ejercicio" incluye una cantidad de compuestos de fórmula I-k, eficaz para evitar el desarrollo de impedimento clínico o síntomas de la arritmia cardíaca inducida por ejercicio (por ejemplo, palpitaciones, desmayo, fibrilación ventricular, taquicardia ventricular y muerte súbita de origen cardíaco). La cantidad de los compuestos eficaces para evitar la arritmia cardíaca inducida por ejercicio en un sujeto variará dependiendo de los factores particulares de cada caso, incluyendo el tipo de arritmia cardíaca inducida por ejercicio, el peso del sujeto, la gravedad de la afección del sujeto y el modo de administración de los compuestos. Esta cantidad se determina fácilmente por el experto en la técnica, basándose en procedimientos conocidos, incluyendo ensayos clínicos, y procedimientos divulgados en el presente documento. En una realización, la cantidad de los compuestos de la invención eficaz para evitar la arritmia cardíaca inducida por ejercicio es una cantidad eficaz para evitar la muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio en el sujeto. En otra realización, los compuestos de la invención evitan la arritmia cardíaca inducida por ejercicio y la muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio en el sujeto.

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, los compuestos de la invención también son útiles 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, los compuestos de fórmula I-k, son eficaces para limitar o evitar una disminución adicional en el nivel de FKBP unida a RyR en el sujeto.

Adicionalmente, el sujeto de la presente invención es un candidato para trastornos cardíacos inducidos por ejercicio, tales como la arritmia cardíaca inducida por ejercicio. La arritmia cardíaca inducida por ejercicio es una afección del corazón (por ejemplo, una fibrilación ventricular o taquicardia ventricular, incluyendo cualquiera que dé lugar a muerte súbita de origen cardíaco) que se desarrolla durante/después de que un sujeto se haya sometido a ejercicio físico. Un "candidato" para un trastorno cardíaco inducido por ejercicio es un sujeto que se sabe que está, o que se cree que puede estar, o que se sospecha que está, en riesgo de desarrollar un trastorno cardíaco durante/después del ejercicio físico. Los ejemplos de candidatos para la arritmia cardíaca inducida por ejercicio incluyen, sin limitación, un animal/persona que se sabe que tiene taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC); un animal/persona que se sospecha que tiene TVPC; y un animal/persona que se sabe que está, o que se cree que puede estar, o que se sospecha que está, en riesgo de desarrollar una arritmia cardíaca durante/después del ejercicio físico, y que está a punto de realizar ejercicio, que está actualmente realizando ejercicio o que acaba de finalizar el ejercicio. Como se analiza anteriormente, la TVPC es un trastorno hereditario en individuos con corazones estructuralmente normales. Se caracteriza por taquicardia ventricular inducida por estrés (una arritmia letal que provoca la muerte súbita de origen cardíaco). En sujetos con TVPC, el ejercicio físico y/o el estrés inducen taquicardias ventriculares bidireccionales y/o polimórficas que dan lugar a muerte súbita de origen cardíaco (MSC) en ausencia de cardiopatía estructural detectable. Los individuos con TVPC tienen arritmias ventriculares cuando se someten a ejercicio, pero no desarrollan arritmias en reposo.

En consecuencia, en otra realización más de la presente invención, el sujeto ha estado realizando ejercicio, o está actualmente realizando ejercicio, y ha desarrollado un trastorno inducido por ejercicio. En este caso, la cantidad de los compuestos de la invención eficaz para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP unida a RyR en el sujeto es una cantidad de compuesto eficaz para tratar el trastorno inducido por ejercicio en el sujeto. Como se usa en el presente documento, una cantidad de compuestos de la invención "eficaz para tratar un trastorno inducido por ejercicio" incluye una cantidad de un compuesto de fórmula I-k eficaz para aliviar o mejorar el impedimento clínico o síntomas del trastorno inducido por ejercicio (por ejemplo, en el caso de arritmia cardíaca, palpitaciones, desmayo, fibrilación ventricular, taquicardia ventricular, y muerte súbita de origen cardíaco). La cantidad de los compuestos de la invención eficaz para tratar un trastorno inducido por ejercicio en un sujeto variará dependiendo de los factores particulares de cada caso, incluyendo el tipo de trastorno inducido por ejercicio, el peso del sujeto, la gravedad de la afección del sujeto y el modo de administración de los compuestos. Esta cantidad se determina fácilmente por el experto en la técnica, basándose en procedimientos conocidos, incluyendo ensayos clínicos, y procedimientos divulgados en el presente documento. En una realización, los compuestos de fórmula I-k, tratan trastornos inducidos por ejercicio en el sujeto.

La presente invención proporciona además compuestos para tratar trastornos inducidos por ejercicio en un sujeto. El procedimiento comprende administrar los compuestos de fórmula I-k, al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el trastorno inducido por ejercicio en el sujeto. Una cantidad adecuada de los compuestos eficaz para tratar, por ejemplo, la arritmia cardíaca inducida por ejercicio en el sujeto varía desde aproximadamente 5 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. La presente invención también proporciona un procedimiento para evitar un trastorno inducido por ejercicio en un sujeto. El procedimiento comprende administrar los compuestos de la invención al sujeto en una cantidad eficaz para evitar el trastorno inducido por ejercicio en el sujeto. Una cantidad adecuada de los compuestos de la invención eficaz para evitar el trastorno inducido por ejercicio en el sujeto varía desde aproximadamente 5 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. Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para evitar trastornos inducidos por ejercicio en un sujeto. El procedimiento comprende administrar los compuestos de la invención al sujeto en una cantidad eficaz para evitar un trastorno inducido por ejercicio en el sujeto. Una cantidad adecuada de los compuestos de la invención eficaz para evitar un trastorno inducido por ejercicio en el sujeto varía desde aproximadamente 5 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.

Adicionalmente, los compuestos evitan trastornos de ritmo cardíaco irregular en sujetos con defectos de heterocigotos en el gen FKBP 12.6.

Los compuestos de fórmula I-k, se pueden usar solos, en combinación entre sí, o en combinación con otros agentes que tienen una actividad cardiovascular incluyendo pero sin limitarse a, diuréticos, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, antiarrítmicos, agentes inotrópicos, agentes cronotrópicos, α y β bloqueantes, inhibidores de la angiotensina y vasodilatadores. Además, dichas combinaciones de los compuestos de la presente invención y otros agentes cardiovasculares se administran por separado o juntos. Además, la administración de un elemento de la combinación es anterior a, simultánea a o posterior a la administración del/de los otro(s) agente(s).

En varias realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la arritmia cardíaca inducida por ejercicio en el sujeto está asociada con la VT. En algunas realizaciones, la TV es TVPC. En otras realizaciones de estos procedimientos, el sujeto es un candidato para arritmia cardíaca inducida por ejercicio, incluyendo candidatos para muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio.

5 La presente invención también proporciona compuestos para su uso 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 compuestos para su uso en un procedimiento para tratar o evitar un trastorno muscular en un sujeto. Además, la presente invención proporciona compuestos para su uso en un procedimiento para tratar o evitar trastornos musculares inducidos por ejercicio en un sujeto.

10 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 FKPB12.6 unida a RyR2 en células miocárdicas, son útiles en la regulación de varios acontecimientos biológicos
15 asociados con RyR, incluyendo acoplamiento de EC y contractilidad.

Por lo tanto, en una realización específica, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular o arritmia cardíaca inducida por ejercicio, que comprende administrar a un animal que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado de los compuestos de fórmula I-k.

20 La pérdida intracelular de Ca^{2+} se propone como un mediador principal del rendimiento muscular deprimido y de la remodelación muscular distrófica. Las miodistrofias son enfermedades hereditarias heterogéneas caracterizadas por debilidad y atrofia muscular progresiva. De todas las formas de miodistrofias que implican el complejo de proteína asociada a distrofia (denominadas distrofinopatías), la miodistrofia de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades genéticas más frecuentes (ligada al cromosoma X; 1 de cada 3.500 niños) con produciéndose la muerte
25 normalmente antes de los 30 años por insuficiencia respiratoria y/o cardíaca en un gran número de pacientes. La miodistrofia de Becker (BMD) representa una forma más leve de la enfermedad asociada con una reducción en la cantidad o expresión de una forma truncada de la proteína distrofina mientras que los pacientes con Duchenne se han caracterizado por la completa ausencia o por niveles muy bajos de distrofina. Las miodistrofias de Duchenne y de Becker (DMD/BMD) están provocadas por mutaciones en el gen que codifica la proteína citoesquelética de 427
30 kDa distrofina. Sin embargo, con el aumento de la edad en BMD los síntomas cardíacos son más comunes que en pacientes con DMD y no se correlacionan con los síntomas del músculo esquelético. Puesto que la detección genética no será eliminativa de DMD debido a la alta incidencia de casos esporádicos, es altamente deseable un tratamiento eficaz. DMD/BMD han estado asociados consistentemente con la alteración en el metabolismo del calcio intracelular. Debido a alteraciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en DMD se cree que las miofibras
35 representan un mecanismo patógeno central, es altamente deseable el desarrollo de una intervención terapéutica que evite anomalías intracelulares de Ca^{2+} como causa de la degeneración del músculo esquelético.

Está bien establecido que la ausencia de expresión de distrofina es el principal defecto genético en DMD y BMD. Sin embargo, el mecanismo clave que da lugar a un daño muscular progresivo es en gran medida desconocido. Se ha sugerido que las elevaciones de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) bajo condiciones de reposo
40 contribúan directamente al daño de células musculares (miofibras) tóxicas y a la activación simultánea de proteasas dependientes de Ca^{2+} . Puesto que la actividad de la calpaína se incrementa en fibras musculares necróticas de ratones *mdx* y la disfunción de la calpaína contribuye a la miodistrofia de cintura y extremidades, la prevención de la activación de las proteasas dependientes de calcio inhibiendo las elevaciones intracelulares de Ca^{2+} representa una estrategia para evitar la atrofia muscular en DMD. Se ha informado de diferencias significativas en $[Ca^{2+}]_i$ entre
45 músculos normales y distróficos en miotubos y modelos animales incluyendo el ratón *mdx* deficiente en distrofina. Las elevaciones intracelulares de Ca^{2+} se evitan por la administración de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I-k.

La presente invención también proporciona compuestos para un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento: obtener una muestra de célula o tejido del sujeto;
50 obtener ADN de la célula o tejido; comparar el ADN de la célula o tejido con un ADN de control que codifica el RyR para determinar si está presente una mutación en el ADN de la célula o tejido, indicando la presencia de una mutación una enfermedad o trastorno. En una realización, la mutación es una mutación de RyR2 en el cromosoma Iq42-q43. En otra realización, es mutación es una o más mutaciones de TVPC. En otra realización, la mutación puede ser una mutación que está presente en el ADN que codifica el RyR2 de un sujeto con SIDS. El procedimiento de diagnóstico se usa para detectar la presencia de una enfermedad o trastorno en un adulto, un niño o un feto. La enfermedad y los trastornos incluyen, pero no se limitan a, 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 incluyen, pero no se limitan a, trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular; trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio; muerte de origen cardíaco súbita; muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio; insuficiencia
60 cardíaca congestiva; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; y tensión arterial alta. Los trastornos y enfermedades

de ritmo cardíaco irregular incluyen y los trastornos y enfermedades de ritmo cardíaco irregular inducidos por ejercicio incluyen, pero no se limitan a, 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 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.

Procedimientos de síntesis

La presente invención, proporciona, en otro aspecto, procedimientos para la preparación de un compuesto de fórmula I-k, y sales, solvatos, hidratos, complejos, y profármacos del mismo, y sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos. Más en particular, la presente invención proporciona procedimientos para la preparación de compuestos seleccionados del grupo que consiste en S84, S107 S110, S111, S120, y S121 y sales, solvatos, hidratos, complejos, y profármacos de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos. Las diversas rutas sintéticas para los compuestos se describen en el presente documento.

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 (CH_2Cl_2), cloroformo (CCl_4), formaldehído (CH_2O) o metanol (CH_3OH). 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 $20\text{ }^\circ\text{C}$ - $25\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, etc.).

Algunas de las siguientes síntesis utilizan el compuesto S68 como material de partida. S68 está disponible comercialmente de MicroChemistry Ltd. (Moscow, Rusia). Véase también el documento WO 01/55118 para la preparación de S68.

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

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.

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 $20\text{ }^\circ\text{C}$ - $25\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, $100\text{ }^\circ\text{C}$, etc.).

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

S84 se prepara a partir de S68 por reacción con bromuro de bencilo. En una realización, la reacción tiene lugar en un disolvente, tal como un disolvente orgánico como cloruro de metileno. Se añade un catalizador básico tal como trietilamina según sea necesario para catalizar la reacción. La mezcla de reacción formada mezclando los reactivos y el disolvente se purifica para proporcionar S84.

S107 se puede preparar a partir de S26 como sigue. A una solución de S26 en un disolvente (tal como MeOH), se añaden formaldehído (CH_2O) y cianoborohidruro de sodio (NaBCNH_3) y se deja reaccionar. Preferentemente, la mezcla de reacción se mantiene a aproximadamente pH 4-5, por ejemplo por adición de unas pocas gotas de HCl 1 N. A continuación, se retiran los disolventes, por ejemplo a presión reducida. Si fuera necesario, se puede disolver el residuo en acetato de etilo y lavar con una o más de una solución básica (por ejemplo NaOH), y agua. Los disolventes se pueden retirar, y el producto se puede purificar adicionalmente, por ejemplo usando cromatografía en columna de SiO_2 .

S110 se puede preparar como sigue. Se hace reaccionar una mezcla de S26, 1-bromoacetato de metilo y piridina en DMF durante una cantidad adecuada de tiempo. A esta mezcla, se le añade acetato de etilo y, si fuera necesario, se lava la mezcla de reacción con una solución básica (por ejemplo NaHCO_3), o agua. El producto S110, como un aceite, se puede purificar, por ejemplo por cromatografía en columna de SiO_2 .

5 S111 se puede preparar como sigue. Se añade una base (tal como NaOH 1 N) a S110 en un disolvente (tal como MeOH), y la mezcla se deja que reaccione durante una cantidad adecuada de tiempo. A continuación, se retiran los disolventes, por ejemplo a presión reducida, y después el residuo se puede disolver en una solución acuosa, tal como agua. La fase acuosa se puede lavar con acetato de etilo y acidificarse, por ejemplo con HCl 1 N, hasta un pH de aproximadamente 4. A continuación se pueden retirar los disolventes, por ejemplo a presión reducida, para producir S111 en bruto. Se puede retirar el NaCl usando un alcohol, tal como etanol, para proporcionar S111 puro como un sólido.

15 S120 se puede sintetizar como sigue. Se hace reaccionar una mezcla de S26, bromuro de bencilo y Na_2CO_3 en un disolvente (tal como DMF), durante una cantidad adecuada de tiempo, preferentemente durante la noche. Se añade acetato de etilo a la reacción y a continuación, si fuera necesario, se lava la reacción con un disolvente adecuado, por ejemplo con H_2O (4x10 ml). La fase orgánica se puede concentrar, por ejemplo a presión reducida, y el residuo se puede purificar, por ejemplo por cromatografía en columna para dar S121.

S121 se puede sintetizar como S120, pero usando bromuro de 4-OH-bencilo en lugar de bromuro de bencilo.

20 Cabe destacar que los compuestos usados como materiales de partida para, o generados como intermedios en, la síntesis de los compuestos de la invención, pueden por sí mismos tener estructuras englobadas por las fórmulas de la invención, y/o pueden por sí mismos ser agentes activos útiles en los procedimientos y composiciones de la presente invención. Dichos materiales de partida e intermedios pueden ser útiles para, entre otros, tratar o evitar varios trastornos y enfermedades asociados con los RyR tales como trastornos musculares y cardíacos, tratar o evitar una pérdida en un RyR2 en un sujeto, o modular la unión de RyR y FKBP en un sujeto. La presente invención engloba cualquiera de los materiales de partida o intermedios divulgados en el presente documento que tienen

25 estructuras englobadas por la fórmula I-k, y/o que son útiles como agentes activos en los procedimientos y composiciones de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, el compuesto S68, que es útil como material de partida para la síntesis de compuestos S84, se puede usar para, entre otros, tratar o evitar varios trastornos y enfermedades asociados con los RyR, tratar o evitar una pérdida en un RyR2, o modular la unión de RyR y FKBP en un sujeto.

30 En otra realización, el compuesto S26, que es útil en la síntesis de muchos de los compuestos descritos en el presente documento se puede usar para, entre otros, tratar o evitar varios trastornos y enfermedades asociados con los RyR, tratar o evitar una pérdida en un RyR2, o modular la unión de RyR y FKBP en un sujeto.

Los compuestos de la presente invención se preparan en formas diferentes, tales como sales, hidratos, solvatos y complejos.

35 El término "compuesto(s) de la invención" como se usa en el presente documento quiere decir un compuesto de fórmula I-k, y sales, hidrato y solvatos del mismo.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de uno o más compuestos descritos en el presente documento, o sales o hidratos farmacéuticamente aceptables, 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.

40

Un compuesto de la presente invención también se puede formular como una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, sal de adición de ácido y complejos del mismo. La preparación de dichas sales puede facilitar el uso farmacológico alterando las características físicas del agente sin evitar su efecto fisiológico. Los ejemplos de alteraciones útiles en las propiedades físicas incluyen, pero no se limitan a, disminución del punto de fusión para facilitar la administración transmucosa e incremento de la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones más altas del fármaco.

45

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.

50 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 cualquier compuesto básico representado por la fórmula I-k, o cualquiera de sus intermedios. 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. Se pueden

55

- 5 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 de fórmula I-k, 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 de los compuestos de la invención para uso de laboratorio o para la conversión posterior a una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.
- 10 Los compuestos de la presente invención forman hidratos o solvatos, que están incluidos en el alcance de las reivindicaciones. Cuando los compuestos de la presente invención existen como regioisómeros, isómeros configuracionales, confórmicos o formas diastereoisómeras, todas estas formas y varias mezclas de las mismas están incluidas en el alcance de la fórmula I-k. Es posible aislar isómeros individuales usando procedimientos de separación y purificación conocidos, si se desea. Por ejemplo, cuando un compuesto de la presente invención es un racemato, el racemato se puede separar en el compuesto (S) y el compuesto (R) por resolución óptica. Los isómeros ópticos individuales y mezclas de los mismos están incluidos en el alcance de la fórmula I-k.
- 15 El término "solvato" como se usa en el presente documento quiere decir un compuesto de fórmula I-k, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el 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".
- 20 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 del compuesto de fórmula I-k, que es "terapéuticamente eficaz" y que evita o sustancialmente atenúa efectos secundarios no deseados.
- 25 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 recibe tratamiento.
- 30 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.
- 35 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 BBr_3 . A continuación, se vuelve a metilar el compuesto fenol resultante con un agente de metilación radiomarcado (tal como sulfato de ^3H -dimetilo) en presencia de una base (tal como NaH) para proporcionar compuestos marcados con ^3H .
- 40 La presente invención proporciona además compuestos que se pueden clasificar como 1,4-benzotiazepinas, incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, S84, S107, S110, S111, S120, y S121.
- Estos y otros compuestos de la presente invención están asociados con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se describe anteriormente, para formar una composición farmacéutica.
- 45 La disminución en el nivel de FKBP unida a RyR se limita o se evita en el sujeto disminuyendo el nivel de RyR fosforilado en el sujeto. En una realización, la cantidad del agente eficaz para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP 12.6 unida a RyR2 en el sujeto es una cantidad del agente eficaz para tratar o evitar la insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular y/o arritmia cardíaca inducida por ejercicio en el sujeto. En otra realización, la cantidad del agente eficaz para limitar o evitar una disminución en el nivel de FKBP 12.6 unida a RyR2 en el sujeto es una cantidad del agente eficaz para evitar la muerte súbita de origen cardíaco en el sujeto.
- 50 En vista de lo anterior, la presente invención proporciona además compuestos para un procedimiento para tratar o evitar la arritmia cardíaca inducida por ejercicio en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto de 1,4-benzotiazepina, como se divulga en el presente documento, en una cantidad eficaz para tratar o evitar la arritmia cardíaca inducida por ejercicio en el sujeto. De forma similar, la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir la muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto de 1,4-benzotiazepina, como se divulga en el presente documento, en una cantidad eficaz para evitar la muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio en el sujeto. Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o evitar la fibrilación auricular o la insuficiencia cardíaca en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un compuesto, como se divulga en el presente documento, en una cantidad eficaz
- 55

para tratar o evitar la fibrilación auricular o la insuficiencia cardíaca en el sujeto. En cada uno de estos procedimientos, el compuesto se selecciona del grupo de compuestos que consiste en compuestos de la fórmula I-k y sales, hidratos, solvatos y complejos del mismo.

Los ejemplos de dichos compuestos incluyen, sin limitación, S84, S107, S110, S111, S120 y S121.

5 Demostraciones de eficacia

En la figura 1, las realizaciones A, B, y C muestran 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 mientras que la realización B muestra RyR2-P2328S. La realización C muestra un análisis de inmunotransferencia de unión a calstabin-2 de RyR2-P2328S.

- 10 Como se demuestra por la figura 2, realizaciones A y B, el tratamiento con JTV-519 reduce la fosforilación por PKA de RyR2 en ratones con insuficiencia cardíaca. Las cantidades equivalentes de RyR2 se inmunoprecipitan con un anticuerpo frente a RyR2 (transferencia superior). Las inmunotransferencias representativas (realización A) y gráficos de barras (realización B) muestran la cantidad de RyR2 fosforilado por PKA en Ser-2808 unida a RyR2 en ratones naturales y con calstabin-2(FKBP12.6)^{+/+}. El tratamiento con JTV-519 (0,5 mg/kg/h) durante 28 días post-
15 infarto de miocardio reduce la fosforilación por PKA de RyR2, supuestamente debido a la remodelación cardíaca inversa, en ratones naturales pero no con calstabin-2 (FKBP12.6)^{+/+}.

- Como se demuestra por la figura 3, realizaciones A y B, los ratones en los que el RyR2 cardíaco no se puede fosforilar por PKA (ratones activados con RyR2-S2808A) tienen una función cardíaca mejorada después de infarto de miocardio. En la realización A se muestra la cuantificación de ecocardiogramas en modo M que muestran una
20 mejora en la fracción de expulsión en ratones activados RyR2-S2808A en comparación con los naturales 28 días después de la ligadura de la arteria coronaria permanente. En las realizaciones B y C se muestran cuantificaciones del bucle presión-volumen que muestran (realización B) una mejora en la contractilidad cardíaca y una disminución en la dilatación cardíaca (realización C) en ratones activados con RyR2- S2808A en comparación con los naturales después de un infarto de miocardio.

- 25 Como se muestra en la figura 4, realizaciones A, B, C, D, y E, el funcionamiento del canal de RyR1 se incrementa y se normaliza en ratones *mdx* (deficientes en distrofina) tratados con JTV-519. En la figura 4, las aberturas de canal están representadas como deflexiones hacia arriba; 'c' indica el estado cerrado; y la amplitud de corriente de 4 pA está indicada por guiones. Los trazos superiores representan 5 s y los trazos inferiores 500 ms; las líneas de puntos indican estados de subconductancia.

- 30 La realización A de la figura 4 muestra un trazo de corriente de un solo canal de RyR1 del músculo sóleo de un ratón de control (natural) bajo condiciones de reposo (Ca^{2+} citoplásmico 150 nM). Como se observa, RyR1 está predominantemente cerrado. La realización C de la figura 4 muestra que la función del canal de RyR1 en un ratón *mdx* muestra un incremento significativo en la probabilidad de apertura, un incremento en la apertura promedio y una
35 disminución en los tiempos de permanencia cerrado promedio, T_o y T_c , respectivamente. El incremento en P_o en ratones *mdx* es consistente con la pérdida intracelular de Ca^{2+} . Los histogramas de amplitud en las realizaciones B, D, y F muestran estados de subconductancia múltiples consistentes con la reducción de calstabin-1 (FKBP 12) en RyR1 del músculo sóleo de *mdx*. La realización E de la figura 4 muestra un ratón *mdx* tratado con JTV-519 1,0 μ M. Como se observa, el ratón tratado con JTV-519 de canales RyR1 demuestra una actividad normal que no es significativamente diferente del trazo de los naturales no tratados, lo que indica de este modo que JTV-519 puede
40 normalizar la función del canal de RyR1 en ratones *mdx*.

Los datos de la figura 4 son consistentes con la pérdida intracelular de Ca^{2+} de RS por medio de los canales de RyR1 como la causa del incremento de la pérdida de Ca^{2+} citosólico en los músculos esqueléticos de ratones *mdx* (deficientes en distrofina).

- 45 En la figura 5, las realizaciones A y B, demuestran que el músculo esquelético de *mdx* tiene niveles normales de fosforilación por PKA de RyR1, pero niveles reducidos de calstabin-1. Las inmunotransferencias en la realización A muestran que los ratones de tipo *mdx* tienen niveles reducidos de calstabin-1 en comparación con el ratón de control (natural). Los gráficos de barras de resumen de la realización B muestran que el ratón *mdx*, no obstante, tiene un nivel equivalente de fosforilación por PFA. Por lo tanto, se concluye que la reducción de calstabin-1 es un defecto que es consistente con la pérdida intracelular de Ca^{2+} observada en células del músculo esquelético de
50 ratones *mdx* y miofibras de vehículos de mutación humanos. Es probable que la pérdida intracelular de Ca^{2+} de RS contribuya a la muerte de miofibras y a la pérdida de masa muscular por sobrecarga intracelular de Ca^{2+} tóxica y a la activación de proteasas.

- La figura 6, realizaciones A, B, y C, demuestra que la pérdida de Ca^{2+} de RS a nivel subcelular en músculos esqueléticos de animales con insuficiencia cardíaca es detectable. La calidad de vida y el pronóstico en pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) disminuye gravemente debido a la disfunción del músculo esquelético (por ejemplo, dificultad para respirar debida a debilidad diafragmática e intolerancia al ejercicio debido a fatiga del músculo esquelético de la extremidad) además de una función cardíaca deprimida.
55

La desregulación de la liberación intracelular de Ca^{2+} RS es un mecanismo patógeno subyacente a la disfunción del músculo esquelético en la IC. La IC en animales provoca que se acelere significativamente la fatiga del músculo esquelético intrínseca.

5 Las realizaciones A y B de la figura 6 son imágenes de barrido lineal de fluorescencia AF/F de ejemplos representativos de trazas de Ca^{2+} en miofibras de ratas del grupo quirúrgico de referencia y post-infarto de miocardio (PIM) y el transcurso temporal de trazas de Ca^{2+} correspondiente. La realización C muestra la distribución relativa de las propiedades espacio-temporales de las trazas de Ca^{2+} . Las gráficas indican 25, 50, 75 percentiles, las líneas horizontales indican el intervalo del 1-99 % de la distribución. Grupo quirúrgico de referencia, símbolos de apertura (n = 137, tres animales); post-infarto de miocardio (PIM), símbolos grises (n = 82, dos animales). *, P < 0,05. FDHM, duración total a una amplitud de pico del 50 %; FWHM, anchura total a una amplitud de pico del 50 %.

10 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 aberturas 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.

15 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 en 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.

20 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 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 Ca^{2+} de RS.

25 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.

30 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 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.

5 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.

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 calstabin-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 Ca²⁺ 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 (± 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 20 rata de animales del grupo quirúrgico de referencia y con insuficiencia cardíaca. Se evaluaron la función muscular u la fosforilación por PKA de RyR1 usando músculos sóleos contralaterales de cada animal.

25 En resumen, la figura 10 proporciona datos que muestran que el ejercicio mantenido provoca la hiperfosforilación por PKA de RyR1 y la reducción de calstabin-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 Ca²⁺ de RS y una aceleración significativa en la fatiga del músculo esquelético.

30 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 histológicos consistentes con la degeneración de miofibras de la sobrecarga intracelular de Ca²⁺ de los canales de RyR1 defectuosos. Por lo tanto, el ejercicio mantenido durante 90 min dos veces al día desencadena un fenotipo 35 distrófico en los músculos EDL de ratones C57B16 normales.

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. Los compuestos de la presente invención presentan un menor nivel de actividad bloqueante de hERG que 45 JTV-519. Por tanto, se espera que los compuestos de la presente invención sean menos tóxicos y/o presenten menos efectos secundarios que JTV-519.

La figura 12 es un gráfico que muestra la dependencia de la concentración del efecto de ARM 107 sobre la corriente de hERG. La tabla 1 proporciona los datos numéricos que se ilustran gráficamente en la figura 12. Debido a que la mayor concentración de ARM107 sometida a prueba dio como resultado una inhibición de corriente menor del 50 %, 50 no fue posible determinar un valor de CI₅₀ para ARM 107.

Tabla 1

ID del artículo de prueba	Cl ₅₀ (µM)	Conc. (µM)	% inhibición de hERG medio	% desviación estándar	% error estándar	n	Datos individuales (% inhibición)
ARM 107	ND	0,01	2,9 %	1,6 %	1,2 %	2	1,7 %
							4,0 %
		0,1	4,0 %	1,2 %	0,9 %	2	3,1 %
							4,8 %
		1	6,2 %	5,9 %	4,2 %	2	2,0 %
							10,4 %
		10	32,1 %	11,1 %	7,9 %	2	24,2 %
							39,9 %

La figura 13 es un gráfico que muestra la dependencia de la concentración del efecto de JTV-519 (referido en la figura como "ARM0XX") sobre la corriente de hERG. La tabla 2 proporciona los datos numéricos que se ilustran gráficamente en la figura 13. El valor de Cl₅₀ para JTV-519 fue de 0,463 µM.

5 Tabla 2

ID del artículo de prueba	Cl 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 %

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 Cl₅₀ de 0,5 µM (n = 6).

10 En resumen, los compuestos de la presente invención presentan una reducción en la actividad bloqueante de hERG en comparación con JTV-519. Por tanto, se espera que los compuestos de la invención sean menos tóxicos y/o presenten menos efectos secundarios que JTV-519.

15 La tabla 3 a continuación proporciona valores de CE₅₀ para los compuestos S4-S107. Los compuestos 4-36 son ejemplos comparativos, tomados del documento WO 2005/094457. Estos datos de CE₅₀ 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) de los compuestos mostrados en la tabla 3. Los valores de CE₅₀ están calculados usando el ajuste de curva de Michaelis-Menten.

Tabla 3

Compuesto N.º:	CE ₅₀ (nM)
4	102
7	55
25	40
26	40
27	ca. 50
36	15
107	190

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^{2+} -release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78:990-97,1996). Se generó FKBP12.6 marcado con ^{35}S usando el sistema de transcripción/traducción TNT™ Quick Coupled de Promega (Madison, WI). Se usó la unión a [^3H] rianodina para cuantificar los niveles de RyR2. Se diluyeron 100 μg de microsomas en 100 μl de tampón de imidazol 10 mM (pH 6,8), incubados con [^{35}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 [^{35}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 $^{2+}$) usando el péptido, CRTRRI-(pS)-QTSQ, que corresponde a RyR2 fosforilado por PKA en Ser 2809 . 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).

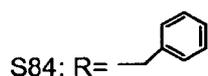
Ejemplo 3 - Registros de un solo canal

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; $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 53 mmol/l (en algunos experimentos, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ se sustituye por $\text{Ca}(\text{OH})_2$); pH 7,35; y compartimento cis - HEPES, 250 mmol/l; Tris-base, 125 mmol/l; EGTA, 1,0 mmol/l; y CaCl_2 , 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^{2+}] y 1,0 mM [Mg^{2+}] 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 \pm EM. Se usa la prueba de la t de student 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

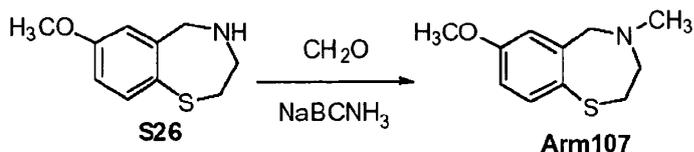
Se preparó Synthron S26 de acuerdo con procedimientos descritos en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 10/680.988.

Esquema 13: Síntesis de S84



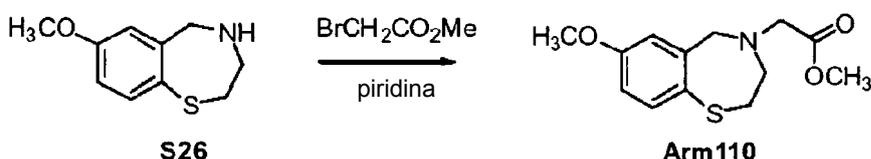
Usando S68 como material de partida, el compuesto S84, como se muestra en el esquema 13, también se sintetiza de forma similar a los compuestos que tienen un grupo metoxi en el anillo de benceno (R=4-OCH $_3$ en la fórmula I).

Esquema 19: Síntesis de ARM107



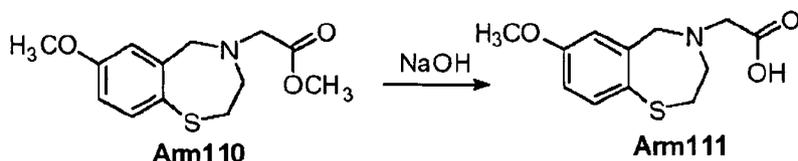
La síntesis de S107 (ARM107) se puede llevar a cabo como se muestra en el esquema 19. El siguiente es un ejemplo de la síntesis: A S26 (180 mg, 0,92 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió solución de CH₂O al 30 % (exceso de 1,5 ml) y cianoborohidruro de sodio (NaBCNH₃) (exceso de 0,4 g). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se mantuvo el pH de la solución a aproximadamente pH 4-5 por adición de unas pocas gotas de HCl 1 N. Después de 3 horas, se retiraron los disolventes a presión reducida. Se disolvió el residuo en 20 ml de acetato de etilo y se lavó con H₂O y NaHCO₃ saturado (2x10 ml). Se retiraron los disolventes y se purificó ARM107 por cromatografía en columna de SiO₂ para dar un rendimiento: 170 mg, 93 %.

Esquema 22: Síntesis de ARM110



La síntesis de S110 (ARM110) se puede llevar a cabo como se muestra en el esquema 22. El siguiente es un ejemplo de la síntesis: Una mezcla de S26 (100 mg, 0,51 mmol) y 1-bromoacetato de metilo (100 mg, 1,2 eq.) y piridina (50 mg) en DMF (¿qué es DMF?) (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A esta mezcla, se le añadió acetato de etilo (50 ml) y se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (2x10 ml) y H₂O (2x10 ml). Se purificó el producto ARM110 como un aceite por cromatografía en columna de SiO₂, para dar un rendimiento de 32 mg, 23 %.

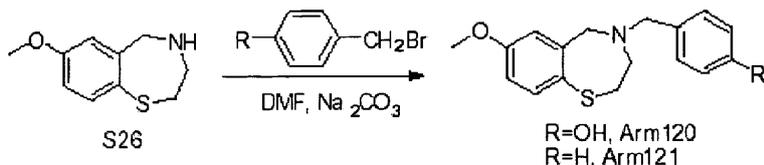
Esquema23: Síntesis de ARM111



La síntesis de S111 (ARM111) se puede llevar a cabo como se muestra en el esquema 23. El siguiente es un ejemplo de la síntesis: A una mezcla de ARM110 (16 mg, 0,06 mmol) en MeOH (2 ml) se le añadió NaOH 1 N (0,1 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se retiraron los disolventes a presión reducida, y se disolvió el residuo

en H₂O (10 ml). Se lavó la fase acuosa con acetato de etilo (2x5 ml) y se acidificó con HCl 1 N hasta pH=4. La retirada de los disolventes a presión reducida proporcionó ARM111 en bruto. Se retiró el NaCl usando etanol para proporcionar ARM111 puro como un sólido, con un rendimiento de 13 mg, 87 %.

Esquema31: Síntesis de ARM120 y ARM121



La síntesis de S120 (ARM120) y S121 (ARM121) se puede llevar a cabo como se muestra en el esquema 31. El siguiente es un ejemplo de la síntesis: Se agitó durante la noche una mezcla de S26 (195 mg, 1 mmol), bromuro de bencilo (1,1 mmol) y Na₂CO₃ (10 mmol) en DMF (10 ml). Se añadió acetato de etilo (30 ml) a la reacción y después se lavó la reacción con H₂O (4x10 ml). Se concentró la fase orgánica a presión reducida y se purificó el residuo por cromatografía en columna para dar S121 como un polvo blanco, con un rendimiento de 280 mg, al 98 %. S120 se sintetizó de forma similar, pero usando bromuro de 4-OH-bencilo en lugar de bromuro de bencilo.

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.

5 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.

10 En un ensayo alternativo, RyR2 está fosforilado por PKA en presencia de ^{32}P -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.

15 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 estreptomocina y 500 µg/ml de G418. Se cultivaron las células para su uso en electrofisiología en platos de 35 mm.

25 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 ($n \geq 3$). 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_2 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.

35 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 acumulativa en orden ascendente sin lavado entre aplicaciones.

40 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:

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

50 donde [prueba] es la concentración del compuesto de prueba, IC_{50} (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 IC_{50} porque la mayor concentración del compuesto de prueba usado no bloqueó el canal de hERG en un 50 % o más.

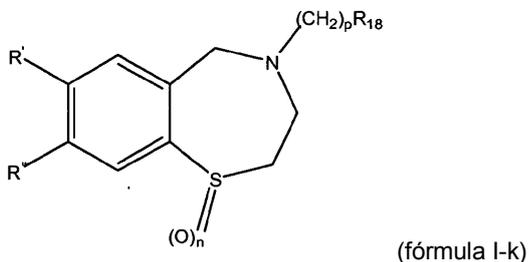
55 Ejemplo 7 - Efecto de varios compuestos sobre corrientes de hERG

5 Se sometieron a prueba múltiples compuestos de la invención para determinar sus efectos sobre corrientes de hERG. Los compuestos sometidos a prueba incluyen ARM107. 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 ($n > 2$). 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 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.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la estructura de fórmula I-k:



- 5 en la que R' y R'' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, -OH, -NH₂, -NO₂, -CN, -CF₃, -OCF₃, -N₃, -SO₃H, -S(=O)₂alquilo, -S(=O)alquilo, -OS(=O)₂CF₃, acilo, alquilo, alcoxilo, alquilamino, alquiltio, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, alquenilo, alquinilo, (hetero)arilo, (hetero)ariltio, y (hetero)arilamino; y en la que cada acilo, alquilo, alcoxilo, alquilamino, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, heterocicilalquilo, alquenilo, alquinilo, (hetero)arilo, (hetero)ariltio puede estar sustituido;

n es 0, 1 o 2; y

- 10 p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10;

en la que:

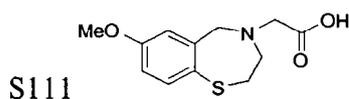
cuando p es 0, R₁₈ es alquilo C₁-C₄; y cuando p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10;

R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en -(C=O)OR₁₅, -OR₁₅, alquilo y arilo, en la que cada alquilo y arilo puede estar sustituido; y

- 15 R₁₅ se selecciona del grupo que consiste en H, acilo, alquenilo, alcoxilo, OH, NH₂, alquilo, alquilamino, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, heterociclilo, y heterocicilalquilo, en la que cada acilo, alquenilo, alcoxilo, alquilo, alquilamino, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heteroarilo, heterociclilo, y heterocicilalquilo puede estar sustituido;

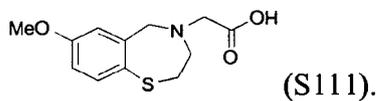
- 20 y enantiómeros, diastereómeros, tautómeros, sales, hidratos, solvatos, y complejos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. El compuesto de la reivindicación 1, representado por la estructura:



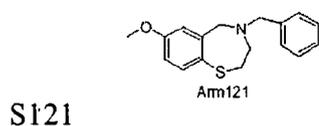
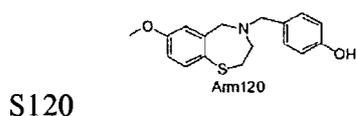
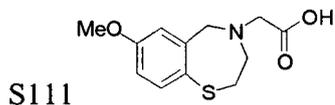
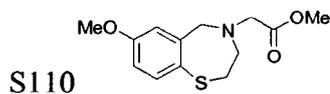
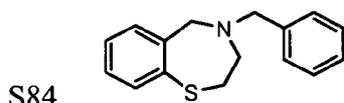
o un hidrato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable de



25

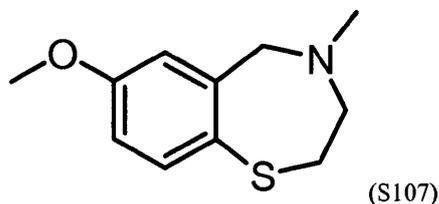
4. El compuesto de la reivindicación 1, representado por la estructura:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

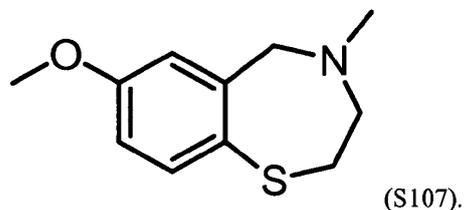
5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que p es 0, y R₁₈ es alquilo C₁-C₄.

5 6. El compuesto de la reivindicación 5, representado por la estructura:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable de



10 8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las
 15 reivindicaciones 1 a 7, y al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en 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.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, 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.

10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad asociados con un RyR que regular el funcionamiento de los canales de calcio en las células.
- 5 11. El compuesto 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.
- 10 12. El compuesto 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 cardíaco; muerte súbita de origen cardíaco inducida por ejercicio; insuficiencia cardíaca congestiva; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; y tensión arterial alta.
- 15 13. El compuesto de la reivindicación 12, en el 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.
- 20 14. El compuesto 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.
- 25 15. El compuesto 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.
16. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno o enfermedad asociados con un RyR que regular el funcionamiento de los canales de calcio en las células.

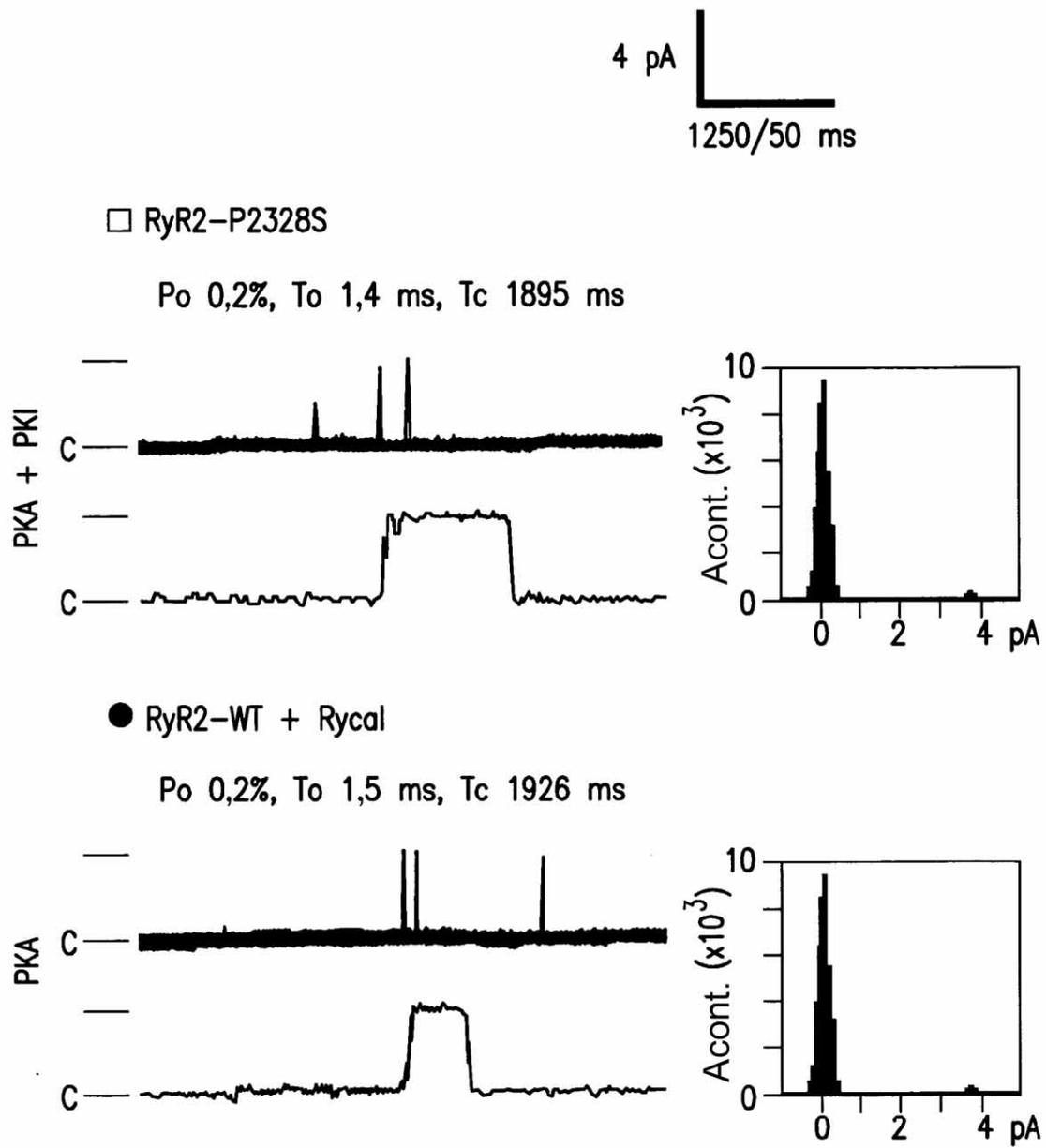


FIG. 1A

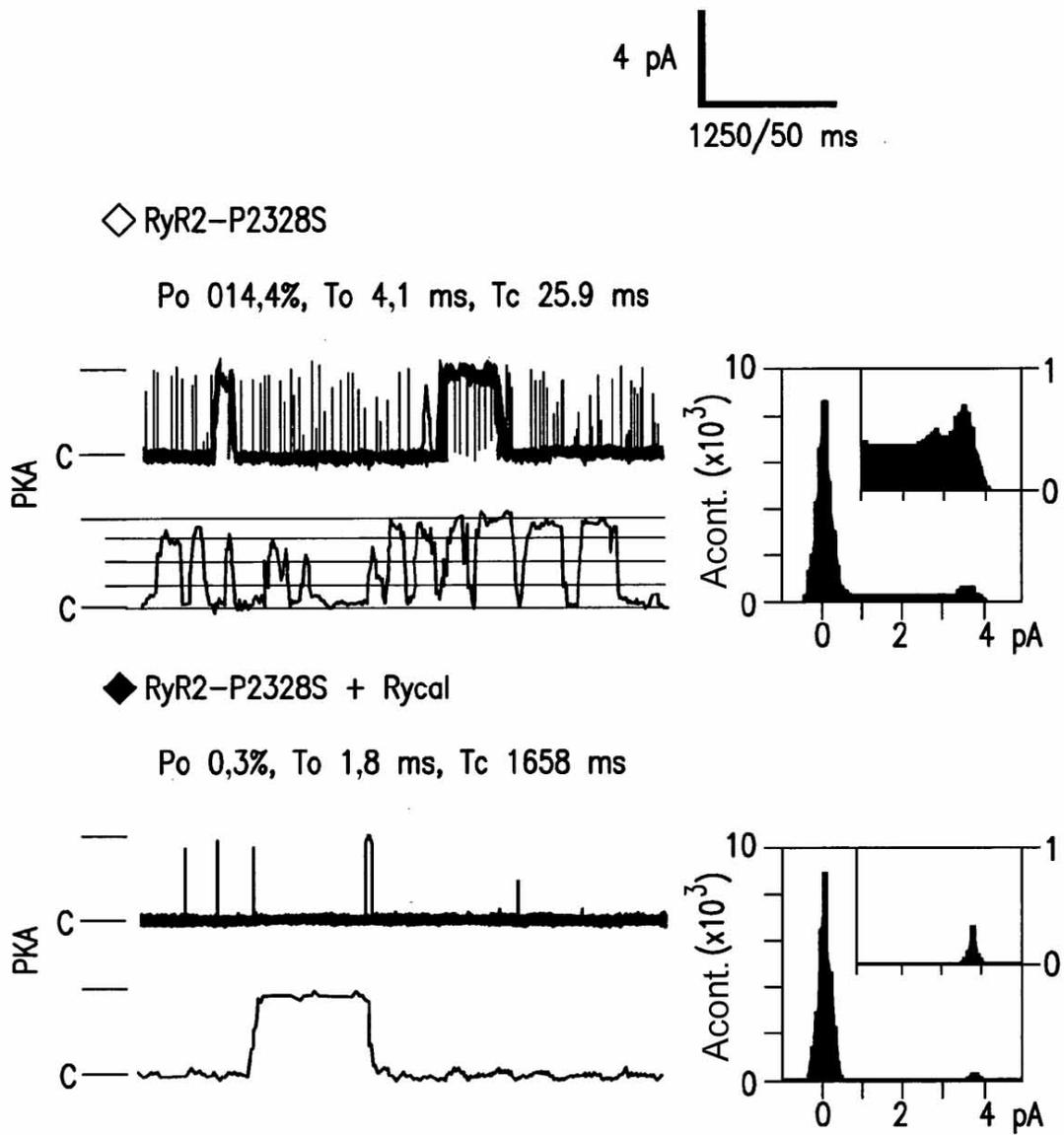


FIG. 1B

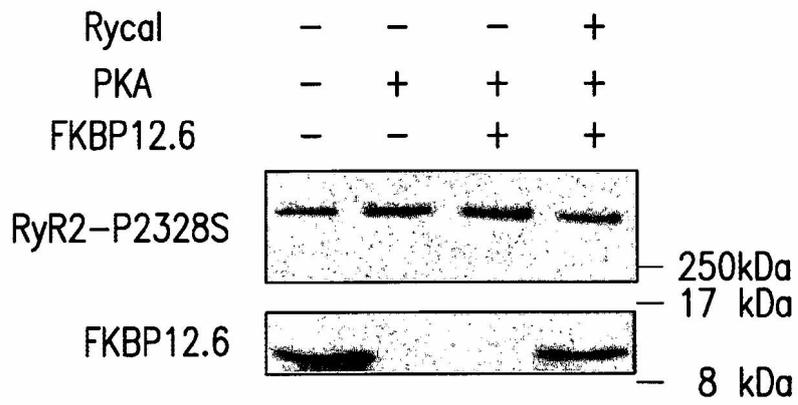


FIG. 1C

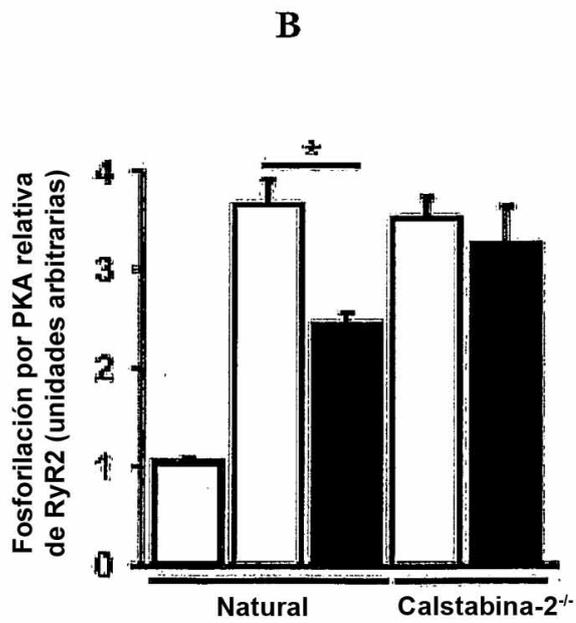
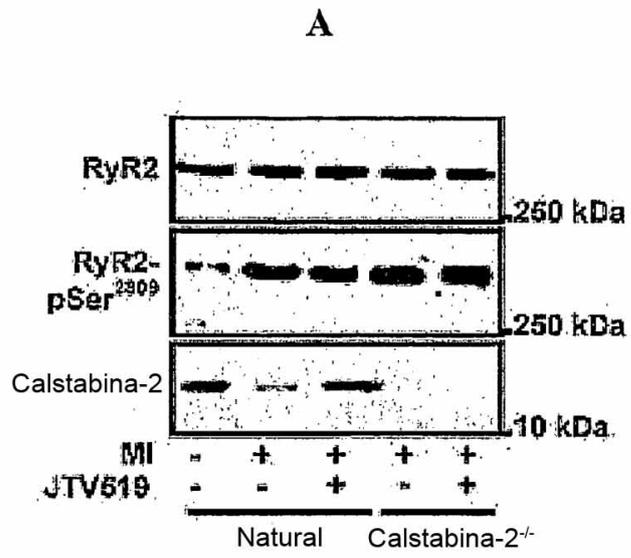


FIG. 2

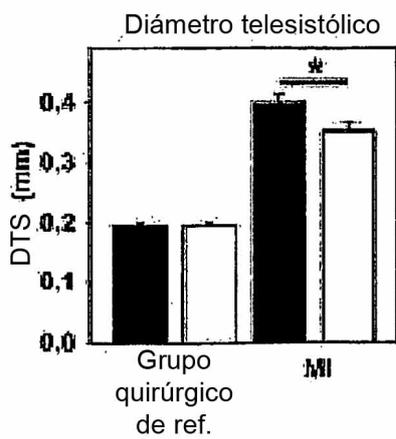
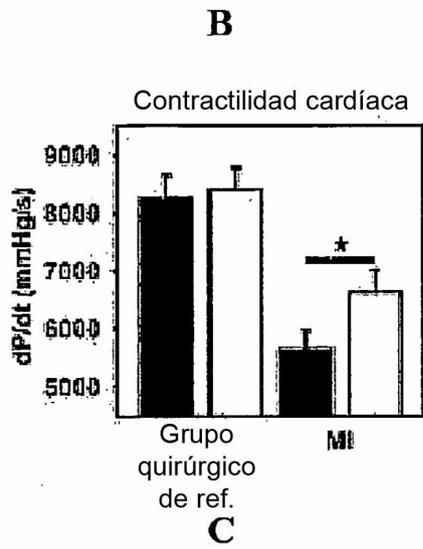
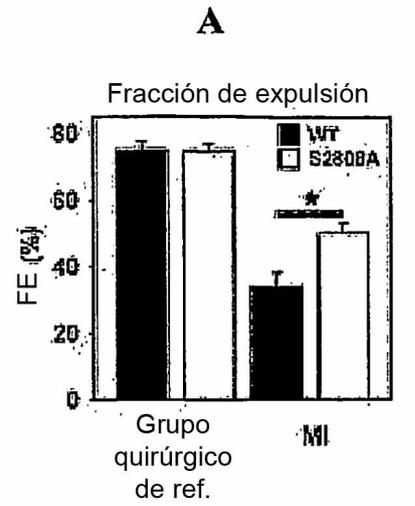
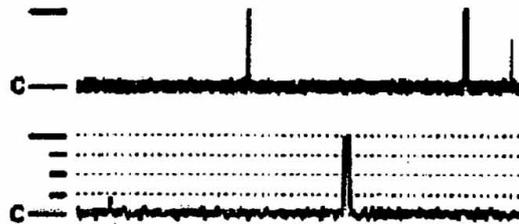


FIG. 3

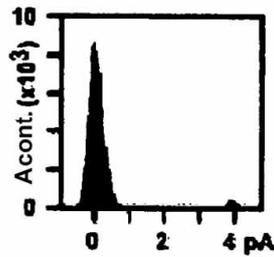
A

Control (Natural)

Po 0,001, To 1,4 ms, Tc 1425,1 ms



B



C

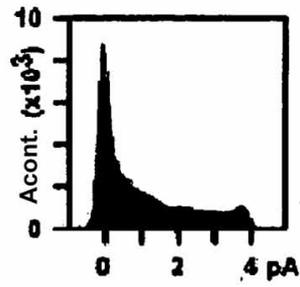
mdx (distrofina^{-/-})

Po 0,107, To 2,9 ms, Tc 23,1 ms



FIG. 4

D



E

***mdx* + JTV519**

Po 0,007, To 1,6 ms, Tc 1031,6 ms



F

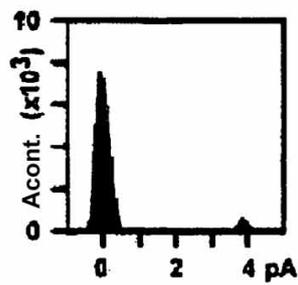


FIG. 4

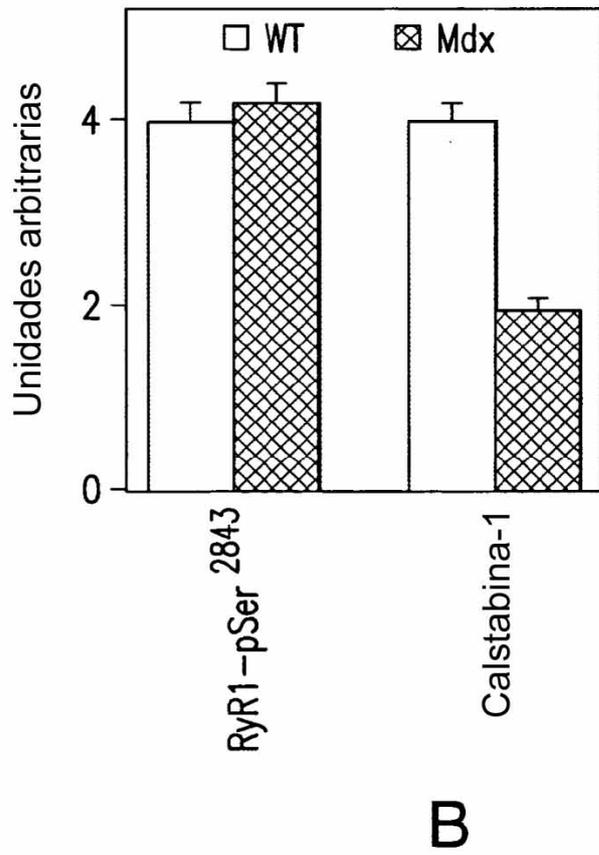
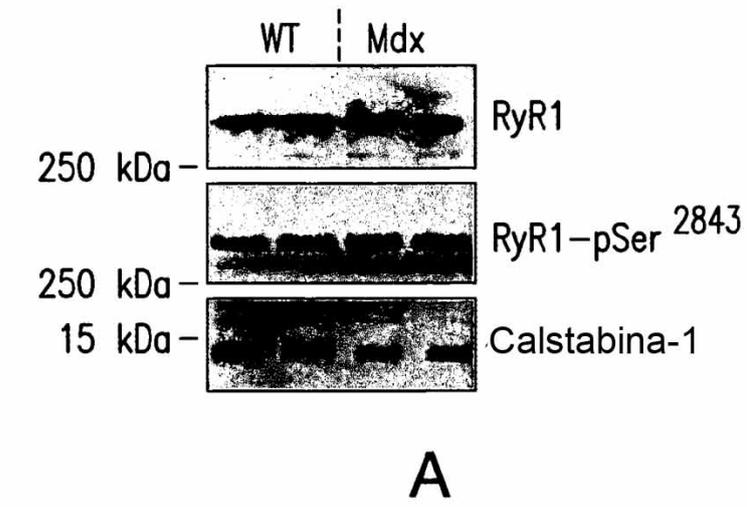


FIG. 5

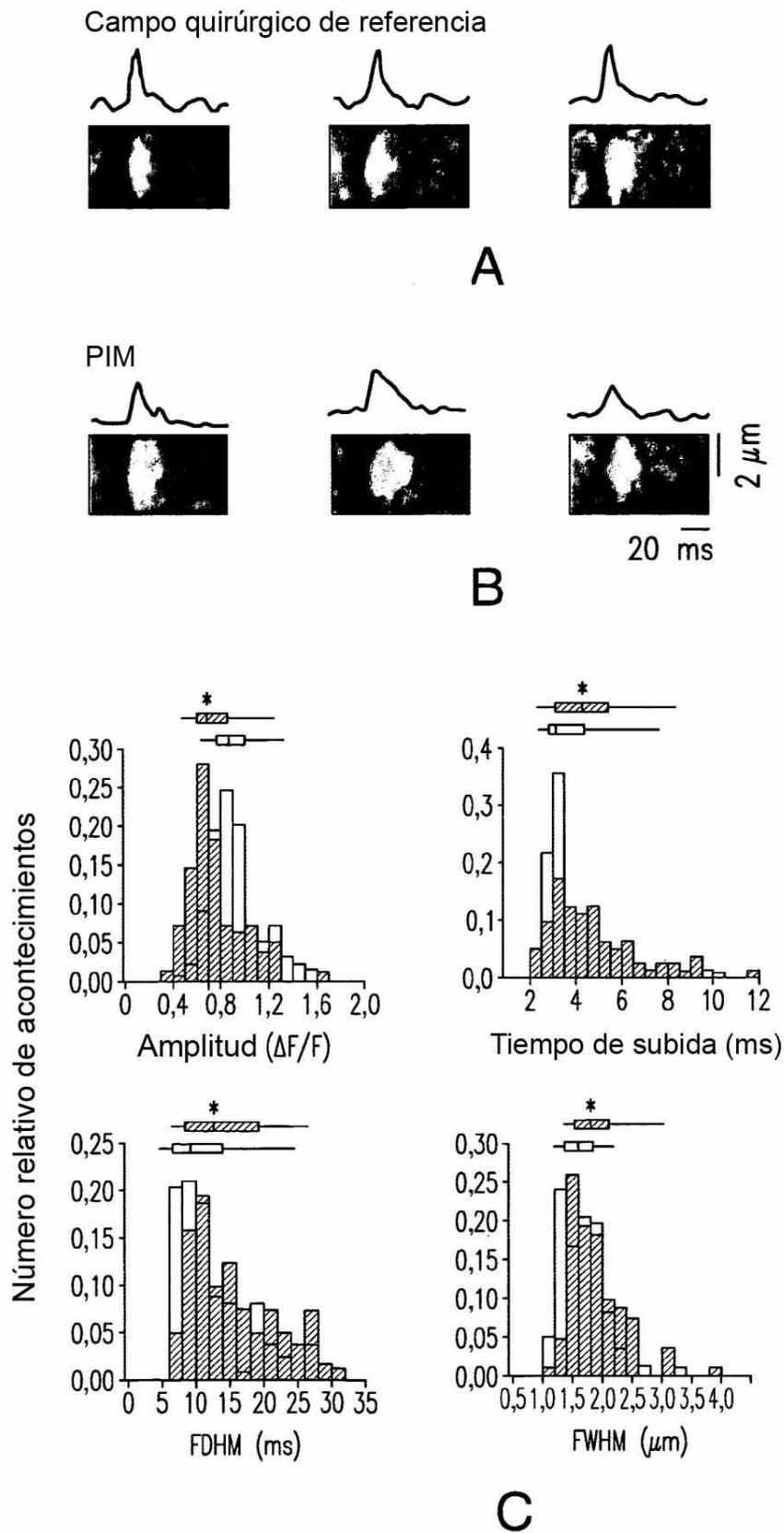


FIG. 6

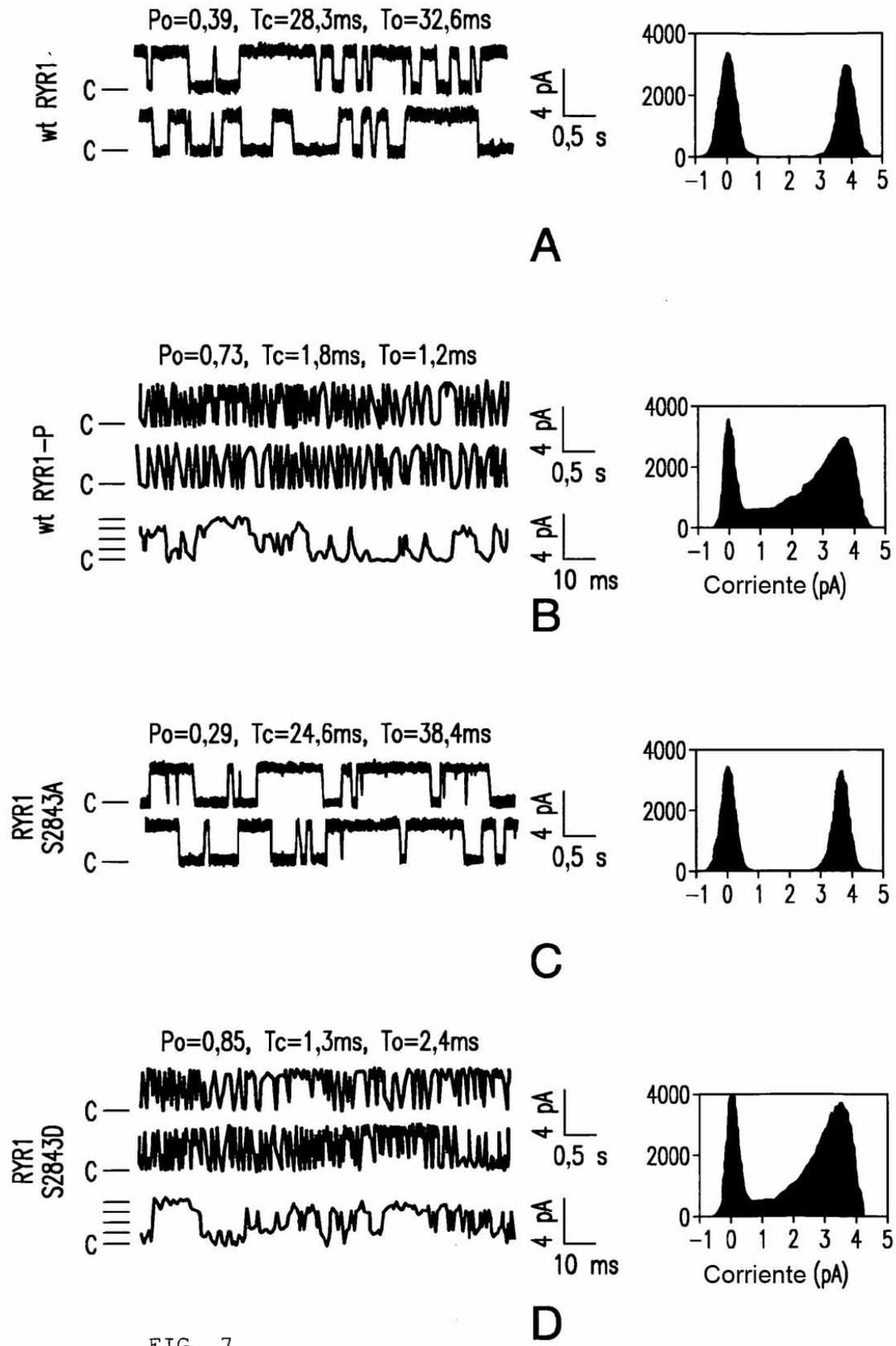
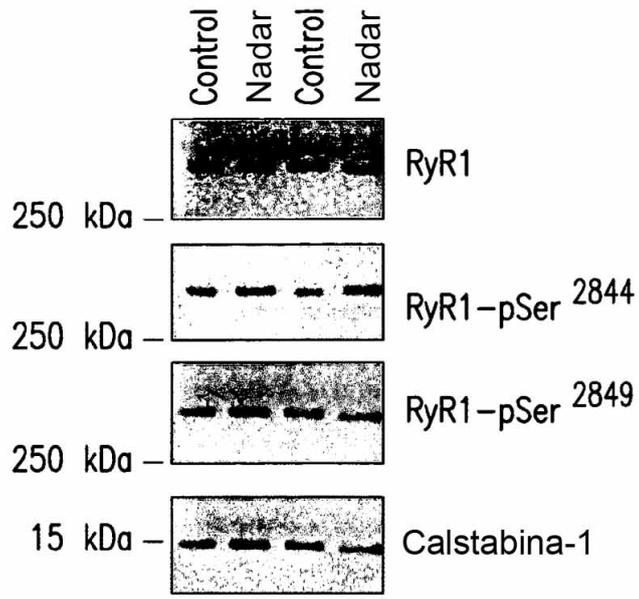
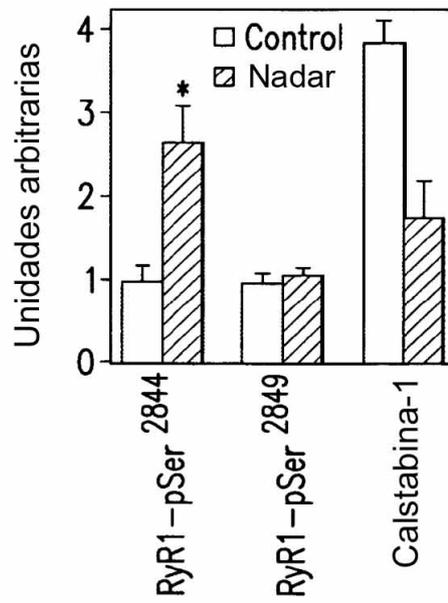


FIG. 7

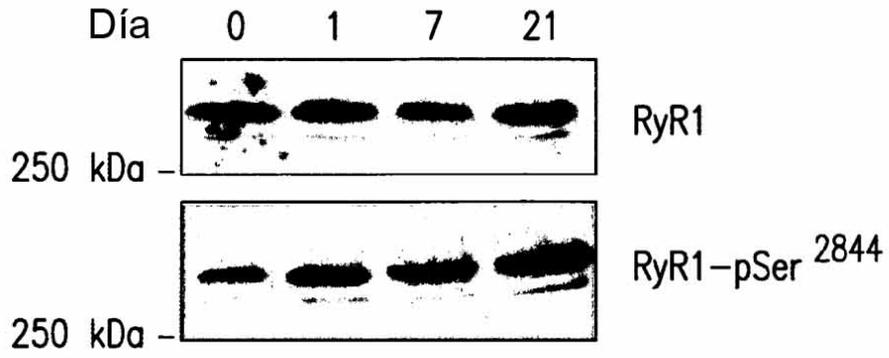


A

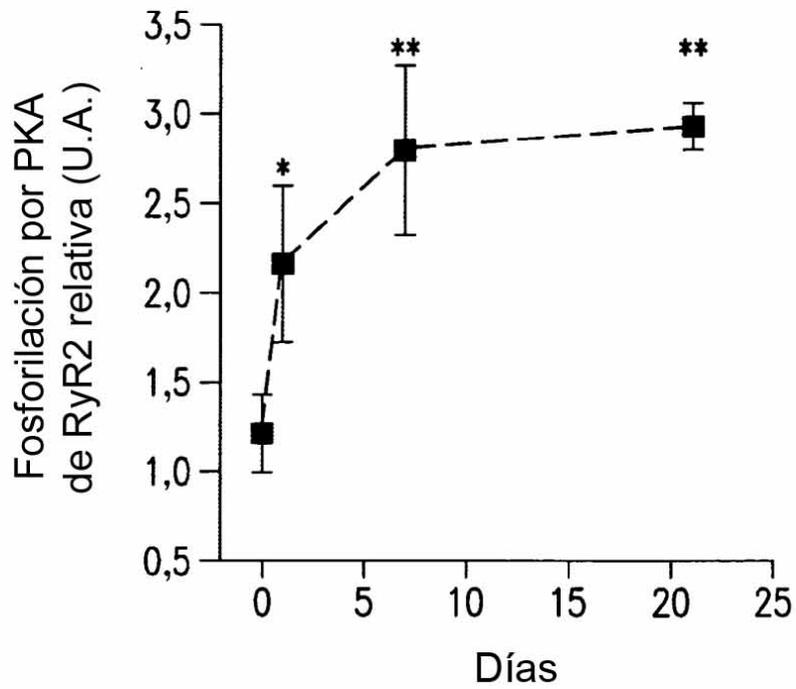


B

FIG. 8

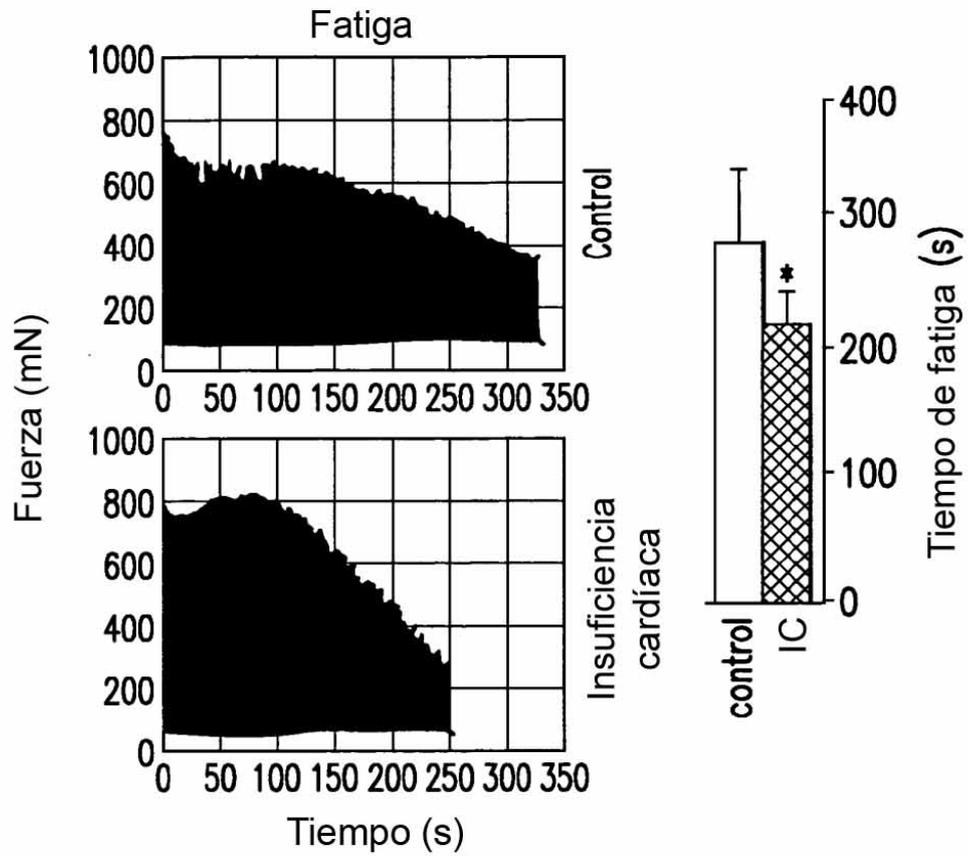


A

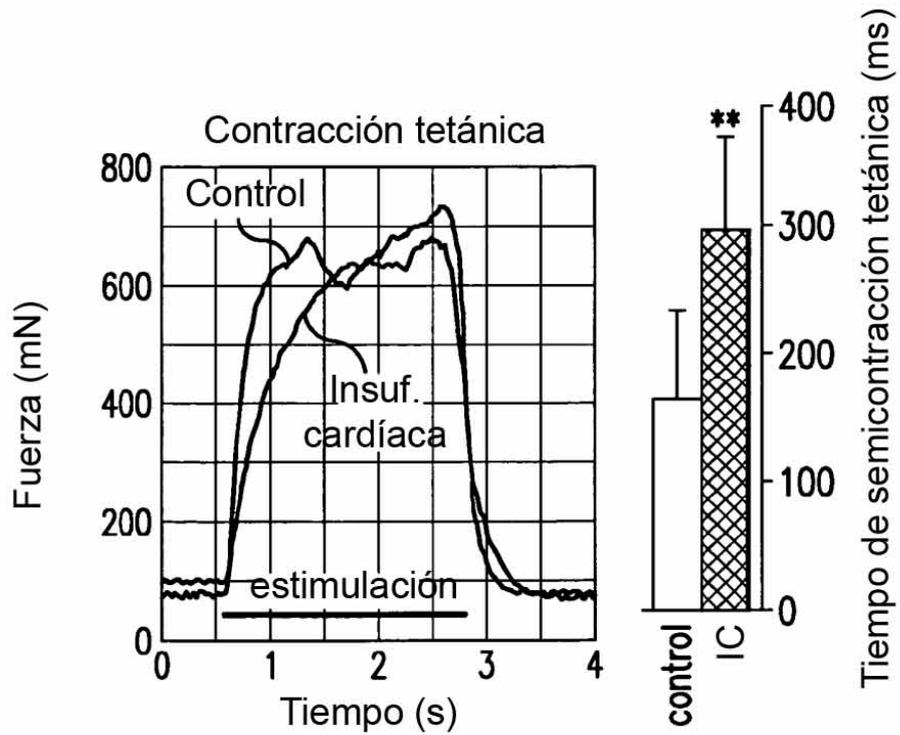


B

FIG. 9

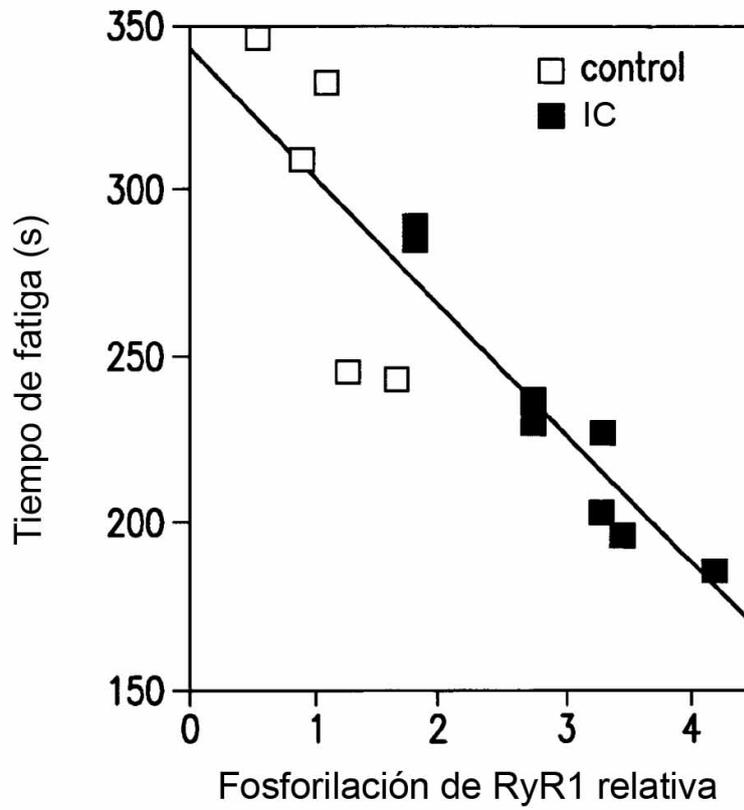


A



B

FIG.10



C

FIG. 10

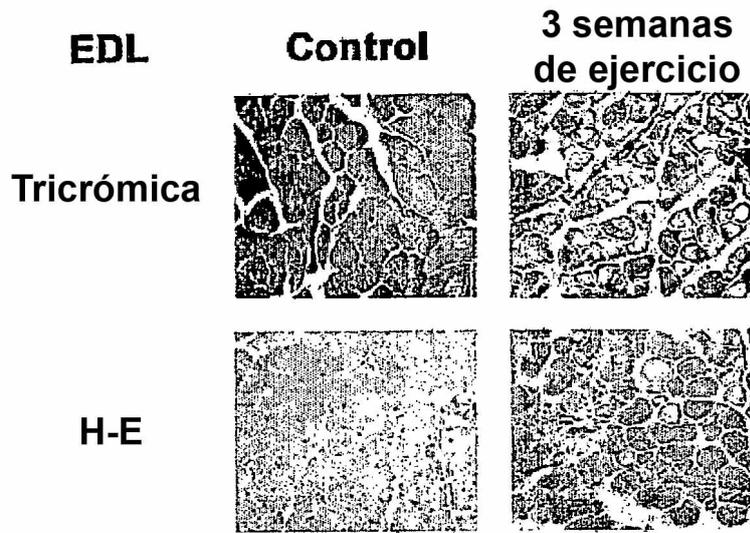


FIG. 11

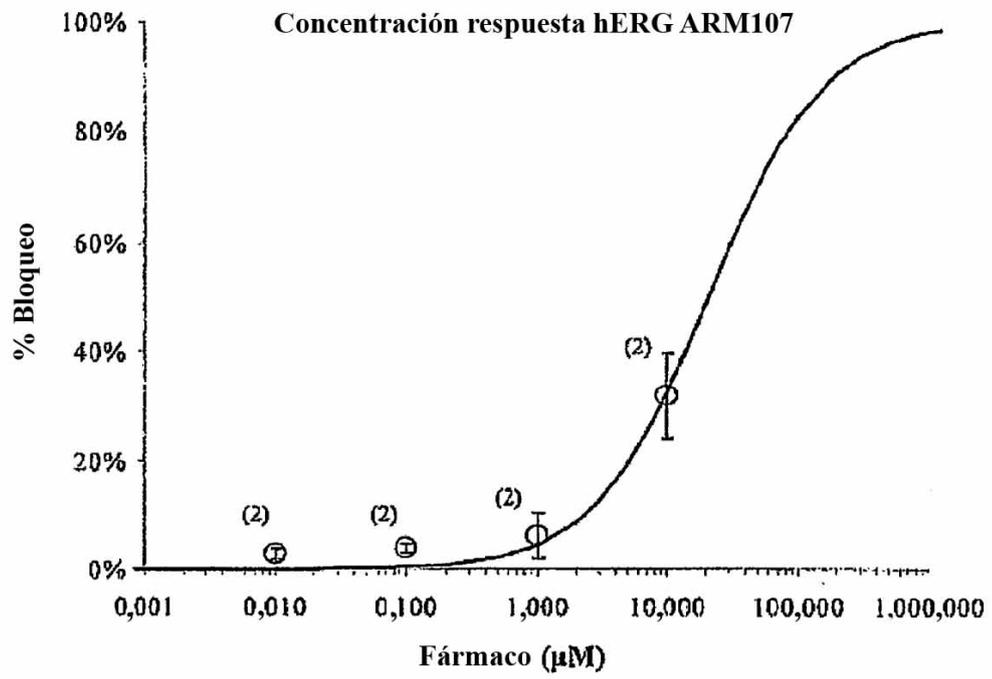


FIG. 12

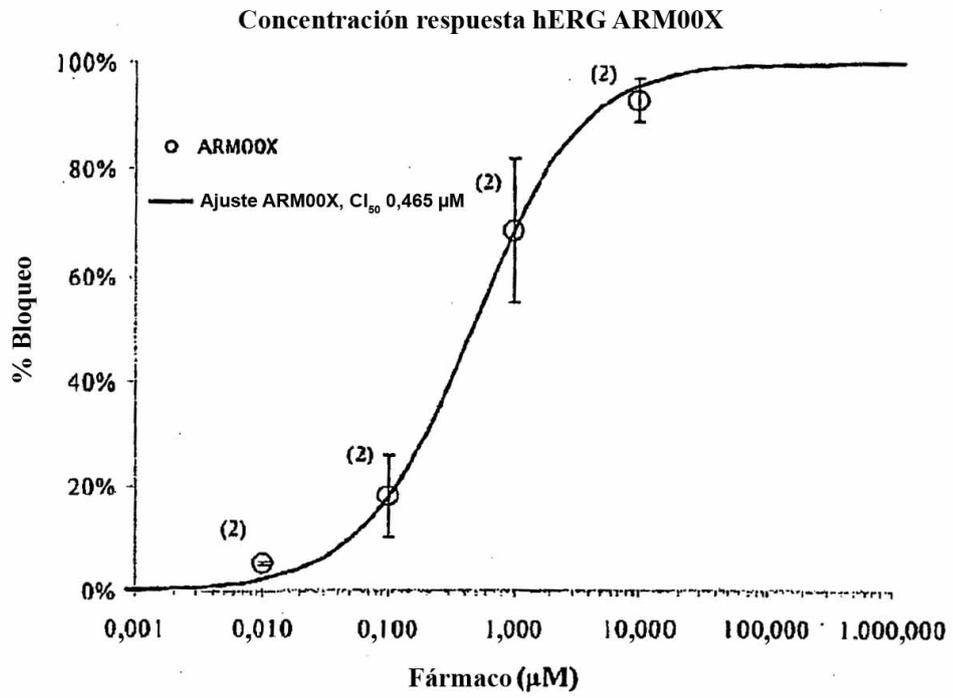


FIG. 13