



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 31/553 (2006.01)

A61K 31/554 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0041432

(43) 공개일자 2007년04월18일

(21) 출원번호 10-2006-7022060

(22) 출원일자 2006년10월24일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년10월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/009495

(87) 국제공개번호 WO 2005/094457

국제출원일자 2005년03월22일

국제공개일자 2005년10월13일

(30) 우선권주장 10/809,089 2004년03월25일 미국(US)

(71) 출원인 더 트러스티이스 오브 콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕
미국 뉴욕주 10027 뉴욕 535 웨스트 116쓰 스트리트 메일 코드 4308 로우 라이브러리 412

(72) 발명자 마크스 앤드류 알.
미국 뉴욕주 10538 라치몬트 로커스트 애브뉴 12
랜드리 도날드 더블유.
미국 뉴욕주 10027 뉴욕 클라레몬트 애브뉴 29
뎡 시지안
미국 뉴욕주 10601 화이트 플레인스 힐사이드 테리토리 33디
첵 켄 주앙
미국 뉴욕주 11373 엘름허스트 퍼스트 플로어 우드-헤븐 볼트바드60-51

(74) 대리인 강승욱
김성기

전체 청구항 수 : 총 84 항

(54) 라이아노딘 수용체 (R Y R 2)에서의 누출을 표적화하는신규한 항-부정맥 및 심부전 약물과 그 용도

(57) 요약

본 발명은 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 대상에서 심장 부정맥, 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 및 예방하는 방법을 제공한다. 추가로, 본 발명은 심방 세동이 있거나 그 후보인 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법에 있어서의 JTV-519의 용도를 제공한다. 또한 제공되는 것은 대상에서의 심방성 및 심실 부정맥 및 심부전의 치료 및 예방 방법과, 운동-유발성의 심장성 돌연사의 예방 방법에 있어서의 1,4-벤조티아제핀 유도체의 용도이다. 본 발명은 또한 심방 세동 및 심부전의 치료 및 예방에 사용하기 위한 약제의 확인 방법과, 이 방법으로 확인되는 약제를 제공한다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

심방 세동이 있거나 그 후보인 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법으로서,

대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양의 JTV-519를 대상에게 투여하는 단계로서, 상기 RyR2는 심방 RyR2인 것인 단계를 포함하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소는 대상에서 인산화 RyR2의 수준을 감소시킴으로써 제한 또는 방지하는 것인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 대상이 인간인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 JTV-519의 양이 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하기에 유효한 JTV-519의 양인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, JTV-519는 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 JTV-519의 양이 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일인 방법.

청구항 7.

심방 세동이 있거나 그 후보인 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법에 있어서의 JTV-519의 용도.

청구항 8.

대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하는 방법으로서,

대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양의 JTV-519를 대상에게 투여함으로써 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, 심방 세동이 비지속성 심방 세동인 방법.

청구항 10.

제8항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 JTV-519의 양이 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하기에 유효한 JTV-519의 양인 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서, JTV-519는 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하는 것인 방법.

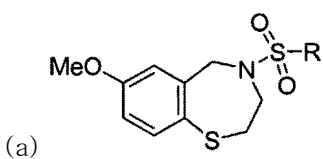
청구항 12.

제8항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 JTV-519의 양이 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일인 방법.

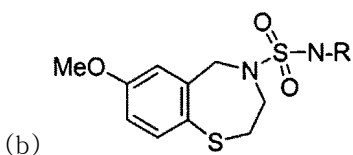
청구항 13.

대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법으로서,

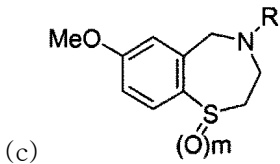
대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양으로 약제를 대상에게 투여하는 단계로서, 상기 약제는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군으로부터 선택하는 것인 단계를 포함하는 방법:



(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);

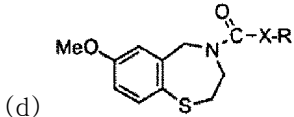


(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



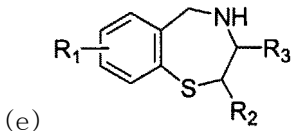
(c)

(식 중, R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 또는 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



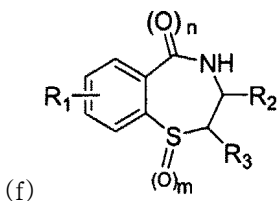
(d)

(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



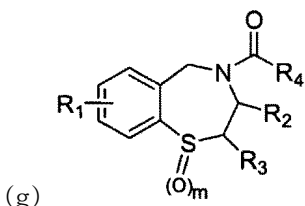
(e)

(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(f)

(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



(g)

(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₄는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태.

청구항 14.

제13항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소는 대상에서 인산화 RyR2의 수준을 감소시킴으로써 제한 또는 방지하는 것인 방법.

청구항 15.

제13항에 있어서, 대상이 인간인 방법.

청구항 16.

제13항에 있어서, 대상은 카테콜아민성 다형 심실 빈맥(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT)을 갖는 것인 방법.

청구항 17.

제13항에 있어서, 대상은 심장 부정맥, 심부전, 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 갖고 있거나, 그 후보인 것인 방법.

청구항 18.

제13항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 약제의 양이 대상에서 심장 부정맥, 심부전, 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 또는 예방하기에 유효한 약제의 양인 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 심장 부정맥이 심방 부정맥 또는 심실 부정맥인 방법.

청구항 20.

제19항에 있어서, 심방 부정맥이 심방 세동인 방법.

청구항 21.

제21항에 있어서, 심방 세동이 지속성 심방 세동인 방법.

청구항 22.

제19항에 있어서, 심실 부정맥이 운동-유발성 심실 부정맥인 방법.

청구항 23.

제13항에 있어서, 약제는 대상에서 심장 부정맥, 심부전, 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 24.

제13항에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 약제의 양이 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일인 방법.

청구항 25.

제13항에 있어서, 약제가 S4, S7, S20, S24, S25, S26, S27 또는 S36인 방법.

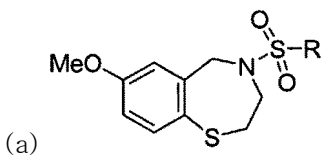
청구항 26.

제25항에 있어서, 약제가 S36인 방법.

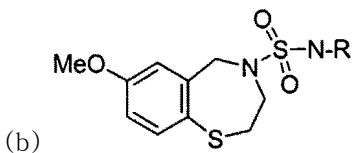
청구항 27.

대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법에 있어서의 약제의 용도로서,

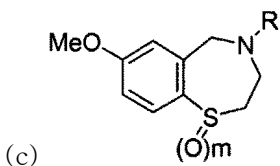
상기 약제는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군으로부터 선택하는 것인 용도:



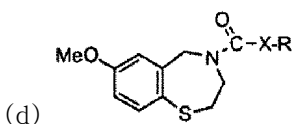
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



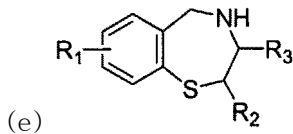
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



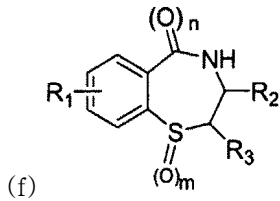
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



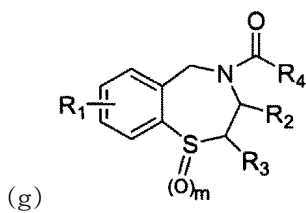
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



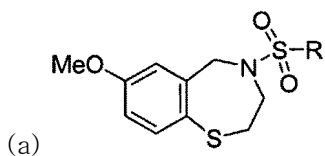
(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₄는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태.

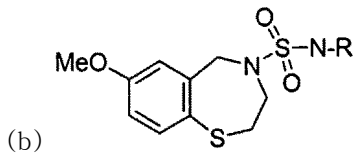
청구항 28.

대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사의 치료 또는 예방 방법으로서,

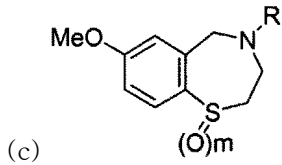
대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양으로 약제를 대상에게 투여하는 단계로서, 상기 약제는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군 중에서 선택하는 것인 단계를 포함하는 방법:



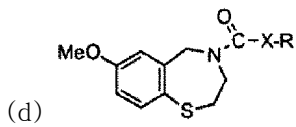
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



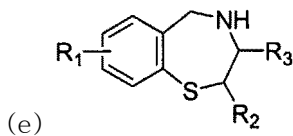
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



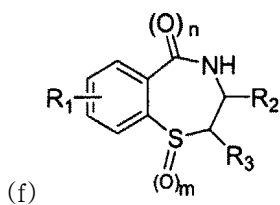
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



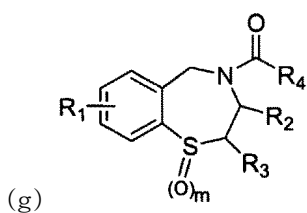
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



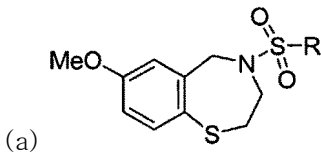
(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태.

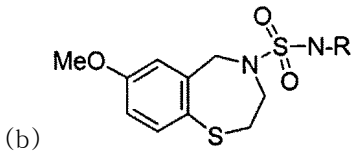
청구항 29.

대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사의 치료 또는 예방 방법으로서,

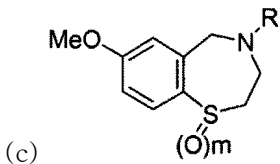
대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 또는 예방하기에 유효한 양으로 약제를 대상에게 투여하는 단계로서, 상기 약제는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군 중에서 선택하는 것인 단계를 포함하는 방법:



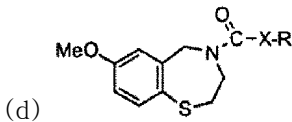
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



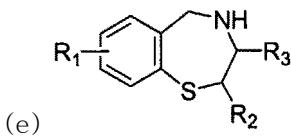
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



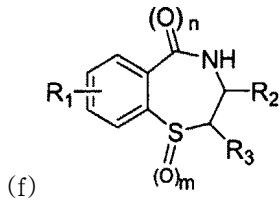
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



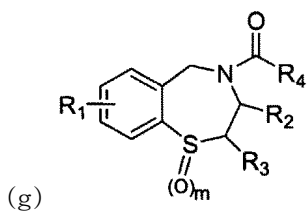
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R_2 는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태.

청구항 30.

제29항에 있어서, 심장 부정맥이 심방 부정맥 또는 심실 부정맥인 방법.

청구항 31.

제30항에 있어서, 심방 부정맥이 심방 세동인 방법.

청구항 32.

제30항에 있어서, 심실 부정맥이 운동-유발성 심실 부정맥인 방법.

청구항 33.

제29항에 있어서, 대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 또는 예방하기에 유효한 약제의 양이 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일인 방법.

청구항 34.

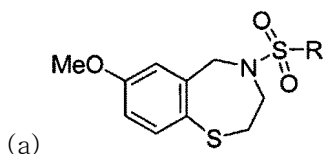
제29항에 있어서, 약제가 S4, S7, S20, S24, S25, S26, S27 또는 S36인 방법.

청구항 35.

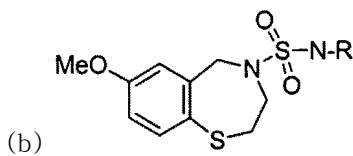
제34항에 있어서, 약제가 S36인 방법.

청구항 36.

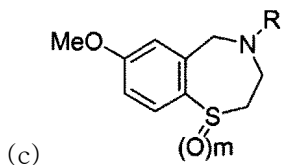
대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 또는 예방하는 방법에 있어서의 약제의 용도로서, 상기 약제는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군으로부터 선택하는 것인 용도:



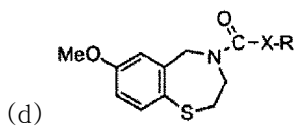
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



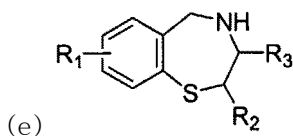
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



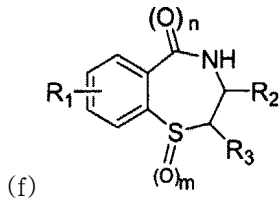
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



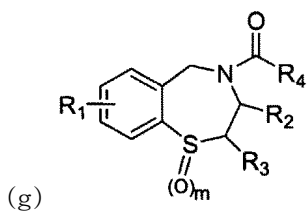
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R_2 는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m 은 0, 1, 또는 2이며; n 은 0 또는 1임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m 은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태.

청구항 37.

심방 세동 또는 심부전의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 확인 방법으로서,

- (a) RyR2를 포함하는 세포 배양물을 수득하거나 생성하는 단계;
- (b) 이 세포를 후보 약제와 접촉시키는 단계;
- (c) 세포에서 RyR2의 인산화를 증가시키는 것으로 공지된 하나 이상의 조건에 세포를 노출시키는 단계; 및
- (d) 약제가 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는지를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 38.

제37항에 있어서,

- (e) 약제가 세포에서 RyR2-결부된 생물학적 사건에 영향을 미치는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 39.

제37항의 방법에 의해 확인된 약제.

청구항 40.

심방 세동 또는 심부전의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 확인 방법으로서,

- (a) RyR2를 포함하는 동물을 수득하거나 생성하는 단계;
- (b) 후보 약제를 이 동물에 투여하는 단계;
- (c) 세포에서 RyR2의 인산화를 증가시키는 것으로 공지된 하나 이상의 조건에 동물을 노출시키는 단계; 및
- (d) 약제가 동물에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는지를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 41.

제40항에 있어서,

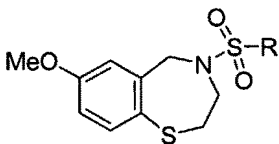
- (e) 약제가 동물에서 RyR2-결부된 생물학적 사건에 영향을 미치는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 42.

제40항의 방법에 의해 확인된 약제.

청구항 43.

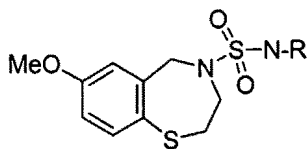
하기 화학식의 화합물:



상기 식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이다.

청구항 44.

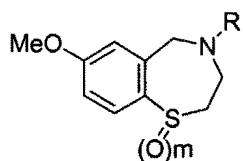
하기 화학식의 화합물:



상기 식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이다.

청구항 45.

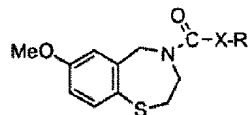
하기 화학식의 화합물:



상기 식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2이다.

청구항 46.

하기 화학식의 화합물:



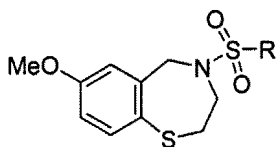
상기 식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O이다.

청구항 47.

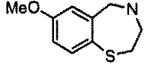
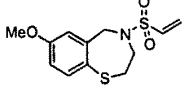
S4, S7, S20, S25, S27 및 S36으로 이루어진 군 중에서 선택된 화합물.

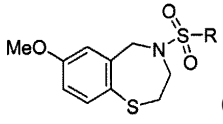
청구항 48.

하기 화학식의 화합물의 합성 방법으로서,



(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임)

(a) 화학식  의 화합물을 술폰닐 클로라이드 화합물 및 염기로 처리하여 화학식  의 화합물을 형성하는 단계;

(b) 선택적으로, 단계 (a)에서 형성된 화합물을 일차 또는 이차 아민으로 처리하여 화학식  (식 중, R은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 49.

제48항에 있어서, 단계 (a)에서 술폰닐 클로라이드 화합물은 알킬술폰닐 클로라이드 및 아릴 술폰닐 클로라이드로 이루어진 군 중에서 선택하는 것인 방법.

청구항 50.

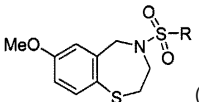
제49항에 있어서, 단계 (a)에서 염기가 Et₃N인 방법.

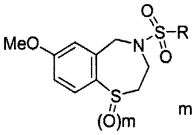
청구항 51.

제48항에 있어서, 단계 (b)에서 일차 아민 또는 이차 아민이 4-벤질피페리딘인 방법.

청구항 52.

제48항에 있어서,

화학식  (식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, -(CH₂)_nNR'₂, 또는 -(CH₂)_nSR'이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'

은 알킬 또는 시클로알킬임)의 화합물을 산화제로 산화시켜 화학식  (식 중, R은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계

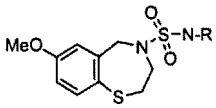
를 추가로 포함하는 방법.

청구항 53.

제52항에 있어서, 산화제가 과산화수소인 방법.

청구항 54.

하기 화학식의 화합물의 합성 방법으로서,



(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임)

화학식 의 화합물 염기의 존재 하에 술폰릴 클로라이드 및 일차 또는 이차 아민으로 처리하여 화학식

(식 중, R은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 55.

제54항에 있어서, 염기가 Et_3N 인 방법.

청구항 56.

제54항에 있어서, 일차 또는 이차 아민이 1-피페로닐피페라진인 방법.

청구항 57.

제54항에 있어서,

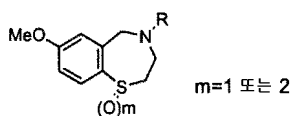
화학식 (식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬

또는 시클로알킬임)의 화합물을 산화시켜 화학식 (식 중, R은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계

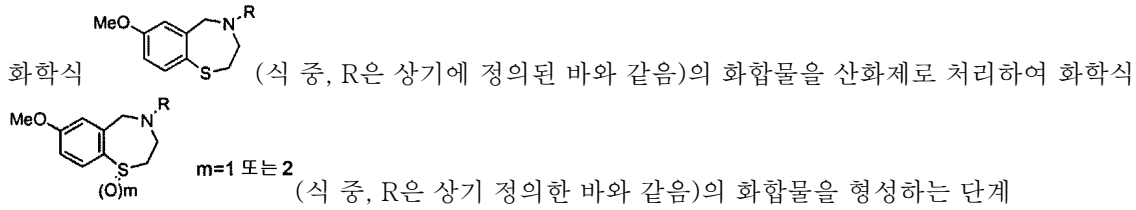
를 추가로 포함하는 방법.

청구항 58.

하기 화학식의 화합물의 합성 방법으로서,



(식 중, R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 또는 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; m은 1 또는 2임)



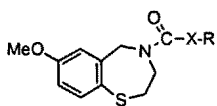
를 포함하는 방법.

청구항 59.

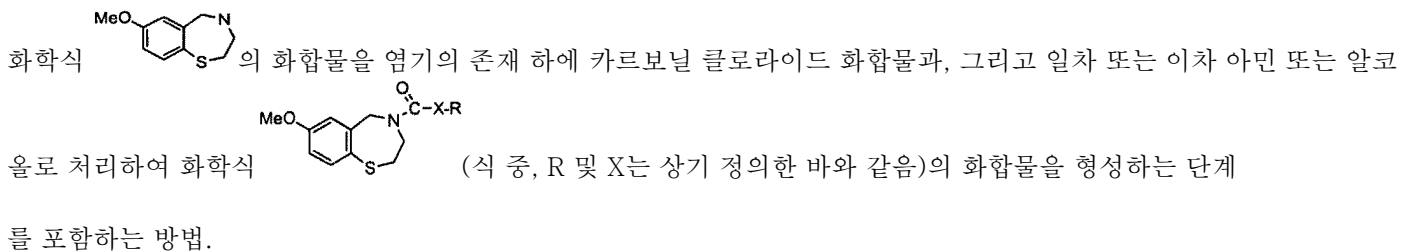
제58항에 있어서, 산화제가 과산화수소인 방법.

청구항 60.

하기 화학식의 화합물의 합성 방법으로서,



(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, 또는 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임)



청구항 61.

제60항에 있어서, 카르보닐 클로라이드 화합물이 트리포스젠인 방법.

청구항 62.

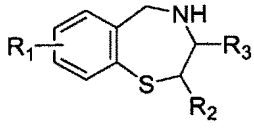
제60항에 있어서, 염기가 Et_3N 인 방법.

청구항 63.

제60항에 있어서, 일차 또는 이차 아민이 4-벤질피페리딘인 방법.

청구항 64.

하기 화학식의 2,3,4,5- 테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 화합물의 합성 방법으로서,



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임)

(a) 화학식 (식 중, R₁은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 선택적 축매의 존재 하에 환원제로 처리하여 화학식 (식 중, R₁은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계;

(b) 단계 (a)에서 형성된 화합물을 디아조화제 및 디설피드로 처리하여 화학식 (식 중, R₁은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 형성된 화합물을 활성제 및 클로로에틸아민으로 처리하여 화학식 (식 중, R₁, R₂, 및 R₃은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계;

(d) 단계 (c)에서 형성된 화합물을 환원제 및 염기로 처리하여 화학식 (식 중, R₁, R₂, 및 R₃은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계; 및

(e) 단계 (d)에서 형성된 화합물을 환원제로 처리하여 화학식 (식 중, R₁, R₂, 및 R₃은 상기 정의한 바와 같음)의 화합물을 형성하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 65.

RyR2 및 FKBP12.6의 결합을 증강시키는 약제를 확인하기 위한 방법으로서,

- (a) RyR2의 공급원을 수득하거나 생성하는 단계;
- (b) 후보 약제의 존재 하에 RyR2를 FKBP12.6에 노출시키는 단계; 및
- (c) 약제가 RyR2와 FKBP12.6의 결합을 증강시키는지를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 66.

제65항에 있어서, RyR2는 PKA-인산화된 것인 방법.

청구항 67.

제66항에 있어서, RyR2는 PKA-과인산화된 것인 방법.

청구항 68.

제65항에 있어서, RyR2는 고체상에 부동화된 것인 방법.

청구항 69.

제68항에 있어서, 고체상이 플레이트 또는 비드인 방법.

청구항 70.

제65항에 있어서, FKBP12.6은 방사성 표지화된 것인 방법.

청구항 71.

제70항에 있어서, FKBP12.6은 ^{32}S 로 표지화된 것인 방법.

청구항 72.

제65항에 있어서, RyR2 및 FKBP12.6의 증강된 결합은 FKBP12.6-결합제를 사용하여 검출하는 것인 방법.

청구항 73.

제72항에 있어서, FKBP12.6-결합제가 항-FKBP12.6 항체인 방법.

청구항 74.

제65항의 방법에 의해 확인된 제제.

청구항 75.

RyR2 및 FKBP12.6의 결합을 증강시키는 약제를 확인하기 위한 방법으로서,

- (a) FKBP12.6의 공급원을 수득하거나 생성하는 단계;
- (b) 후보 약제의 존재 하에 FKBP12.6을 RyR2에 노출시키는 단계; 및
- (c) 약제가 RyR2와 FKBP12.6의 결합을 증강시키는지 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 76.

제75항에 있어서, FKBP12.6은 고체상에 부동화된 것인 방법.

청구항 77.

제76항에 있어서, 고체상이 플레이트 또는 비드인 방법.

청구항 78.

제75항에 있어서, RyR2는 PKA-인산화된 것인 방법.

청구항 79.

제78항에 있어서, RyR2는 PKA-과인산화된 것인 방법.

청구항 80.

제75항에 있어서, RyR2는 방사성 표지화된 것인 방법.

청구항 81.

제80항에 있어서, RyR2는 ^{32}P 로 표지화된 것인 방법.

청구항 82.

제78항에 있어서, RyR2 및 FKBP12.6의 증강된 결합은 RyR2-결합제를 사용하여 검출하는 것인 방법.

청구항 83.

제82항에 있어서, RyR2는-결합제가 항-RyR2 항체인 방법.

청구항 84.

제75항의 방법에 의해 확인된 제제.

명세서**관련 출원과의 상호 참조**

본 발명은 2004년 3월 25일자로 출원된 미국 일부 계속 출원 제10/809,089호의 이득을 청구하는데; 상기 특허 출원은 2004년 1월 22일자로 출원된 미국 일부 계속 출원 제10/763,498호의 이득을 청구하고; 상기 특허 출원은 2003년 10월 7일자로 출원된 미국 일부 계속 출원 제10/680,988호의 이득을 청구하고; 상기 특허 출원은 2003년 6월 26일자로 출원된 미국 일부 계속 출원 제10/608,723호의 이득을 청구하고; 상기 특허 출원은 2002년 11월 5일자로 출원된 미국 일부 계속 출원 제10/288,606호의 이득을 청구하고; 상기 특허 출원은 2000년 5월 10일자로 출원되고 현재 2002년 12월 3일자로 허여된 미국 특허 제6,489, 125 B1호인 미국 일부 계속 출원 제09/568,474호의 이득을 청구하며; 이들의 내용은 본원에 참고로 포함된다.

정부의 권리에 대한 진술

본 발명은 NIH 보조금 번호 PO1 HL 67849-01 하에 정부 지원으로 행해졌다. 따라서, 미국 정부는 본 발명에서 소정 권리를 갖는다.

배경기술

치료법에서의 진보에도 불구하고, 울혈성 심부전은 서방 국가에서 중요한 사망 원인으로 남아있다. 심부전은 미국에서만 500만의 개인에게 영향을 주며, ~50%의 5년 사망률을 그 특징으로 한다 (문헌[Levy et al., Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. N. Engl.J.Med., 347: 1397-402,2002]).

심부전의 중요한 특질은 심근 수축성의 감소이다 (문헌[Gwathmey et al., Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. Circ.Res., 61: 70-76, 1987]). 건강한 심근과, 다른 횡문근에 있어서, 라이아노딘 수용체 (ryanodine receptor, RyR)를 포함하는 근소포체 (sarcoplasmic reticulum, SR) 상의 칼슘 방출 통로는 근육 세포의 수축에의 활동 전위의 커플링 (즉, 흥분-수축 (excitation-contraction, EC) 커플링)을 용이하게 한다. 수축은 칼슘 (Ca^{2+})이 SR로부터 주위 세포질 내로 방출될 때 시작된다. 심부전에서, 수축 이상은 부분적으로는 심장 활동 전위 (action potential, AP)가 수축의 유발을 허용하는 신호 전달계 (signaling cascade)에서의 변경으로부터 생긴다. 특히, 심부전에서, 전세포 Ca^{2+} 과도 전류의 크기가 감소되며 (문헌[Beuckelmann et al., Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure.Circ., 85: 1046-55, 1992]; 문헌[Gomez et al., Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. Science, 276: 800-06, 1997]), 그 지속 기간은 연장된다 (문헌[Beuckelmann et al., Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. Circ., 85: 1046-55, 1992]).

심부전의 일반적인 특징인 심장 부정맥은 구조적으로 정상인 심장에서의 SR Ca^{2+} 누출과 결부된 것으로 공지되어 있다. 이러한 경우, 심실 빈맥의 유발 및 유지에 있어서의 가장 일반적인 기작은 비정상적 자율성이다. 유발성 부정맥으로 공지되어 있는 비정상적 자율성의 하나의 형태는 SR Ca^{2+} 의 비정상적인 방출과 결부되어 있으며, 이는 지연된 후탈분극 (delayed after-depolarization) 또는 DAD를 시작한다 (문헌[Fozzard, H. A., Afterdepolarizations and triggered activity. Basic Res. Cardiol., 87: 105-13, 1992]; 문헌[Wit and Rosen, Pathophysiologic mechanisms of cardiac arrhythmias. Am.Heart. 1., 106: 798-811, 1983]). DAD는 심장 활동 전위의 재분극 후에 일어나는 심근세포에서의 비정상적 탈분극이다. DAD로 이어지는 비정상적 SR Ca^{2+} 방출에 대한 분자적 근거는 충분히 설명되지 않았다. 그러나, DAD는 라이아노딘에 의해 차단되는 것으로 공지되어 있으며, 이는 RyR2가 상기의 비정상적인 Ca^{2+} 방출의 병인에서 중

요한 역할을 할 수도 있다는 증거를 제공하는 것이다 (문헌[Marban et al., Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. J. Clin. Invest., 78: 1185- 92, 1986]; 문헌[Song and Belardinelli, ATP promotes development of afterdepolarizations and triggered activity in cardiac myocytes. Am. J. Physiol., 267: H2005-11, 1994]).

인간에 있어서 가장 일반적인 심장 부정맥은 심방 세동 (atrial fibrillation, AF)이다. 이는 질병 및 사망의 주요 원인을 나타낸다 (문헌[Chugh et al., Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. J. Am. Coll. Cardio., 37: 371-78, 2001]; 문헌[Falk, R. H., Atrial fibrillation. N. Engl. J. Med., 344: 1067-78, 2001]). 그러나, 임상적 중요성에도 불구하고, AF의 치료 상의 선택 사항은 부분적으로 그의 근본적인 분자적 기작이 불충분하게 알려져 있다는 사실로 인하여 제한되었다.

심장 질환이 있는 모든 환자 중 대략 50%는 치명적인 심장 부정맥으로 사망한다. 이러한 치명적 심장 부정맥은 흔히 사실 상 심실 부정맥이다. 일부의 경우, 심장에서의 심실 부정맥은 급속하게 치명적일 수도 있으며, 이러한 현상은 "심장성 돌연사 (sudden cardiac death, SCD)"로 칭해진다. 치명적 심실 부정맥 (및 SCD)은 구조적 심장 질환이 있는 것으로 알려져 있지 않은, 그렇지 않을 경우 건강한 젊은 대상에서 또한 발병할 수도 있다. 실제로, 심실 부정맥은 그렇지 않을 경우 건강한 대상에서 돌연사의 가장 일반적인 원인이다.

카테콜아민성 다형 심실 빈맥 (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT)은 구조적으로 정상인 심장을 갖는 대상에서의 유전성 장애이다. 이는 스트레스-유발성 심실 빈맥을 그 특징으로 하는데, 상기 심실 빈맥은 SCD를 야기할 수도 있는 치사성 부정맥이다. CPVT가 있는 대상에서, 육체적 활동 및/또는 스트레스는 양방향 및/또는 다형성 심실 빈맥을 유발하며 이는 탐지가능한 구조적 심장 질환의 부재 하에 SCD에 이른다 (문헌[Laitinen et al., Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103: 485-90, 2001]; 문헌[Leenhardt et al., Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children: a 7-year follow-up of 21 patients. Circulation, 91: 1512-19, 1995]; 문헌[Priori et al., Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 106: 69-74, 2002]; 문헌[Priori et al., Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103: 196-200, 2001]; 문헌[Swan et al., Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. J. Am. Coll. Cardiol., 34: 2035-42, 1999]).

CPVT는 상염색체 우성인 방식으로 주로 유전된다. CPVT가 있는 대상은 운동을 할 때에는 심실 부정맥을 갖지만, 휴식하면 부정맥이 발병되지 않는다. 연관성 연구 및 직접적 서열 결정에 의해 CPVT가 있는 대상에서 염색체 1q42-q43 상의 인간 RyR2 유전자에서 돌연변이가 확인되었다 (문헌[Laitinen et al., Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103: 485-90, 2001]; 문헌[Priori et al., Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103: 196-200, 2001]; 문헌[Swan et al., Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. J. Am. Coll. Cardiol., 34: 2035-42, 1999]).

세 가지 유형의 라이아노딘 수용체가 존재하며, 이들 모두는 고도로 관련이 있는 Ca^{2+} 통로이다. RyR1은 골격근에서 발견되며, RyR2는 심장에서 발견되고, RyR3은 뇌에 위치한다. 제2형 라이아노딘 수용체 (RyR2)가 심장 횡문근에서의 근육 수축과 EC 커플링에 필요한 주요 Ca^{2+} -방출 통로이다.

RyR2 통로는 세포내 Ca^{2+} 저장체를 방출하고, 그럼으로써 근육 수축을 유발하는 SR의 특수 영역 내의 밀집한 배열체 내로 패키징된다(packed) (문헌[Marx et al., Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). Science, 281: 818-21, 1998]). EC 커플링 동안, 영위상 (phase zero)의 AP에서 심장 근육 세포 막의 탈분극은 전압 개폐형 (voltage gated) Ca^{2+} 통로를 활성화시킨다. 다음에는, 상기 통로를 통한 Ca^{2+} 유입에 의해, Ca^{2+} -유도된 Ca^{2+} 방출로 공지된 과정에서 RyR2를 통하여 SR로부터의 Ca^{2+} 방출이 시작된다 (문헌[Fabiato, A., Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol., 245: C1-C14, 1983]; 문헌[Nabauer et al., Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. Science, 244: 800-03, 1989]). 이어서 RyR2-매개된, Ca^{2+} -매개된 Ca^{2+} 방출은 심장 근육 수축에 책임이 있는 수축성 단백질을 활성화시킨다.

RyR2는 4개의 12,000달톤의 FK506 결합 단백질 (FKBP), 구체적으로는 FKBP12.6 (칼스타빈 (calstabin))과 결부된 4개의 565,000달톤의 RyR2 폴리펩티드를 포함하는 단백질 복합체이다. FKBP는 널리 발현되는 시스-트랜스 펩티딜-프롤릴 이소머라아제이며, 다양한 세포 기능의 역할을 한다 (문헌[Marks, A. R., Cellular functions of immunophilins. *Physiol.Rev.*, 76: 631-49, 1996]). FKBP12 단백질은 골격 라이아노딘 수용체인 RyR1 (문헌[Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77: 513-23, 1994]; 문헌[Jayaraman et al., FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol.Chem.*, 267: 9474-77, 1992]); 심장 라이아노딘 수용체인 RyR2 (문헌[Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca (2+)- release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78: 990-97, 1996]); 제1형 이노시톨 1,4,5-트리포스페이트 수용체 (IP3R1)로 공지된 관련된 세포내 Ca²⁺-방출 통로 (문헌[Cameron et al., FKBP 12 binds the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J. Biol.Chem.*, 272: 27582-88, 1997]); 및 제I형 형질전환 성장 인자 베타 (transforming growth factor β , TGF β) 수용체 (T β RI) (문헌[Chen et al., Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.*, 16: 3866-76, 1997])에 단단하게 결합하여 이들의 기능을 조절한다. FKBP12.6은 RyR2 통로에 결합하며 (RyR2 서브유닛 당 1개의 분자), RyR2-통로 기능을 안정화시키며 (문헌[Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77: 513-23, 1994]), 이윅하는 RyR2 통로들 사이의 커플링된 개폐 (gating)를 용이하게 하며 (문헌[Marx et al., Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281: 818-21, 1998]), 그럼으로써 심장 주기의 휴식기 동안 이 통로의 이상 활성화를 방지한다.

RyR2 통로에서의 누출이 질환에 걸린 심장 및 구조적으로 정상인 심장 둘 모두에서 다수의 병적 상태와 결부되는 것이 명백하다. 따라서, RyR2에서의 누출을 복구하는 방법이 수백만의 환자에서의 심부전, 심장 부정맥 및 심장성 돌연사를 치료 또는 예방할 수 있다.

1,4-벤조티아제핀 유도체, JTV-519, 또는 4-[3-(4-벤질피페리딘-1-일)프로피오닐]-7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 일염산염 (k201 또는 ICP-칼스탄 (Calstan) 100으로도 공지되어 있음)은 칼슘-이온 통로의 새로운 조절제이다. 심근 세포에서 Ca²⁺ 수준을 조절하는 것 외에도, JTV-519는 또한 기니아 피그 심실 세포에서 Na⁺ 전류 및 내향 정류성 (inward-rectifier) K⁺ 전류를 조절하며, 기니아 피그 심방 세포에서 지연된-정류성 K⁺ 전류를 저해한다. 연구에 의하면, JTV-519는 카테콜아민-유발성 심근 손상, 심근 손상-유발성 근미소섬유 (myofibrillar) 과다수축, 및 허혈/재관류 손상에 대하여 강한 심장 보호 효과를 갖는다는 것이 밝혀졌다. 실험용의 근미소섬유 과다수축 모델에서, JTV-519는 프로프라놀롤, 베라파밀 및 딜티아젠폴보다 큰 심장 보호 효과를 보여주었다. 실험 데이터는, JTV-519가 동물 모델에서 세포내 Ca²⁺ 과부하의 수준을 감소시킴으로써 심실 허혈/재관류를 효과적으로 예방한다는 것도 시사하고 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

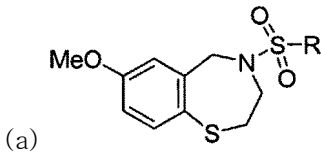
본 발명은 RyR2가 심방 세동, 심실 부정맥 및 운동-유발성 심장 부정맥을 포함하는 심부전 및 심장 부정맥의 치료 및 예방에 있어서의 표적이라는 놀라운 발견에 기초한다. 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 본 발명자들은 7개의 상이한 CPVT 돌연변이를 갖는 돌연변이 RyR2 통로를 만들고 그 기능을 연구하였다. 모든 7개의 돌연변이체는 운동 동안 자극될 때 누출성으로 되는 (칼슘 누출성) 통로로 이어지는 기능적 결합을 갖는다. 본 발명자들의 연구는 먼저 SR 칼슘 누출이 DAD를 야기하는 기작을 확인하는 것이다. 주목할 만하게도, 돌연변이 CPVT 통로에서의 결합은 높은 이환율의 치명적 심장 부정맥을 그 특징으로 하는 질병인 말기 심부전이 있는 환자의 심장에서 이 통로가 누출성 통로처럼 보이게 하였다. 따라서, 본 발명자들은 CPVT에서의 VT에 있어서의 기작이 심부전에서의 VT에 있어서의 기작과 동일하다는 것을 밝혀내었다.

또한 본 발명자들에 의해 JTV-519 (k201 또는 ICP-칼스탄 100), 및 기타 신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체는 RyR2 통로에서의 누출을 복구시킨다는 것이 본원에 개시되어 있다. 본 발명자들이 밝혀낸 바와 같이, JTV-519 및 관련 유도체는 FKBP12.6이 PKA-인산화 RyR2, 및 돌연변이 RyR2에 결합하는 것을 증강시키는데, 상기 돌연변이 RyR2는 그렇지 않을 경우 FKBP12.6에 대하여 감소된 친화도를 갖거나, 그에 결합하지 않는다. 이러한 작용은 치명적 심장 부정맥 (심장성 돌연사 (SCD))을 일으키고 심부전에서 심장 근육 기능 장애 및 심방/심실 세동에 기여하는 RyR2에서의 누출을 수선한다.

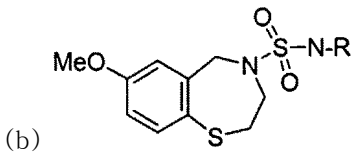
따라서, 일 태양에 있어서, 본 발명은 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양의 JTV-519를 대상에게 투여함으로써 심방 세동이 있거나 그 후보인 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법을 제공하며, 여기서, RyR2는 심방 RyR2이다. 또한 제공되는 것은 심방 세동이 있거나 그 후보인 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법에서의 JTV-519의 용도이다.

다른 태양에 있어서, 본 발명은 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양의 JTV-519를 대상에게 투여하며, 그럼으로써 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방함으로써 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일 실시 형태에 있어서, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양의 JTV-519의 양은 대상에서 심방 세동을 치료 또는 예방하기에 유효한 JTV-519의 양이다.

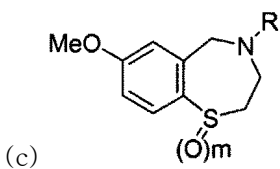
또다른 태양에 있어서, 본 발명은 대상에게 1,4-벤조티아제핀 유도체를 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양으로 투여함으로써 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 1,4-벤조티아제핀 유도체는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군으로부터 선택된다:



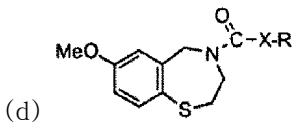
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



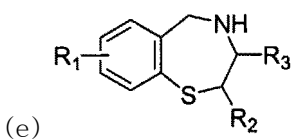
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



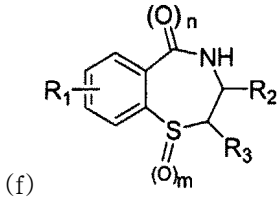
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



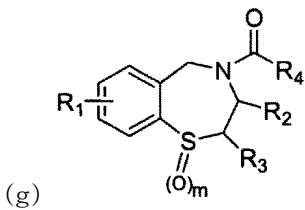
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R_2 는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 또는 아릴임);



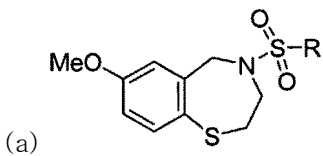
(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m 은 0, 1, 또는 2이며; n 은 0 또는 1임);



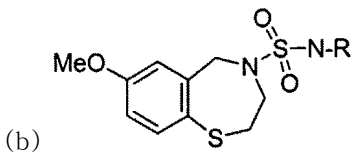
(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m 은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태. 또한 제공되는 것은 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한하거나 방지하는 방법에 있어서의 이러한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 용도이다.

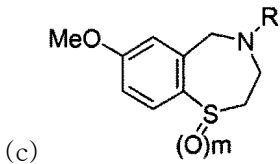
또다른 태양에 있어서, 본 발명은 대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사의 치료 또는 예방 방법으로서, 대상에게 1,4-벤조티아제핀 유도체를 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 1,4-벤조티아제핀 유도체는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군으로부터 선택된다:



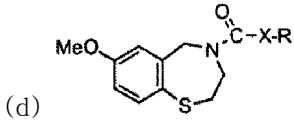
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n 은 0, 1, 2, 또는 3이며, R' 은 알킬 또는 시클로알킬임);



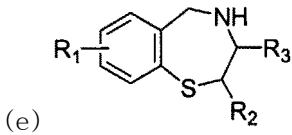
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n 은 0, 1, 2, 또는 3이며, R' 은 알킬 또는 시클로알킬임);



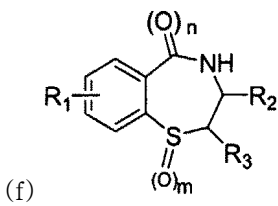
(식 중, R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 또는 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



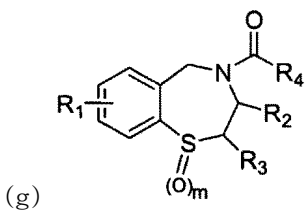
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



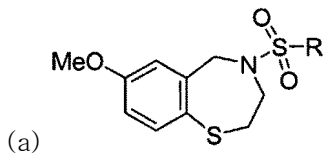
(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



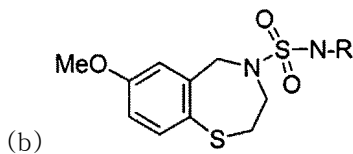
(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₄는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태.

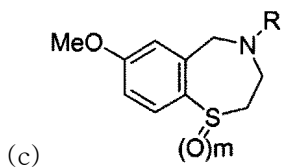
추가로 태양에 있어서, 본 발명은 대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사의 치료 또는 예방 방법으로서, 대상에게 1,4-벤조티아제핀 유도체를 대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 또는 예방하기에 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하며, 상기 1,4-벤조티아제핀 유도체는 하기 (a) 내지 (h)로 이루어진 군으로부터 선택된다:



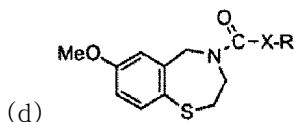
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



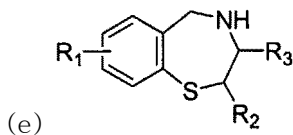
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



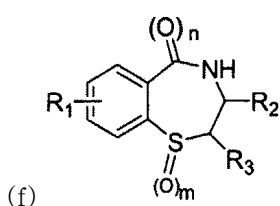
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



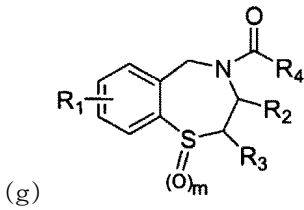
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 이들의 임의의 산화 형태. 또한 제공되는 것은 대상에서 심장 부정맥, 심부전 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 치료 또는 예방하는 방법에 있어서의 이러한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 용도이다.

또다른 태양에 있어서, 본 발명은 심방 세동 또는 심부전의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 확인 방법으로서, (a) RyR2를 포함하는 세포 배양물을 수득하거나 생성하는 단계; (b) 이 세포를 후보 약제와 접촉시키는 단계; (c) 세포에서 RyR2의 인산화를 증가시키는 것으로 공지된 하나 이상의 조건에 세포를 노출시키는 단계; 및 (d) 약제가 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는지를 결정하는 단계에 의한 방법을 제공한다. 일 실시 형태에 있어서, 이 방법은 (e) 약제가 세포에서 RyR2-결부된 생물학적 사건에 영향을 미치는지를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 또한 제공되는 것은 이 방법으로 확인되는 약제와, 심방 세동 및 심부전의 치료 및 예방 방법에 있어서의 이 약제의 용도이다.

또다른 태양에 있어서, 본 발명은 심방 세동 또는 심부전의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 확인 방법으로서, (a) RyR2를 포함하는 동물을 수득하거나 생성하는 단계; (b) 이 동물을 후보 약제와 접촉시키는 단계; (c) 세포에서 RyR2의 인산화를 증가시키는 것으로 공지된 하나 이상의 조건에 동물을 노출시키는 단계; 및 (d) 약제가 동물에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는지를 결정하는 단계에 의한 방법을 제공한다. 일 실시 형태에 있어서, 이 방법은 (e) 약제가 동물에서 RyR2-결부된 생물학적 사건에 영향을 미치는지를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 또한 제공되는 것은 이 방법으로 확인되는 약제와, 심방 세동 및 심부전의 치료 및 예방 방법에 있어서의 이 약제의 용도이다.

본 발명의 추가의 태양이 하기의 설명에 비추어서 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 FKBP12.6^{+/−} 생쥐에서 JVT-519가 운동-유발성 심실 부정맥을 예방한다는 것을 보여준다. (A) 미처리 FKBP12.6^{+/−} 생쥐, JTV-519로 처리된 FKBP12.6^{+/−} 생쥐, 및 JTV-519로 처리된 FKBP12.6^{−/−} 생쥐의 대표적인 보행 심전도. 심박동수, 또는 임의의 측정되는 ECG 파라미터에서의 유의한 차이는 전혀 없었다. (B) 상부의 추적 (tracing): 지속성 다형 심실 빈맥의 예들, 운동 시험 및 1.0 mg/kg의 에피네프린을 이용한 주사에 처해진 미처리 FKBP12.6^{+/−} 생쥐에서 기록하였다. 중간의 추적: 동일한 프로토콜에 따른 JTV-519-처리 FKBP12.6^{+/−} 생쥐의 심전도; 부정맥이 전혀 탐지되지 않았다. 하부의 추적: JTV-519로 처리된 FKBP12.6^{−/−} 생쥐에서의 운동-유발성 심실 빈맥 (ventricular tachycardia, VT). 점선은 도면에 도시되어 있지 않은 16.31초의 VT를 나타낸다. 'P'는 P파를 나타내며, 이는 심실 빈맥 이후의 정상 동율동 (sinus rhythm)을 나타내는 것이다. (C) 각각 JTV-519로 처리하거나 처리하지 않은 FKBP12.6^{+/−} 및 FKBP12.6^{−/−} 생쥐에서, 심장성 돌연사 (좌측), 지속성 심실 빈맥 (> 10회의 심박동수, 중간), 및 비지속성 심실 빈맥 (3-10회의 비정상적 심박동수, 우측)의 정량화를 도시하는 막대 그래프. 미처리 FKBP12.6^{+/−} 생쥐 (n = 10) 또는 JTV-519-처리

FKBP12.6^{-/-} 생쥐 (n = 5)에 비하여, JTV-519로 처리한 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 (n = 9)에서 JTV-519를 이용한 처리에 의해 운동-유발성 및 에피네프린 유발성 부정맥이 완전히 예방된다는 것을 알아야 하는데, 이는 JTV-519가 FKBP12.6을 RyR2에 재결합시킴으로써 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 부정맥 및 돌연사를 예방한다는 것을 시사하는 것이다.

도 2에는 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 RyR2에 대한 FKBP12.6의 친화도를 증가시킴으로써 JTV-519가 운동-유발성의 심장성 돌연사 (SCD)를 예방한다는 것이 도시되어 있다. (A-B) 심장 라이아노딘 수용체 (RyR2)를 RyR2-5029 항체를 사용하여 면역침전시켰다. 각각 JTV-519의 부재 또는 존재 하에서, 휴식 상태 하에서, 그리고 운동 이후에 야생형 (FKBP12.6^{+/+}) 생쥐, FKBP12.6^{+/-} 생쥐, 및 FKBP12.6^{-/-} 생쥐에서 RyR2, PKA-인산화 RyR2 (RyR2-pSer²⁸⁰⁹ 항체), 및 FKBP12.6의 정량화된 양을 나타내는 면역블롯 (A) 및 막대 그래프 (B)가 도시되어 있다. 휴식 상태 하에서는 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 ~70%의 FKBP12.6이 RyR2와 결부되어 있다. 운동 시험 이후에는, RyR2 복합체와 결부된 FKBP12.6의 양이 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 극적으로 감소되었지만, 이는 JTV-519를 이용한 처리에 의해 구조될 수 있다. (C) RyR2 단일 통로는 운동 시험 및 에피네프린 주사 이후 수득되는 심장으로부터 분리하였다. JTV-519로 사전 처리하거나 사전 처리하지 않은 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 유래의 통로와, JTV-519 사전 처리 이후의 FKBP12.6^{-/-} 생쥐 유래의 통로가 도시되어 있다. RyR2-통로의 기능은 JTV-519로 처리한 운동시킨 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 정상화하였다는 것을 알아야 한다. JTV-519 처리 후 운동시킨 FKBP12.6^{-/-} 생쥐 유래의 대표적인 단일 통로는 심장에서의 FKBP12.6이 JTV-519의 작용에 필요하다는 것을 나타낸다. 점선은 불완전한 통로 개방 또는 '서브컨덕턴스 (subconductance)' 개방을 나타내며, 이는 FKBP12.6-고갈 RyR2 통로를 나타내는 것이다. 좌측의 추적은 5.0초를 나타내는 반면, 우측의 추적은 500 msec를 나타낸다. 이 도면에서, Po는 개방 확률이며; To는 평균 개방 시간이며; Tc는 평균 폐쇄 시간이며; c는 폐쇄 상태의 통로이다. (D) 단일 RyR2 통로의 평균 개방 확률을 도시하는 개략적인 막대 그래프 (상기 참조). JTV-519는 심장 이완기의 칼슘 농도 (150 nM)에서 운동 시험 이후 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 유래의 RyR2의 개방 확률을 극적으로 감소시킨다.

도 3에는 PKA-인산화 RyR2 통로에 대한 FKBP12.6의 결합 친화도의 증가에 의해 JTV-519가 RyR2-통로 개폐를 정상화하는 것이 도시되어 있다. (A, B) 개 SR 막 (A) 및 재조합적으로 발현시킨 RyR2 통로 (B)를 전술한 바와 같이 준비하였다 (문헌[Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca (2+) -release channels from cardiac muscle. Circ. Res., 78: 990-97, 1996]). (A) 라이아노딘 수용체 (RyR2)는 인산화 완충제 (8 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 및 50 mM 트리스/PIPES; pH 6.8) 중 PKA 저해제, PKI₅₋₂₄의 존재 또는 부재 하에서 PKA 촉매 서브유닛 (40 U; Sigma Chemical Co., 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)으로 인산화하였다. 샘플을 100,000x g에서 10분 동안 원심분리하고, 이미다졸 완충제 (10 mM의 이미다졸; pH 7)에서 3회 세척하였다. 재조합적으로 발현시킨 FKBP12.6 (최종 농도 = 250 nM)은 상이한 농도의 JTV-519의 부재 또는 존재 하에 이 샘플에 첨가하였다. 60분간의 인큐베이션 후, 샘플을 100,000x g에서 10분 동안 원심분리하고 이미다졸 완충제에서 2회 세척하였다. 샘플을 95℃로 가열하고, SDS-PAGE를 사용하여 크기별로 분획화하였다. 전술한 바와 같이 (문헌[Jayaraman et al., FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). J. Biol. Chem., 267: 9474-77, 1992]), 항-FKBP12.6 항체 (1:1,000) 및 항-RyR2-5029 항체 (1:3,000)를 이용하여 SR 마이크로솜 (microsome)의 면역블로팅을 수행하였다. 이 도면에는 JTV-519가 FKBP12.6의 (A) PKA-인산화 RyR2 (부분적 결합: 100nM; 완전한 결합: 1000 nM) 또는 (B) RyR2-S2809D 돌연변이 통로 - 이는 항시적 PKA-인산화 RyR2 통로임 -에의 결합을 가능하게 한다는 것이 도시되어 있다. (C-E) 특정 PKA 저해제, PKI₅₋₂₄의 존재 하에서의 PKA 인산화 (C)에 비하여, PKA 인산화 이후의 RyR2의 개방 확률 증가 (D)를 나타내는 단일-통로 연구. 단일-통로 기능은 JTV-519의 존재 하에 FKBP12.6과 함께 인큐베이션된 PKA-인산화 RyR2에서 정상화하였다 (E). 통로 개방은 위쪽에 있으며, 대쉬 (dash)는 완전 개방의 수준 (4 pA)을 나타내며, 문자 'c'는 폐쇄된 상태를 나타낸다. 통로는 압축된 (5초, 상부의 추적) 시간 규모 및 확장된 (500 msec, 하부의 추적) 시간 규모에서 도시되며, 기록치는 0 mV에서의 것이다. 크기 도수 분포도 (amplitude histograms) (우측)에 의하면 PKA-인산화 RyR2에서 증가된 활성 및 서브컨덕턴스 개방이 나타났지만, JTV-519 및 FKBP12.6를 이용한 처리 이후에는 그러하지 않았다. (F) 세포질 [Ca²⁺]의 함수로서의 개방 확률의 정상화된 도면. JTV-519의 존재 하에 PKA-인산화 RyR2를 FKBP12.6과 함께 인큐베이션하면 RyR2 활성화의 Ca²⁺-의존성이 우측으로 이동하는데, 이는 비인산화 통로의 Ca²⁺-의존성과 유사하게 된다.

도 4에는 JTV-519가 심부전의 쥐 모델에서 심장 수축성을 개선시킨다는 것이 도시되어 있다. (A) JTV-519 또는 비히클 (대조)을 이용한 4주간의 처리 전후에, 심초음파를 이용하여 중앙-유두 수준에서 심장 이완기의 심근의 단면적을 측정하

였다. 심장 이완기 기능 장애에서의 상대적인 증가는 JTV-519에 의해 저해되었다. (B) 비처리 동물에서 심장 수축 기능이 저하되었지만, JTV-519는 심근 경색 후 (post-myocardial-infarction, post-MI) 심부전 쥐에서 심장 수축 기능을 유의하게 증가시켰다.

도 5에는 JTV-519가 심부전 쥐에서 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 RyR2에의 친화도를 증가시킨다는 것이 도시되어 있다. 증가의 양의 RyR2를 항-RyR2 항체를 사용하여 면역침전시켰다 (A). 대표적인 면역블롯 (A) 및 막대 그래프 (B)는 상이한 실험 군에서 RyR2에 결합된 칼스타빈2 (FKBP12.6) (B, 우측)의 양 및 Ser2809에서의 RyR2의 PKA 인산화의 양 (B, 좌측)을 나타낸다. 심부전에서, RyR2는 PKA에 의해 유의하게 과인산화되며 (B, 좌측), 이는 통로 복합체로부터의 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 해리에 이른다 (B, 우측). JTV-519를 이용한 처리에 의해 FKBP12.6의 RyR2에의 결합 뿐만 아니라, RyR2의 PKA-인산화 상태도 정상화된다. 실험 횟수는 막대 안에 나타내어져 있다. *P < 0.05, HF 대 sham; #P < 0.05, HF+JTV-519 대 HF

도 6에는 심부전에서 JTV-519가 RyR2-통로 개폐를 정상화한다는 것이 도시되어 있다. RyR2 통로는 삼 수술 (삼) 또는 심부전 (heart-failure, HF) 쥐로부터 분리되었다. 대표적인 단일-통로 추적에 의하면, 삼 수술 쥐 (상부)에 비하여, 심부전에서 (중부) RyR2-통로 개방 확률 (Po)이 유의하게 증가된다는 것이 나타났다. 심부전 쥐를 JTV-519로 4주 동안 처리하면 삼 수술 동물의 통로 개방 확률과 유사한 수준으로 통로 개방 확률이 정상화되었다. 각각의 조건에 있어서, 상부의 추적은 5000 ms를 나타내며, 하부의 추적은 200 ms를 나타낸다. 통로 개방은 위를 향한 것이며, 대쉬는 완전한 수준의 통로 개방을 나타내며 (4 pA), 'c'는 폐쇄된 상태의 통로를 나타낸다. 크기 도수 분포도 (우측)는 심부전 심장 유래의 RyR2 통로에서 증가된 Po 및 서브컨덕턴스 개방을 나타내었다.

도 7은 FKBP12.6 (칼스타빈2)의 RyR2 통로에의 결합의 증가에 의해 JTV-519가 RyR2 통로 개폐를 정상화한다는 것이 도시되어 있다. (A) 야생형 RyR2 (RyR2-WT) 통로는 특정 PKA 저해제 PKI₅₋₂₄의 부재 또는 존재 하에 PKA 인산화시키며, 이어서 지시된 농도의 JTV-519의 존재 하에 칼스타빈2 (FKBP12.6)와 함께 인큐베이션하였다. RyR2 면역블롯은 샘플 중 동량의 RyR2를 나타내며; 칼스타빈2 면역블롯은 JTV-519가 칼스타빈2의 PKA-인산화 RyR2에의 부분적인 (100 nM) 또는 완전한 (1000 nM) 재결합을 가능하게 한다는 것을 나타낸다. (B) 항시적-PKA-인산화 RyR2를 모방하는 RyR2-S2809D는 지시된 농도의 JTV-519의 존재 하에 칼스타빈2와 함께 인큐베이션하였다. RyR2 면역블롯은 샘플 중 동량의 RyR2를 나타내며, 칼스타빈2 면역블롯은 JTV-519가 칼스타빈2의 RyR2-S2809D에의 부분적인 (100 nM) 또는 완전한 (1000 nM) 재결합을 가능하게 한다는 것을 나타낸다. (C) [³⁵S]-표지된 칼스타빈2의 결합 곡선은 JTV-519가 PKA-인산화 RyR2 및 RyR2-S2809D 돌연변이 통로에의 칼스타빈2의 결합 친화도를 비-인산화 RyR2-WT에 비견할만한 수준으로 증가시킨다는 것을 도시하고 있다. (D-F) 단일-통로 연구에 의하면, 150 nM [Ca²⁺] (D의 경우 n = 11; E의 경우 n = 12; F의 경우 n = 13)에서 칼스타빈2의 재결합에 의해 PKA-인산화 RyR2-WT의 개방 확률 (Po)을 JTV-519 (1 μM)가 감소시킨다는 것이 나타났다. 통로 개방은 위를 향한 것이며, 대쉬는 완전한 수준의 통로 개방을 나타내며 (4 pA), 'c'는 폐쇄된 상태의 통로를 나타낸다. 크기 도수 분포도 (우측)는 PKA-인산화 RyR2에서 증가된 Po 및 서브컨덕턴스 개방을 나타내며; 이는 JTV-519 (1 μM) 및 칼스타빈2 (FKBP12.6)를 이용한 처리 이후에는 관찰되지 않았다.

도 8에는 심방 조직에서의 RyR2 거대분자 복합체가 도시되어 있다. (A) RyR2는 근소포체 (SR)로부터 면역침전시키고, PKA 또는 시클릭 아데노신 모노포스페이트 (cAMP)로 인산화시켰다. PKA 저해제 (PKI)의 첨가로 인산화 반응을 완전히 차단하였다. (B) RyR2 거대분자 복합체의 성분들은 심방 SR 유래의 RyR2로 동시-면역침전시켰다 (co-immunoprecipitate). 양성 대조는 심방 SR (50%의 면역침전 (IP) 투입물 (input)을 가짐)이었다. 음성 대조는 항원성 펩티드로 차단된 항체로 면역침전되는 샘플을 나타낸다. (C) 칼스타빈2 (FKBP12.6)는 심방 SR 유래의 RyR2로 동시-면역침전시켰다. SDS-PAGE에 의한 크기별 분획화 이전에, 샘플을 PKI의 존재 및 부재 하에 PKA로 인산화하였다. PKA 인산화는 PKI에 의해 저해되는 방식으로 통로 복합체로부터의 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 해리를 야기하였다. + Cont. (CSR) = 심방 SR; + Cont. (FKBP) = 재조합 FKBP; -Cont. = 항원성 펩티드가 사전-흡수된 항체로 수행되는 IP

도 9에는 심방 세동 (AF)에서의 RyR2의 PKA-과인산화가 도시되어 있다. (A) 대조 동물 (대조; n = 6) 및 심방 세동이 있는 개 (A Fib; n = 6) 유래의 면역침전된 (IP) RyR2를 PKA로 인산화하였다. 역-인산화 (back-phosphorylation) 실험에 있어서, 각각의 샘플에서 면역침전되는 RyR2 단백질의 양을 측정하기 위하여, RyR2에 대한 면역블로팅을 동시에 수행하였다. 좌측의 막대 그래프는 역-인산화 연구의 정량적 분석치를 나타낸다. 값들은 면역침전된 단백질의 양에 대하여 조정된, RyR2의 상대적인 PKA 인산화 정도를 나타낸다. AF가 있는 개는 대조에 비하여 PKA 인산화가 130% 증가됨을 나타내었다 (AF의 경우 n = 6; 대조의 경우 n = 6; P = 0.001). 칼스타빈2 (FKBP12.6)는 RyR2로 동시-면역침전시켰다. 동시-면역침전 실험에 있어서, 각각의 샘플로부터 면역침전되는 RyR2 단백질의 양을 측정하기 위하여, RyR2에 대한 면역블롯을 동시에 수행하였다. 우측의 막대 그래프는 동시-면역침전 실험의 정량적 분석치를 나타낸다. 값들은 면역침전된 단백질의 양에 대하여 조정된, RyR2로 동시-면역침전되는 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 양을 나타낸다. RyR2에의 칼스타빈2

(FKBP12.6)의 결합은 대조에 비하여 AF 개에서 72%의 감소를 나타내었다 (대조의 경우 $n = 6$; AF의 경우 $n = 7$; $P < 0.0005$). (B) 심부전의 세팅에서 심방 세동이 있는 환자 유래의 인간 심방 조직 (A Fib; $n = 5$) 및 정상 심장을 갖는 환자 유래의 심방 조직 (대조; $n = 3$)을 사용하여 동일한 시리즈의 실험을 수행하였다. 좌측의 막대 그래프는 역-인산화 연구의 정량적 분석치를 나타낸다. AF가 있는 인간은 대조에 비하여 PKA 인산화가 112% 증가함을 나타내었다 (A Fib의 경우 $n = 5$; 대조의 경우 $n = 3$; $P = 0.002$). 우측의 막대 그래프는 칼스타빈2 (FKBP12.6) 동시-면역침전 실험의 결과를 나타낸다. AF가 있는 인간은 RyR2에 결합된 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 양이 70% 감소됨을 나타내었다 (A Fib의 경우 $n = 5$; 대조의 경우 $n = 3$; $P < 0.0001$).

도 10에는 AF에서의 RyR2-통로의 기능의 변경이 도시되어 있다. (A) 상부의 추적은 대조의 좌심방 유래의 대표적인 RyR2 통로를 도시하며; 하부의 추적은 AF 통로이다. 이 추적들의 우측에 상응하는 전류 크기 도수 분포도가 있다. (B) 막대 그래프는 대조 개 (Cont.) 및 만성 심방 세동 (A Fib)이 있는 개에 있어서 개방 확률 (P_o) 및 개방 빈도 (F_o)의 정량적 분석치를 나타낸다. 5마리의 A Fib 개 유래의 17개의 통로와, 5마리의 대조 개 유래의 11개의 통로를 연구하였다. 대조 개 유래의 통로는 활성 증가를 보이지 않았다. 이와는 대조적으로, A Fib 개 유래의 17개의 통로 중 15개의 통로 (88%)가 유의하게 증가된 개방 확률 (AF: 0.39 ± 0.07 ; 대조: 0.009 ± 0.002 ; $P < 0.001$) 및 개폐 빈도 (AF: $21.9 \pm 4.6 \text{ s}^{-1}$; 대조: $1.6 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$; $P < 0.002$)를 나타내었다.

도 11에는 JTV-519를 이용한 처리에 의해 AF에서 정상적인 RyR2 기능이 회복됨이 도시되어 있다. (A) (심장 이완 동안 일어나는 바와 같이) 150 nM의 세포질 Ca^{2+} 농도에서, 그리고 0.25 mM의 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 존재 하에서의, 개심장 유래의 단일 RyR2 통로의 대표적인 추적은 PKA 인산화 후 유의하게 증가된 개방 확률 (P_o) 및 개폐 빈도를 보여준다 (대조: $P_o = 0.3 \pm 0.2 \%$, $n = 6$; PKA: $P_o = 14.8 \pm 3.2 \%$, $n = 7$; $P < 0.001$). 하부의 추적에서의, 그리고 모든 지점 (all-point) 도수 분포도에서의 보다 높은 시간 해상도에서 보여지는 바와 같이, RyR2의 PKA 인산화는 칼스타빈2 (FKBP12.6)가 RyR2로부터 해리될 때 관찰되는 부분적 개방 (서브컨덕턴스 상태)으로 이어진다. JTV-519 (1.0 mM)는 PKA-처리 RyR2와 비교하여, PKA-인산화 RyR2의 통로 활성을 회복시켰으며 ($P_o = 0.8 \pm 0.3\%$; $n = 6$; $P < 0.001$); JTV-519는 또한 비인산화 대조 통로에서 보여지는 바와 같이 도수 분포도에서 별개의 전류 크기 분포로 이어졌다. 상부 및 하부의 추적은 각각 5000 msec 및 200 msec를 나타내며; 폐쇄 상태는 'c'로 나타내어지며; 완전한 통로 개방은 막대에 의해 나타내어지는 바와 같이 4 pA의 수준으로 상향 편향되는 것으로 도시되어 있으며; 하부의 추적의 점선은 1 pA의 단계의 부분적 개방을 나타낸다. (B) 재조합 칼스타빈2 (FKBP12.6)를 1,4-벤조티아제핀 유도체, JTV-519의 존재 또는 부재 하에 PKA-인산화 RyR2와 함께 인큐베이션하였다. 항-칼스타빈2 항체를 이용한 면역블로팅에 의하면, JTV-519는 재조합 칼스타빈2 (FKBP12.6)가 PKA-인산화 RyR2에 결합하는 것을 허용한다는 것이 나타났다. JTV-519의 부재 하에서는 칼스타빈2 결합은 일어나지 않았다.

도 12에는 신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체가 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 PKA-인산화 심장 라이아노딘 수용체 (RyR2)에의 결합을 0.5 nM에서 유도한다는 것이 도시되어 있다. 상부 패널 = 2.0 nM의 각각의 화합물; 하부 패널 = 0.5 nM의 각각의 화합물.

도 13에는 생쥐에서 1,4-벤조티아제핀 유도체, S36 (도 15에 도시되어 있음)이 200 nM에서 심장 부정맥을 예방한다는 것이 도시되어 있다. 막대 그래프에는 나타내어진 바와 같이 약물 처리를 하거나 하지 않은 FKBP12.6^{+/+} 생쥐에서의 운동 시험 동안의 부정맥 사건 또는 심장성 돌연사가 도시되어 있다. 좌측 그래프에는 심장성 돌연사가 도시되어 있으며, 중간 그래프에는 지속성 VT가 도시되어 있으며; 우측 그래프에는 비지속성 VT가 도시되어 있다. 숫자는 각각의 군에서 사용된 동물의 총 마릿수를 나타낸다.

도 14에는 JTV-519가 심부전의 쥐 모델에서 심장 수축성을 개선시킨다는 것이 도시되어 있다.

도 15에는 본 유도체의 구조가 도시되어 있다.

발명에 관한 상세한 설명

단백질 키나아제 (PKA)에 의한 심장 RyR2의 인산화는 "대항 (fight) 또는 도주 (flight)" 응답의 중요한 부분이며, 상기 인산화는 주어진 트리거에 있어서 방출되는 Ca^{2+} 의 양을 증대시킴으로써 심장 EC-커플링 증진 (gain)을 증가시킨다 (문헌 [Marks, A. R., Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. Circ. Res., 87: 8-11, 2000]). 이러한 신호 전달 경로는 스트레스에 응답하는 교감 신경계의 활성화가 스트레스 응답의 신진대사적 요구를 충족시키는 데 필요한 심박출량 증가로 이어지는 기작을 제공한다. 카테콜아민의 결합시, β_1 - 및 β_2 -아드레날린성 수용체가 자극성

G 단백질, G_{α_s} 를 통하여 아데닐릴 사이클라아제를 활성화시킨다. 아데닐릴 사이클라아제는 세포내 사이클릭 아데노신 모노포스페이트 (cAMP)의 수준을 증가시키며, 이는 cAMP-의존성 PKA를 활성화시킨다. RyR2의 PKA 인산화는 통로 복합체로부터의 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 해리에 의해 통로의 개방 확률을 증가시킨다. 이는 다시 Ca^{2+} -의존성 활성화에 대한 RyR2의 민감성을 증가시킨다 (문헌[Hain et al., Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. J. Biol. Chem., 270: 2074-81, 1995]; 문헌[Valdivia et al., Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg^{2+} and phosphorylation. Science, 267: 1997-2000, 1995]; 문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]).

심부전 심장 (예를 들어, 심부전이 있는 환자 및 심부전의 동물 모델에서)은 만성적 교감 신경계 과항진 자극 (chronic hyperadrenergic stimulation)을 포함하는 비적응 응답 (maladaptive response)을 그 특징으로 한다 (문헌[Bristow et al., Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. N. Engl. J. Med., 307: 205-11, 1982]). 심부전에서의 이러한 자극의 병원성에 대한 중대성은 베타-아드레날린 자극 및 좌심실 심근벽 긴장도 (myocardial wall stress)를 감소시키며, 심실 리모델링을 강력하게 반대가 되게 하는 치료 전략에 의해 지지된다 (문헌[Barbone et al., Comparison of right and left ventricular responses to left ventricular assist device support in patients with severe heart failure: a primary role of mechanical unloading underlying reverse remodeling. Circulation, 104: 670-75, 2001]; 문헌[Eichhorn and Bristow, Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure. Circulation, 94: 2285-96, 1996]). 심부전에서, 만성 베타-아드레날린 자극은 심장에서 베타-아드레날린 수용체의 활성화와 결부되며, 이는 G-단백질과의 커플링을 통하여 아데닐릴 사이클라아제를 활성화시키고 그럼으로써 세포내 cAMP의 농도를 증가시킨다. cAMP는 cAMP-의존성 PKA를 활성화시키며, 이는 RyR2의 과인산화를 유발하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이, 만성 심부전은 만성 교감 신경계 과항진 상태이며 (문헌[Chidsey et al., Augmentation of plasma norepinephrine response to exercise in patients with congestive heart failure. N. Engl. J. Med., 267: 650, 1962]) 이는 RyR2의 PKA 인산화를 포함하여 여러 병리학적 결과로 이어진다 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]).

RyR2의 PKA 과인산화는 심부전에서 억제된 수축 기능 및 부정맥에 기여하는 요인으로 제안되었다 (문헌[Marks et al., Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? Circulation, 105: 272-75, 2002]; 문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]). 이러한 가설과 일관되게, 심부전에서의 RyR2의 PKA 과인산화가 심장 이식을 받은 심부전이 있는 환자 및 동물 모델 둘 모두에서 생체 내에서 입증되었다 (문헌[Antos et al., Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. Circ. Res., 89: 997-1004, 2001]; 문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]; 문헌[Ono et al., Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} release in heart failure. Cardiovasc. Res., 48: 323-31, 2000]; 문헌[Reiken et al., Beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure. Circulation, 104: 2843-48, 2001]; 문헌[Semsarian et al., The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. J. Clin. Invest., 109: 1013-20, 2002]; 문헌[Yano et al., Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. Circulation, 102: 2131-36, 2000]).

심부전 심장에서, PKA에 의한 RyR2의 과인산화는 RyR2 통로로부터의 조절 FKBP12.6 서브유닛의 해리를 유발한다 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]). 이는 RyR2 통로의 생물물리학적 특성을 두드러지게 변화시킨다. 그러한 변화는 Ca^{2+} -의존성 활성화에 대한 민감성 증가로 인한 개방 확률 (P_o)의 증가 (문헌[Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994]; 문헌[Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle. Circ. Res., 78: 990-97, 1996]); 서브컨덕턴스 상태로 이어지는 통로의 불안정화; 및 결합 EC 커플링 및 심장 기능 장애로 이어지는 통로의 커플링된 개폐의 손상 (문헌[Marx et al., Coupled gating

between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). Science, 281: 818-21, 1998])에 의해 입증된다. 이와 같이, PKA-과인산화 RyR2는 저수준의 Ca^{2+} 의 자극에 대하여 매우 민감하며, 이는 그 자신을 과인산화된 통로를 통한 SR Ca^{2+} 누출로서 분명하게 보여주는 것이다.

심부전에서의 스트레스에 대한 비적응성 응답은 통로의 거대분자 복합체로부터의 FKBP12.6의 고갈로 이어진다. 이는 Ca^{2+} -유도된 Ca^{2+} 방출에 대한 RyR2의 민감성에 있어서 좌측으로 이동되게 하며, 이는 낮은 내지는 온화한 $[\text{Ca}^{2+}]$ 에서 보다 큰 활성을 갖는 통로로 이어진다 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]; 문헌[Yamamoto et al., Abnormal Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum in tachycardia-induced heart failure. Cardiovasc. Res., 44: 146-55, 1999]; 문헌[Yano et al., Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. Circulation, 102: 2131-36, 2000]). 시간이 지남에 따라, RyR2를 통한 "누출"의 증가는 SR Ca^{2+} 함량의 보다 낮은 수준으로의 재설정으로 이어지며, 이는 다시 EC 커플링 증진을 감소시키고 심장 수축성 손상에 기여한다 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]).

특히 "누출성"인 RyR2 통로의 부차 집단은 심장 주기의 휴식기인 심장 이완기 동안 SR Ca^{2+} 를 방출할 수 있다. 이는 지연성 후탈분극 (delayed after-depolarization, DAD)으로 공지된 심근세포 막의 탈분극으로 이어지며, 이는 치명적 심실 부정맥을 일으키는 것으로 공지되어 있다 (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]).

구조적으로 정상인 심장에 있어서, 유사한 현상이 연구 중일 수 있다. 구체적으로는, 운동 및 스트레스는 심장에서 베타-아드레날린성 수용체를 활성화시키는 카테콜아민의 방출을 유도하는 것으로 공지되어 있다. 베타-아드레날린성 수용체의 활성화는 RyR2 통로의 과인산화에 이른다. 증거는 베타-아드레날린성 수용체의 활성화에 의해 생기는 RyR2의 과인산화가 심장 주기의 이완기에서 돌연변이 RyR2 통로가 개방될 가능성을 더 커지게 하여, 부정맥 가능성을 증가시킨다는 것을 또한 시사하고 있다.

본 발명자들은 본원에서 JTV-519가 MI 후 심부전의 쥐 모델에서 심부전을 예방한다는 것을 보여주었다. 이 동물 모델에서, JTV-519는 심장 이완 기능 장애 감소 및 심장 수축 기능 개선의 견지에서 심장 기능을 개선시켰다. 또한, 본 발명자들은 골격근 형태의 RyR2 통로, RyR1이 PKA-과인산화로 인하여 심부전 골격근에서 또한 결합성 (또는 누출성)이라는 것을 입증하였다 (문헌[Reiken et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12 from the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. J. Cell Biol., 160: 919-28, 2003]). 따라서, JTV-519가 심부전이 있는 환자에서 골격근 기능을 또한 개선시킬 것이라 기대된다. 이와 같이, JTV-519는 각각 상,하지 (extremities) 및 횡경막에서 골격근 쇠약에 의해 야기되는 심부전 - 조기 피로 및 호흡 곤란 (shortness of breath) - 의 두 가지 주요한 증상을 치료하기 위한 신규한 치료적 접근법을 제공한다.

상기에 논의되어 있는 바와 같이, 카테콜아민성 다형 심실 빈맥 (CPVT)은 구조적으로 정상인 심장을 갖는 대상에서의 유전성 장애이다. 이는, 심장성 돌연사 (SCD)를 야기할 수 있는 치사적 부정맥인 스트레스 유발성 심실 빈맥을 그 특징으로 한다. 근소포체 (SR) 상에 위치하는 RyR2 통로에서의 돌연변이가 CPVT와 연관되어 있다.

CPVT가 있는 모든 대상은 운동-유발성 심장 부정맥을 갖는다. 본 발명자들은 이전에 운동-유발성 부정맥 및 돌연사 (CPVT가 있는 환자에서)가 RyR2에 대한 FKBP12.6의 친화성 감소에 의해 생기는 것임을 보여주었다. 본원에서, 본 발명자들은 아데노신-3',5'-모노포스페이트-의존성 단백질 키나아제 (PKA)에 의한 인산화의 결과로서 운동이 RyR2를 활성화시킨다는 것을 입증하였다.

CPVT에서 치명적 심장 부정맥에 대한 근본적인 분자적 기작을 결정하기 위하여, 본 발명자들은 CPVT-결부된 돌연변이 RyR2 통로 (예를 들어, S2246L, R2474S, N4104K, R4497C)를 연구하였다. 기초적인 조건 하에서 평면형 지질 이중막에 있어서 정상적인 기능을 갖는 돌연변이 RyR2 통로는 야생형 통로에 비하여 PKA 인산화에 의한 활성화에 보다 민감하여, 증가된 활성 (개방 확률) 및 연장된 개방 상태를 나타내었다. 또한, PKA-인산화 돌연변이 RyR2 통로는 RyR2 통로의 생리학적 저해제인 Mg^{2+} 에 의한 저해에 대하여 내성을 가지며, (폐쇄 상태의 통로를 안정화하는) FKBP12.6에의 결합 감

소를 나타내었다. 이러한 발견은, 운동 동안, RyR2 통로가 PKA-인산화될 때, 돌연변이 CPVT 통로가 심장 주기의 이완기(심장 이완기)에서 개방될 가능성이 더 커서, SR Ca^{2+} 누출에 의해 유발되는 부정맥의 발병 가능성이 증가된다는 것을 나타낸다. 심부전은 전 세계적으로 주요한 사망 원인이기 때문에, RyR2에서의 누출을 복구하는 방법은 수백만의 환자에 있어서 치명적 부정맥을 예방할 수 있다.

본 발명자들은 또한 본원에서 1,4-벤조티아제핀 유도체인 실험 약물, JTV-519가 FKBP12.6 유전자에 대하여 이형 접합성인 생쥐에서 치사적 심실 부정맥을 예방한다는 것을 입증하였다. 심부전의 동물 모델에서 JTV-519가 심장 이완성 SR Ca^{2+} 누출을 감소시킨다는 것이 최근에 밝혀졌다(문헌[Yano et al., FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*, 107: 477-84, 2003]; 문헌[Kohno et al., A new cardioprotective agent, JTV519, improves defective channel gating of ryanodine receptor in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 14: 14, 2002]). 본 연구에서, 본 발명자들은 심장 부정맥 모델에서 JTV-519의 효능 및 작용 기작을 조사하였다. 이들의 생체 내 실험에서, 본 발명자들은 그램 단위의 양의 JTV-519 (4-[3-(4-벤질피페리딘-1-일)프로피오닐]-7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 일염산염)가 필요하였다.

심장 부정맥에 대한 시험을 위하여, FKBP12.6^{+/-} 및 FKBP12.6^{-/-} 생쥐를 이전에 기술된 운동 프로토콜에 처하였다(문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113: 829-40, 2003]; 문헌[Mohler et al., Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, 421: 634-39, 2003]). FKBP12.6^{+/-} 생쥐 중 88% (8마리 중 7마리)가 이 프로토콜 동안 심실 빈맥 (VT) 또는 실신 사건을 나타낸 반면, JTV-519로 사전 처리한 FKBP12.6^{+/-} 생쥐는 어느 생쥐도 부정맥 또는 실신 사건을 드러내지 않았다 (6마리 중 0마리) (도 1). 또한, FKBP12.6^{+/-} 생쥐 중 90% (10마리 중 9마리)가 운동 동안 또는 운동 이후 사망하였으며, 반면, JTV-519-처리된 FKBP12.6^{+/-} 생쥐는 어느 생쥐도 사망하지 않았다 (9마리 중 0마리) (도 1C). 사전 처리한 FKBP12.6^{+/-} 생쥐와는 반대로, JTV-519로 처리한 FKBP12.6^{-/-} 생쥐는, JTV-519 처리에도 불구하고, 100% (5마리 중 5마리)가 스트레스 프로토콜 동안 VT가 발병하여 사망하였다 (도 1C). 이를 종합해 보면, 상기 데이터는 FKBP12.6이 JTV-519의 항-부정맥 작용에 필요하다는 것을 시사한다.

JTV-519의 항-부정맥 특성을 추가로 특성화하기 위하여, 본 발명자들은 FKBP12.6^{+/+}, FKBP12.6^{+/-}, 및 FKBP12.6^{-/-} 생쥐를 프로그래밍된 전기 자극 프로토콜에 처하였다. VT는 0.5 mg/kg의 이소프로테레놀의 주사 이후 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 중 71% (7마리 중 5마리)에서 신속한 고속 조율 (rapid overdrive pacing)에 의해 유발되었지만, 야생형 FKBP12.6^{+/+} 생쥐에서는 그러하지 않았다 ($P < 0.05$, $n = 5$). JTV-519 (0.5 mg/kg/h)로 사전 처리된 FKBP12.6^{+/-} 생쥐는 미처리 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에 비하여 고속 조율 유발성 VT에 대하여 유의하게 덜 민감하였다 (7마리 중 1마리 대 7마리 중 5마리; $P < 0.05$). 이와는 대조적으로, JTV-519로 사전 처리된 FKBP12.6^{-/-} 생쥐 중 67% (6마리 중 4마리)는 고속 조율 동안 VT가 발병되었다.

VT는 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 중 71% (7마리 중 5마리)에서 단일 조기 박동으로 유발될 수 있었다. VT는 JTV-519로 사전 처리된 7마리의 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서는 전혀 관찰되지 않았다. 이중 조기 박동 프로토콜 (S1-S2-S3)을 이용하여, VT를 100%의 미처리 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 (7마리 중 7마리)에서 재현가능하게 유발하였다. JTV-519를 이용한 처리는 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 (7마리 중 7마리)에서 유도성 VT를 완전히 제거하였다. JTV-519 처리는 FKBP12.6^{-/-} 생쥐에서 VT를 예방하지 못하였는데, 이는 FKBP12.6이 JTV-519의 항-부정맥 작용에 필요하다는 개념을 지지하는 것이다.

이전에, 본 발명자들은 Ser2809에서의 RyR2의 PKA 인산화가 RyR2 통로로부터의 FKBP12.6의 해리를 야기한다는 것을 입증하였다(문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76, 2000]). 본 연구에 있어서, JTV-519 (0.5 mg/kg/h)를 이용한 사전 처리는 FKBP12.6^{+/-} 및 FKBP12.6^{-/-} 생쥐에서 RyR2의 PKA 인산화 정도에 영향을 주지 못하였다 (도 2). FKBP12.6^{+/+} 생쥐와 비교하여, FKBP12.6^{+/-} 생쥐 유래의 RyR2 복합체는 운동 이후 FKBP12.6를 유의하게 더 고갈시켰다 ($*P < 0.05$). 그러나, JTV-519를 이용한 사전 처리는 운동 동안 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 RyR2 거대분자 복합체로부터의 FKBP12.6의 손실을 방지하였다 (도 2; $*P < 0.05$).

운동에 처해진 FKBP12.6^{+/-} 생쥐 유래의 RyR2 통로의 개방 확률 (Po)은 운동시킨 FKBP12.6^{+/+} 생쥐 유래의 통로에 비하여 유의하게 증가하였다 (+/- : 0.47±0.12, n = 11; +/+ : 0.04±0.01, n = 13; P < 0.05). 운동시킨 FKBP12.6^{+/-} 생쥐를 JTV-519 (0.5 mg/kg/h)로 처리하면, 운동시킨 비처리 생쥐에 비하여 통로의 Po가 유의하게 감소되었다 (0.02±0.01, n = 13) (도 2). 이러한 관찰은 RyR2 복합체에서의 FKBP12.6의 양의 증가와 일치한다 (도 2). 이와는 대조적으로, 운동시킨 FKBP12.6^{-/-} 생쥐의 JTV-519 처리는 낮은 Po를 갖는 통로로 이어지지 않았다.

전하 캐리어로서 Ca²⁺를 사용하여, 150 nM의 낮은 cis (세포질) [Ca²⁺]를 갖는 RyR2 단일 통로를 조사하였다. 이러한 조건은, 심장 부정맥을 일으킬 수 있는 심장 이완기 SR Ca²⁺ 누출을 방지하기 위하여 RyR2 통로가 낮은 개방 확률을 가져야만 할 때의 심장 이완기 동안의 심장에서의 조건을 시뮬레이션하는 것이다. 이와 같이, JTV-519-처리된 운동시킨 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 관찰되는 바와 같이 RyR2 Po에서의 유의한 감소는 RyR2 통로가 심장 이완기 d 동안 "누출성"으로 되지 않을 것임을 시사하는 것이며, 이는 부정맥이 관찰되지 않는다는 것과 일치한다.

JTV-519가 VT를 예방하는 기작을 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 야생형 RyR2 (RyR2-WT) 통로들의 PKA 인산화를 이용하는 운동 조건을 시뮬레이션하였다. 이어서, PKA-인산화 RyR2 통로들을 농도가 증가하는 JTV-519의 존재 하에 FKBP12.6 (250 nM)과 함께 배양하였다. 100 nM 또는 1,000 nM JTV-519와 함께 배양하면 FKBP12.6이 PKA-인산화 RyR2에 결합하는 것이 유도된다 (도 3). 또한, JTV-519는 FKBP12.6이 돌연변이 RyR2-S2809D 통로들에 결합하는 것을 유도하며, 상기 돌연변이 RyR2-S2809D 통로들은 항시적-PKA-인산화 RyR2 통로들을 모방한다 (도 3).

JTV-519의 첨가에 의해 PKA-인산화 RyR2 통로들에 대한 FKBP12.6의 친화도가 유의하게 증가하였다. FKBP12.6이 상기 통로들에 결합하는 데 있어서 해리 상수 (K_d)는 RyR2-WT + PKA + PKI₅₋₂₄ (PKA 억제제)의 경우에는 148±59.0nM이고; RyR2-WT + PKA의 경우에는 1972±39.9 nM이며; RyR2 + PKA + JTV-519의 경우에는 158±56.4nM이었다 (JTV-519를 이용한 PKA-인산화 통로들에 대한 PKA-인산화 통로들의 경우에는 P < 0.05이고, n = 2임) (도 3). RyR2-S2809D 돌연변이 통로들 (상기 통로들은 항시적-PKA-인산화 RyR2 통로들을 모방함)을 이용하여 유사한 결과들을 획득하였다. FKBP12.6 결합에 대한 K_d는 RyR2-S2809D의 경우에 2123±104 nM이고; RyR2-S2809D + JTV-519의 경우에 428±39 nM이었다. RyR2의 PKA 인산화는 통로 (Po = 0.01±0.002 (PKA + PKI; n = 11) 대 Po = 0.40±0.02 (PKA; n = 12; P < 0.05))을 활성화시켰다. PKA-인산화 RyR2-WT 통로에의 FKBP12.6 (250 nM)의 첨가는 Po를 저하시키지 못하였다. 그러나, 1μM의 JTV-519 + FKBP12.6의 첨가는 PKA-비인산화 통로에 비전되는 수준 (Po = 0.002±0.001; n = 13; P < 0.05)으로 Po를 감소시켰다.

이를 종합해 보면, 본 발명자들의 결과에서는 RyR2 거대분자 복합체로부터의 FKBP12.6의 고갈은 1,4-벤조디아제핀 유도체인 JTV-519로 처리함으로써 그 반대로 된다는 것이 밝혀졌는데, 상기 RyR2 거대분자 복합체는 FKBP12.6^{+/-} 생쥐에서 증가된 RyR2 개방 확률, 심실 빈맥 및 심장성 돌연사와 결부되어 있다. 따라서, 본 발명자들은 심실 부정맥을 치료하기 위한 신규한 분자적 기작을 확인하였으며, FKBP12.6에 대한 RyR2의 친화도의 증가는 부정맥을 일으키는 심장 이완기 SR 칼슘 누출을 방지한다. 상기 RyR2 거대분자 복합체에서의 FKBP12.6의 결핍은 심부전 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]) 및 유전성 운동-유발성 심실 부정맥 (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003])에서의 일반적인 특징이므로, JTV-519가 심장성 돌연사를 일으키는 RyR2에서의 분자적 결함을 치료하는 신규한 특징의 방법을 제공할 것이라 기대된다.

상기에 논의되어 있는 바와 같이, 심방 세동은 인간에서 가장 일반적인 형태의 심장 부정맥이다. 현재까지, 구조적인 리모델링 및 전기적인 리모델링은 지속성 빈맥을 수반하며 (문헌[Rensma et al., Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. Circ. Res., 62: 395-410, 1988]), 구조적인 리모델링 및 전기적인 리모델링은 심방 불응성의 단축, 불응성의 맥박수 관련 적응성의 상실 (문헌[Wijffels et al., atrial fibrillation begets atrial fibrillation: a study in awake chronically instrumented goats. Circulation, 92: 1954-68, 1995]; 문헌[Morillo et al., Chronic rapid atrial pacing: structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. Circulation, 91: 1588-95, 1995]; 문헌[Elvan et al., Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs: electrophysiological remodeling. Circulation, 94: 2953-60, 1996]; 및 문헌[Gaspo et al., Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. Circulation, 96: 4027-35, 1997]), 및 재진입 파소 (wavelet) 파장

의 단축을 포함한다. 이러한 리모델링은 아마도 심방 세동의 발생, 유지 및 진행에서 중요하다. 또한, 칼슘 처리는 심방 세동에서 전기적인 리모델링에서 역할을 하는 것으로 제안되어 왔다 (문헌[Sun et al., Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia, *Circulation*, 98: 719-27, 1998]; 문헌[Goette et al., Electrical remodeling in atrial fibrillation: time course and mechanisms. *Circulation*, 94: 2968-74, 1996]; 문헌[Daoud et al., Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation-induced electrical remodeling in humans. *Circulation*, 96: 1542-50, 1997]; Yu et al., Tachycardia-induced change of atrial refractory period in humans: rate dependency and effects of antiarrhythmic drugs. *Circulation*, 97: 2331-37, 1998]; 문헌[Leistad et al., Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644. *Circulation*, 93: 1747-54, 1996]; 및 문헌[Tieleman et al., Verapamil reduces tachycardia-induced electrical remodeling of the atria. *Circulation*, 95: 1945-53, 1997]).

변경된 이온 통로 기능에 기초한 다양한 기작이 AF에 대하여 제안되어 왔다. 예를 들어, 연구에 의하면 연장된 심방 빈맥 세팅에서 L-형 Ca^{2+} 전류 ($I_{\text{Ca,L}}$) 및 과도 전류성 외향 전류 (I_{to})가 감소됨이 밝혀졌다 (문헌[Yue et al., Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.*, 81: 512-25, 1997]). $I_{\text{Ca,L}}$ 의 관찰된 하향조절은 적어도 부분적으로는 AF를 수반하는 전기적인 리모델링 과정의 특징인 AERP의 단축 및 불응성의 맥박수 관련 적응성 손실 둘 모두를 설명하는 것이 가능하다 (문헌[Yue et al., Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.*, 81: 512-25, 1997]). 신속한 심방 조율 (rapid atrial pacing)의 실험용 동물 모델에서와 AF가 있는 인간의 임상 연구에서, 베라파밀 (verapamil)은 전기적 리모델링을 저해하는 것으로 나타났으며, 따라서 이는 Ca^{2+} 과부하가 연루됨을 시사한다 (문헌[Daoud et al., Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation-induced electrical remodeling in humans. *Circulation*, 96: 1542-50, 1997]; 및 문헌[Leistad et al., Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644. *Circulation*, 93: 1747-54, 1996]).

근섬유막 이온 통로 (sarcolemmal ion channel)은 심방 빈맥 및 AF를 수반하는 상기 리모델링에서 명백히 중요한 역할을 하는 반면, 세포내 Ca^{2+} 처리에서의 기여도는 완전히 연구되어 있지 않다. 그러나, 세포내 Ca^{2+} 이상 처리가 상기 리모델링 과정에서 역할을 한다는 것을 시사하는 증거가 존재한다. 예를 들어, 이전의 연구에서는 맥박수 적응성의 손실은 변경된 근섬유막 이온 전류, 예를 들어 $I_{\text{Ca,L}}$ 및 I_{to} 에 의해서는 완전히 설명될 수 없다는 것이 입증되었다 (문헌[Ramirez et al., Mathematical analysis of canine atrial action potentials: rate, regional factors, and electrical remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279: H1767-85, 2000]; 및 문헌[Kneller et al., Remodeling of Ca^{2+} -handling by atrial tachycardia: evidence for a role in loss of rate-adaptation. *Cardiovasc. Res.*, 54: 416-26, 2002]). 또한, 연구에서는 세포내 칼슘 처리에서의 빈맥-유도된 변화가 또한 맥박수 적응성의 손실에 상당히 기여하는 것으로 나타났으며, 이러한 사실은 AF의 병인에 결정적인 것으로 생각된다 (문헌[Sun et al., Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation*, 98: 719-27, 1998]; 문헌[Kneller et al., Remodeling of Ca^{2+} -handling by atrial tachycardia: evidence for a role in loss of rate-adaptation. *Cardiovasc. Res.*, 54: 416-26, 2002]; 및 문헌[Hara et al., Steady-state and nonsteady-state action potentials in fibrillating canine atrium: abnormal rate adaptation and its possible mechanisms. *Cardiovasc. Res.*, 42: 455-69, 1999]).

이전의 연구에서, 조율-유도 AF의 개 모델로부터의 심방은 라이아노딘의 존재에 의해 반대로 될 수 있는 AP-기간-맥박수 적응성 손실 및 변경된 AP 특성을 보여 주었다. 이러한 관찰은, 적어도 부분적으로는 상기 변화가 세포내- Ca^{2+} -의존성 과정에서 생긴다는 것을 시사한다 (문헌[Hara et al., Steady-state and nonsteady-state action potentials in fibrillating canine atrium: abnormal rate adaptation and its possible mechanisms. *Cardiovasc. Res.*, 42: 455-69, 1999]). 또한, 지속성 조율-유도 심방 빈맥을 갖는 개의 심방에서는 Ca^{2+} 과도 전류가 상당히 감소한다 (문헌[Sun et al., Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. *Circulation*, 98: 719-27, 1998]).

RyR2를 통해 SR로부터 Ca^{2+} -유도 Ca^{2+} 의 방출을 일으키는 근섬유막 Ca^{2+} 유입에 의해 Ca^{2+} 과도 전류가 생기기 때문에 이전 연구 결과는 세포내 칼슘 처리의 변경은 빈맥-유도 리모델링 과정을 수반한다는 것을 시사한다. 이 같은 이상하게 감소된 Ca^{2+} 과도 전류는 단리된 심방 근세포 (atrial myocyte)의 억제된 단축과 결부되어 있었으며, 이는 칼슘 처리가

AF를 수반하는 심방 수축 기능 장애 (atrial contractile dysfunction)에 기여한다는 것을 나타낸다 (문헌[Sun et al., Cellular mechanisms of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia. Circulation, 98: 719-27, 1998]).

본원에 개시되어 있는 바와 같이, 본 발명자들의 연구는 칼슘 항상성이 지속성 심방 빈맥 및 AF를 수반하는 전기적 및 수축성 리모델링에서 중요한 역할을 한다는 확실한 증거를 제공한다. RyR2에 의한 SR Ca^{2+} 저장체의 방출은 심근성 Ca^{2+} 항상성의 필수 구성성분으로서 나타난다. RyR2의 조절은 개 및 인간의 심실 조직에서 잘 특성화되었으며, RyR2는 심부전 및 심장성 돌연사를 비롯한 심실심근 질환에 연루되어 있었다 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]; 문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]; 및 문헌[Reiken et al., Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human cardiac failure. Circulation, 107: 2459-66, 2003]). Ca^{2+} 처리가 심방 부정맥에서 역할을 한다는 증거에도 불구하고, 이 세팅에서 심방 라이아노딘 수용체의 조절 및 기능은 잘 특성화되어 있지 않았다. 특히, 본 발명 이전에는 AF에서의 이러한 통로의 역할이 공지되어 있지 않았다.

본원에서 본 발명자들은 심실심근에서와 같이 심방의 세포내-칼슘 방출 통로가 거대분자 복합체로서 존재한다는 것을 확인하였다. 본 발명자에 의한 동시-면역침전 실험의 결과에서는 심방 RyR2가 주요 조절 서브유닛인 칼스타빈2 (FKBP12.6); 포스포타아제인 PP1 및 PP2A; 및 PKA의 조절 및 촉매 서브유닛과 물리적으로 결부된다는 것이 나타났다. 또한, 본 발명자들은, 내인성 PKA가 심방 근포소체 (atrial sarcoplasmic reticulum)에서 RyR2를 특이적으로 인산화시켜, 상기 통로 복합체에서 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 고갈을 초래한다는 것을 입증하였다. 이러한 발견은, 심방에서의 수축 기능의 조절은 심방 RyR2의 PKA 인산화에 의해 심실심근에서 관찰된 것과 유사한 방식으로 조절될 수 있다는 것을 시사한다 (문헌[Brillantes, et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK-506 binding protein, Cell, 77: 513-523, 1994]).

본 연구에서 본 발명자들은, RyR2의 PKA 과인산화는 개 AF 심방에서 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 고갈과 결부되어 있다는 것을 관찰하였다. 이와 유사하게, 본 발명자들은 심부전 세팅에서 AF를 갖는 인간 유래의 심방 조직에서 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 고갈과 결부된 PKA 과인산화를 관찰하였다. RyR2의 이러한 비정상적인 PKA 과인산화의 기능적인 결과는 심장에서 심장 이완을 시뮬레이션하는 조건 (낮은 세포질 Ca^{2+})에서의 증가된 개방 확률이었다. 이 같은 기능적 비정상 은 칼스타빈2 (FKBP12.6)가 고갈된 통로의 특성이다 (문헌[Brillantes, et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK-506 binding protein, Cell, 77: 513-523, 1994]). AF에서의 이러한 비정상적인 통로 기능은, PKA 과인산화 세팅에서 RyR2로부터의 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 손실이 Ca^{2+} -유도 Ca^{2+} 의 방출에 대한 민감도의 증가에 대하여 이차적인 심장 이완기 Ca^{2+} 누출의 경향을 나타내는 "누출성 통로"로 이어진다는 것을 입증하는 이전의 연구와 일치한다 (문헌[Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994]; 및 문헌[Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle. Circ. Res., 78: 990-97, 1996]). 또한, 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 부재 하에서는, 통로는 일제히 개방 및 폐쇄 (커플링된 개폐)되기 보다는 확률론적으로 개방 및 폐쇄 (개폐)되는 것으로 알려져 있다 (문헌[Marx et al., Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). Science, 281: 818-21, 1998]).

증거는 AF는 전형적으로 조기 심방 기외수축 (premature atrial extrasystole)에 의해 시작된다는 것을 시사하며 (문헌[Bennett and Pentecost, The pattern of onset and spontaneous cessation of atrial fibrillation in man. Circulation, 41: 981-88, 1970]), 상기 조기 심방 기외수축은 후-탈분극 (after-depolarization)으로부터 유래하는 것으로 알려져 있다 (문헌[Cranefield, P. F., Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. Circ. Res., 41: 415-23, 1977]). 상기 부정맥의 종결 직후 심방 기외수축에 의한 AF의 재발이 관찰되었으며 (문헌[Timmermans et al., Immediate reinitiation of atrial fibrillation following internal atrial defibrillation. J. Cardiovasc. Electrophysiol., 9: 122-28, 1998]; 문헌[Wellens et al., Atrioverter: an implantable device for the treatment of atrial fibrillation. Circulation, 98: 1651-56, 1998]), 초기 후-탈분극과 특이적으로 연관되어 있었다 (문헌[Burashnikov and Antzelevitch, Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. Circulation, 107: 2355-60, 2003]). 기외수축은 단축된 심방의 유효

한 불응 기간의 세팅에서 특히 AF를 일으킬 가능성이 있는데 (문헌[Wang et al., Regional and functional factors determining induction and maintenance of atrial fibrillation in dogs. Am. J. Physiol., 271: H148-58, 1996]), 이는 심방의 전기적인 리모델링을 수반하는 것과 유사하다.

상기에 논의되어 있는 바와 같이, "누출성" PKA-과인산화 RyR2로부터의 심장 이완기 Ca^{2+} 이상 방출은 치사적 심실 부정맥을 일으키기에 충분한 지연성 후-탈분극 (DAD)으로 이어진다는 증거가 있다 (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]). 기능 장애성 RyR2 칼슘 처리는 또한 유사한 방식으로 AF를 시작하는 기능을 할 수 있는 것으로 생각된다. 본 발명자에 의해 관찰된 비정상적인 통로 기능은, 상기 부정맥과 결부된 리모델링 과정에서 필수적인 기능 장애성 칼슘 처리에 기여한다는 것 이외에도 AF를 일으키는데에 필요한 DAD 원인을 제공함으로써 AF의 병인에 기여할 수 있다. 심부전 세팅에서 AF를 갖는 인간 유래의 심방 심근은 PKA-과인산화되고 칼스타빈2 (FKBP12.6)가 고갈된다는 본원에 제시된 증거를 고려해 볼 때, 기능 장애성 RyR2 기능은 부분적으로는 AF 환자에서의 심방 부정맥의 빈도를 설명할 수 있다.

RyR2 칼슘 처리에서의 분자수준의 특이적 결함을 복구하는 JTV-519의 능력으로 인해 JTV-519는 신규한 치료제에 대한 흥미로운 후보가 되었다. JTV-519의 잠재성은 점점 증가하는 주요 심장 질환에 의해 강조되고 있으며, 상기 심장 질환은 심부전 및 치명적인 심실 부정맥을 포함하는 것으로, RyR2의 기능 장애성 조절을 포함한다 (즉, PKA 과인산화 및 상기 통로 복합체로부터의 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 손실이 이들의 병인에 대한 중요한 기여자일 수 있음).

JTV-519의 초기 연구는 이의 항-허혈 특성 (개인적인 서신, Aetas)에 초점이 맞춰져 있었다. 그러나, 더욱 최근에는 JTV-519는 심방 세동의 멸균 심낭염 개 모델에서 AF의 유도를 저해하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Kumagai et al., Antiarrhythmic effects of JTV-519, a novel cardioprotective drug, on atrial fibrillation/ flutter in a canine sterile pericarditis model. J. Cardiovasc. Electrophysiol., 14: 880-84, 2003]). 그러나, 이러한 연구에서는 JTV-519가 AF의 유도 및 유지에 강하게 영향을 주는 기작을 정의하지 못하였다.

본원에서 입증된 바와 같이, 본 발명자들은 JTV-519 (1 μ M)로 처리하면 시험관 내에서 정상적인 개 심근으로부터 단리한 PKA-인산화 RyR2에 재조합 칼스타빈2 (FKBP12.6)가 결합한다는 것을 결정하였다. 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 PKA-인산화 RyR2와의 결부는 미처리 통로에서는 나타나지 않았다. 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 상기 통로 복합체와의 재-결부는 PKA-과인산화 통로에서 정상 기능을 회복시킨다. 따라서, RyR2-통로 기능의 회복은 Kumagai et al.에 의해 관찰된 바와 같이 AF의 유도 및 유지를 저해하는 JTV-519의 능력에서 역할을 할 수 있다 (문헌[Antiarrhythmic effects of JTV-519, a novel cardioprotective drug, on atrial fibrillation/flutter in a canine sterile pericarditis model. J. Cardiovasc. Electrophysiol., 14: 880-84, 2003]).

심방 세동은 복잡한 전기생리학적 과정이지만, 이의 분자적 병인은 다인성일 가능성이 있다. 심근성 Ca^{2+} 이상 처리는 상기 질환 과정에 상당히 기여하는 것으로 나타난다. 본 발명자들의 연구는, RyR2의 PKA 과인산화로부터 유래하는 세포내- Ca^{2+} -방출 통로의 이상 기능이 AF에서의 리모델링 과정에 기여할 수 있고 부정맥의 트리거로서 강력하게 작용할 수 있다는 것을 시사하고 있다.

JTV-519를 이용한 신규한 치료 및 예방 방법

상기에 논의되어 있는 바와 같이, 본 발명은 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한하거나 방지하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "FKBP12.6"란 용어는 "FKBP12.6 단백질" 및 "FKBP12.6 유사체" 둘 모두를 포함한다.

본원에서 달리 언급하지 않는 한, "단백질"이란 용어는 단백질, 단백질 도메인, 폴리펩티드 또는 펩티드, 및 이의 임의의 단편을 포함해야 한다. "FKBP12.6 유사체"란 용어는 상기 FKBP12.6 단백질의 기능적 변이체로, FKBP12.6 생물 활성을 가지며 상기 FKBP12.6 단백질과 60% 이상의 아미노산 서열 상동성을 갖는다. 본원에서 또한 사용된 바와 같이, "FKBP12.6 생물 활성"이란 용어는, 비록 친화도가 FKBP12.6과는 다를지라도 본원에서 기술된 분석 조건하에서 미인산화되거나 비인산화된 RyR2와 물리적으로 결부되거나 결합하는 능력 (즉, 음성 대조의 배경 결합보다 약 2배의 결합, 또는 더욱 바람직하게는 약 5배의 결합)을 보여주는 단백질 또는 펩티드의 활성을 지칭한다.

또한, 본원에서 사용된 바와 같이, "RyR2"는 "RyR2 단백질" (예를 들어, 심방 RyR2 단백질 또는 심실 RyR2 단백질) 및 "RyR2 유사체" 둘 모두를 포함한다. "RyR2 유사체"는 RyR2 단백질의 기능적 변이체로, RyR2 생물 활성을 가지며 RyR2

단백질과 60% 이상의 아미노산 서열 상동성을 갖는다. 본원에서 사용된 바와 같이, "RyR2 유사체"란 용어는 RyR2의 골결근 이소폼(isoform)인 RyR1 및 RyR3을 포함한다. 본 발명의 RyR2는 미인산화되거나, 인산화되거나(예를 들어, PKA에 의한 인산화), 또는 과인산화될 수 있으며(예를 들어, PKA에 의한 과인산화); 바람직하게는, RyR2는 인산화되거나 과인산화된다. 본원에서 또한 사용된 바와 같이, "RyR2 생물 활성"이란 용어는 비록 친화도가 RyR2와는 상이할 지라도 본원에서 기술된 분석 조건하에서 FKBP12.6과 물리적으로 결부되거나 결합하는 능력(즉, 음성 대조의 배경 결합보다 약 2배의 결합, 또는 더욱 바람직하게는 약 5배의 결합)을 보여주는 단백질 또는 펩티드의 활성을 지칭한다.

상기에 기술되어 있는 바와 같이, 상기 심장 라이아노딘 수용체인 RyR2는 12,000-달톤의 FKBP12.6 단백질 4개와 결부된 565,000-달톤의 RyR2 단백질 4개를 포함하는 단백질 복합체이다. FK506 결합 단백질(FKBP)은 광범위하게 발견되는 시스-트랜스 펩티딜-프롤릴 이소머라아제(isomerase)이고, 다양한 세포 기능을 수행한다. FKBP12.6 단백질은 RyR2에 견고하게 결합되어 있으며 RyR2의 기능을 조절한다. FKBP12.6은 RyR2 서브유닛 당 하나의 분자로 상기 RyR2 통로에 결합하고, RyR2-통로 기능을 안정화시키며, 이웃하는 RyR2 통로 사이의 커플링된 개폐를 용이하게 하여, 심장 주기 중 휴식기 동안에 상기 통로의 이상 활성화를 방지한다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, "RyR2-결합 FKBP12.6"이란 용어는 RyR2 사량체와 결부되어 있는 FKBP12.6의 사량체 또는 RyR2 단백질 서브유닛에 결합되어 있는 FKBP12.6 단백질 분자를 포함한다. "RyR2-결합 FKBP12.6"이란 용어는 또한 FKBP12.6 단백질 분자에 결합되어 있는 RyR2 단백질 서브유닛, 또는 FKBP12.6 사량체와 결부되어 있는 RyR2 사량체를 포함한다. 따라서, "대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소"란 용어는 대상에서 FKBP12.6-결합 RyR2 수준의 감소, 및 대상에서 FKBP12.6-RyR2 복합체 수준의 감소를 포함한다.

본 발명의 방법에 따르면, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 "감소"는 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 검출 가능한 감소, 축소 또는 저하를 지칭한다. 이 같은 감소가 JTV-519의 투여에 의해 임의의 방식으로 멈추거나, 방해되거나, 방해를 받거나, 막히거나 감소하게 되었을 때 상기 감소가 대상에서 제한되거나 방지되어(하기에 기술된 바와 같이), 대상에서의 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준은 그렇지 않는 경우에 JTV-519의 부재하에서의 수준보다 높다. 대상에서의 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준은 대상의 혈액(순환), 조직 및 세포(예를 들어 세포질 또는 핵)에서의 RyR2-결합 FKBP12.6 수준을 비롯한 대상에서의 총 수준을 지칭한다. 이어, 예로서 대상에서의 RyR2-결합 FKBP12.6의 전체 수준의 감소는 대상의 혈액, 조직 및/또는 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소에 의해 달성될 수 있다.

대상에서의 RyR2-결합 FKBP12.6 수준은 본원에 개시된 분석법 및 검출 방법뿐만 아니라, 공지된 선행기술(예를 들어, 면역학적 기술, 혼성화 분석, 면역침전, 웨스턴블롯 분석, 형광-이미지화 기술, 및/또는 방사선 검출법 등)로부터 용이하게 결정되는 방법을 비롯한 표준 분석법 및 기술에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 당업계에 공지된 표준 방법을 이용하여 대상의 세포로부터 단리 및 정제될 수 있으며, 상기 공지된 방법은 세포로부터의 추출(예를 들어, 상기 단백질을 가용화시키는 세제에 의한 추출) 이후에 필요한 경우 친화도에 의한 컬럼 상에서의 정제, 크로마토그래피(예를 들어, FTLC 및 HPLC), 면역침전(항체에 의한 면역침전), 및 침전(예를 들어, 이소프로판올, 및 트리클로르산 같은 시약에 의한 침전)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 상기 단백질의 단리 및 정제 후에 전기영동(예를 들어, SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서의 전기영동)을 할 수 있다. 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소, 또는 이의 제한 및 방지는, 치료제/방지제(예를 들어, 하기에 기술된 방법에 따른 JTV-519 또는 다른 1,4-벤조티아제핀 유도체)의 투여 이전에 검출되는 RyR2-결합 FKBP12.6의 양을 상기 치료제/방지제의 투여 이후의 적절한 시점에 검출되는 양과 비교함으로써 결정될 수 있다.

본 발명의 방법에서, 대상(예를 들어, 대상의 세포)에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소는, 예를 들어 대상에서의 FKBP12.6과 RyR2의 해리를 저해하거나, 상기 대상에서 FKBP12.6과 RyR2의 결합을 증가시키거나, 또는 상기 대상에서 RyR2-FKBP12.6 복합체를 안정화시킴으로써 제한되거나 방지될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "해리를 저해하기"란 용어는 대상에서 RyR2 분자로부터 FKBP12.6 서브유닛의 물리적인 해리 또는 분리를 차단하거나, 감소시키거나, 저해하거나, 제한하거나, 또는 방지하는 것을 포함하며, 상기 대상에서 FKBP12.6 서브유닛으로부터 RyR2 분자의 물리적인 해리 또는 분리를 차단하거나, 감소시키거나, 저해하거나, 제한하거나, 또는 방지하는 것을 포함한다. 본원에서 또한 사용된 바와 같이, "결합을 증가시키기"란 용어는 상기 대상에서 FKBP12.6과 물리적으로 결부되는 인산화된 RyR2의 능력(예를 들어, 음성 대조의 배경 결합보다 약 2배의 결합, 또는 더욱 바람직하게는 약 5배의 결합)을 증강시키거나, 증가시키거나 또는 개선시키는 것을 포함하며, 상기 대상에서 인산화된 RyR2와 물리적으로 결부되는 FKBP12.6의 능력(예를 들어, 음성 대조의 배경 결합보다 약 2배의 결합, 또는 더욱 바람직하게는 약 5배의 결합)을 증강시키거나, 증가시키거나 또는 개선시키는 것을 포함한다.

부가적으로, 본 발명의 방법에서, 대상(예를 들어, 대상의 세포)에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소는, 상기 대상에서 인산화된 RyR2의 수준을 직접적으로 감소시키거나, 상기 대상에서 인산화된 RyR2의 수준을 간접적으로 감소시킴으로써(예를 들어, 효소(예를 들어, PKA), 또는 상기 세포에서 인산화된 RyR2의 기능 및 수준을 조절하거나 조정하는 다른

내인성 분자를 표적으로 설정함으로써) 제한되거나 방지될 수 있다. 바람직하게는, 상기 대상에서의 인산화된 RyR2의 수준은 본 발명의 방법에서는 적어도 10% 정도 감소한다. 더욱 바람직하게는, 상기 인산화된 RyR2의 수준은 적어도 20% 정도 감소한다.

본 발명의 방법에 따르면, RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소는 대상 (예를 들어, 대상의 세포)에서 제한되거나 방지된다. 본 발명의 대상은 양서류, 조류, 어류, 포유류 및 유대류를 비롯한 임의의 동물일 수 있지만, 포유류 (예를 들어, 인간; 고양이, 개, 원숭이, 생쥐 또는 쥐와 같은 가축; 또는 소와 돼지와 같은 시판용 동물)가 바람직하다. 본 발명의 특정 실시 형태에 있어서, 상기 대상은 심장 질병을 갖거나 그 후보이다. "심장 질병"의 예로는 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전, 및 운동-유발성의 심장성 돌연사를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

심장 부정맥은 심박동수 또는 심박동 리듬에서의 이상으로서 나타나는 심장의 전기적 활성의 장애이다. 빈맥 (예를 들어, 심방 빈맥, 접합부 (결절성) 빈맥, 심실 빈맥, 및 발작성 빈맥)은, 특히 심박동수가 분당 100 미만인 경우에 심장 작용이 과도하게 빠른 것과 결부된 질병이다. 빈맥은 상기 정상적인 심박동 리듬에서의 이상과 결부된 빈맥이다. 운동-유발성 심장 부정맥은 대상이 육체 운동을 하는 동안 및 운동을 한 후에 발병하는 심장 질병 (예를 들어, 심장성 돌연사로 이어지는 임의의 질병을 비롯한 심실 세동 또는 심실 빈맥)이다.

심방 세동은 빈맥의 한 예이다. 더욱 상세하게는, 심방 세동은 비정상적이고 불규칙한 심박동 리듬과 결부된 질병이며, 이때 전기적 신호가 심장의 상심실 또는 심방 전역에서 무질서하게 생성된다. 심방 세동의 일반적인 증세로는 호흡 곤란 (빠르고 불규칙한 심장 박동으로 인해 불안감)을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 심방 세동은 또한 심장에서 뇌로 흐르는 혈액의 응고를 초래하여, 심장발작을 일으킨다. 현재 심방 세동의 치료는 위험인자의 조절, 심박동수를 낮추고/거나 심박동 리듬을 정상 리듬으로 바꾸기 위한 약물 투여, 및 혈액 응고와 결부된 합병증의 예방 등을 포함한다.

심부전은 심장의 수축기능 (수축성)의 감소에 의해 나타나는 질병이다. 심부전의 증상으로는 호흡곤란, 운동 내구력 감소, 및 조기 근육 피로를 들 수 있다.

심장 질병의 "후보" (예를 들어, 심장 부정맥 또는 심부전)는 심장 질병을 일으킬 위험이 있는 것으로 알려져 있거나, 간주되거나 또는 의심되는 대상이다. 심장 질환의 후보의 예로는 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥) 및/또는 심부전을 앓고 있는 것으로 의심되는 동물/사람, 및 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전, 및/또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 일으킬 위험이 있는 것으로 알려져 있거나, 간주되거나 또는 의심되는 동물/사람을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

운동-유발성 심장 부정맥의 "후보"는 육체 운동을 하는 도중 및 운동 이후에 심장 부정맥에 걸릴 위험이 있는 것으로 알려져 있거나, 간주되거나 또는 의심되는 대상이다. 운동-유발성 심장 부정맥의 후보 인자의 예로는 카테콜아민 다형 심실 빈맥 (CPVT)을 앓고 있는 것으로 알려진 동물/인간; 및 육체 운동을 하는 도중 및 운동 이후에 심장 부정맥에 걸릴 위험이 있는 것으로 알려져 있거나, 간주되거나 또는 의심되며, 운동을 할려고 하거나 현재 운동 중이거나 또는 운동을 막 끝낸 동물/인간을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 상기에 논의되어 있는 바와 같이, CPVT는 구조적으로 정상인 심장을 갖는 개인에서의 유전 질환이다. 이는 스트레스-유발성 심실 빈맥, 즉 심장성 돌연사를 일으킬 수 있는 치명적인 부정맥을 그 특징으로 한다. CPVT를 앓고 있는 대상에서, 육체 운동 및/또는 스트레스는 검출 가능한 구조적인 심장 질환없이 심장성 돌연사 (SCD)로 이어지는 양방향성 및/또는 다형 심실 빈맥을 유도한다. CPVT를 앓고 있는 개인들은 운동을 하는 경우에는 심실 부정맥을 앓게 되지만, 휴식을 취하는 경우에는 부정맥이 발병하지 않는다.

본 발명의 방법에서, 대상의 세포는 바람직하게는 횡문근 세포이다. 횡문근은, 수축성 근섬유의 반복단위 (근절)이 세포 전역에서 일정하게 배열되어 있어 광학 현미경 수준에서 관찰될 수 있는 가로 또는 세로 줄무늬를 생성하는 근육이다. 횡문근 세포의 예로는 수의 (골격)근 세포 및 심근세포를 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 실시 형태에 있어서, 본 발명의 방법에 사용된 세포는 인간 심근 세포이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "심근세포"란 용어는 심장의 심근에서 발견되는 것과 같은 심근섬유를 들 수 있다. 심근 섬유는 사이원반 (intercalated disk)에서 끝과 끝이 연결된 연속적인 심근세포 (즉, cardiomyocyte)의 세로 이루어져 있다. 이러한 원반은 2종류의 세포 연결부 (cell junction), 즉 이들의 가로 부분을 따라 확장된 확장 데스모솜 (expanded desmosome) 및 이의 가장 큰 부분이 이들의 세로 부분을 따라 놓여 있는 갭 연결부 (gap junction)을 갖는다.

본 발명의 방법에서, RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소는 대상에 JTV-519를 투여함으로써 대상 (예를 들어, 대상의 세포)에서 제한되거나 방지되지만, 이어 이는 상기 대상의 세포와 JTV-519 사이의 접촉을 허용할 수 있다. k201으로도 공지된 JTV-519 (4-[3-(4-벤질피페리딘-1-일)프로필]-7-메톡시-2,3,4,5-테트라하이드로-1,4-벤조디아제핀 모노하이드로클로라이드)는 1,4-벤조디아제핀의 유도체이고, 칼슘-이온 통로의 조절제이다. 심근세포에서 Ca^{2+} 수준을 조절하는 것 이외에, JTV-519는 기니아 피그의 심실 세포에서 Na^+ 전류 및 내향성 정류형 K^+ 전류를 조절하고, 기니아 피그의 심방 세포에서의 지연성 정류형 K^+ 전류를 저해한다. FK506 및 라파마이신은 본 발명의 대상에서 상기 RyR2-FKBP12.6 복합체를 안정화시키는 기타 화합물을 고안하는데 사용될 수 있다. FK506 및 라파마이신 둘 모두는 RyR2로부터 FKBP12.6을 해리시킨다. 이들 약제와 구조적으로 관련이 있는 화합물을 고안하고/하거나 스크리닝하는 것이 가능하지만, 역효과를 갖는다.

본 발명의 방법에서, JTV-519는 JTV-519 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 치료 조성물에 의해 대상에 투여될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 상기 조성물의 다른 성분들과 상용성일 수 있다는 견지에서 "허용 가능"해야하지만, 이의 수령인에게 해롭지 않아야 한다. 본원에서 이용되는 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 약학 제형용 물질로서 사용되는 다양한 유기물 또는 무기물로부터 선택되며, 이들 물질들은 진통제, 완충제, 결합제, 분산제, 희석제, 유화제, 부형제, 증량제, 글리칸트, 가용제, 안정제, 현탁제, 긴장제 (tonicity agent), 비히클 (vehicle) 및 증점제로서 혼입될 수 있다. 필요한 경우, 산화방지제, 방향제, 착색제, 착향 개량제, 방부제 및 감미제와 같은 약학 첨가제가 또한 첨가될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체의 예로는 카르복실메틸 셀룰로즈, 결정성 셀룰로즈, 글리세린, 아라비아 고무, 락토즈, 마그네슘 스테아레이트, 메틸 셀룰로즈, 분말, 생리식염수, 알긴산나트륨, 수크로즈, 전분, 활석 및 물 등을 들 수 있다.

본 발명의 약학 제형은 약학 분야에서 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 JTV-519는 담체, 또는 현탁액 또는 용액과 같은 희석제와 함께 사용될 수 있다. 선택적으로는, 하나 이상의 필수 성분 (예를 들어, 완충제, 방향제, 계면 활성제 등)이 또한 첨가될 수 있다. 담체의 선택은 투여 경로에 따라 결정된다.

JTV-519는 상기 대상에서의 표적 세포 (예를 들어, 심근세포)를 상기 JTV-519와 생체내에서 접촉시킴으로써 대상에 투여될 수 있다. JTV-519는 단백질, 핵산 및 기타 약제의 도입 및 투여용으로 이용되는 공지된 방법을 이용하여 대상의 세포와 접촉 (세포에 도입)될 수 있다. 세포를 JTV-519와 접촉시키는 방법 (JTV-519로 세포를 치료하는 방법)의 예로는 흡착, 전기 천공 (electroporation), 침지 (immersion), 주사, 삽입, 리포솜 전달 (liposome delivery), 형질감염 (transfection), 수혈 (transfusion), 백터 및 기타 약제 전달 비히클 및 방법을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

상기 표적 세포가 대상의 특정 부위에 위치하였을 때, 주사 또는 몇몇 다른 수단 (예를 들어, 상기 JTV-519를 혈액 또는 다른 체액에 도입함으로써)에 의해 상기 세포에 상기 JTV-519를 직접 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 상기 표적 세포는 대상의 심장 조직에 포함될 수 있으며, 공지된 기술분야로부터 용이하게 선택된 표준 검출 방법에 의해 대상의 심장 조직에서 검출될 수 있으며, 상기 표준 검출 방법의 예로는 면역학적 기술 (예를 들어, 면역조직화학적 염색 (Immunohistochemical staining)), 형광-이미지화 기술, 및 현미경법을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

부가적으로, 본 발명의 JTV-519는 공지된 과정에 의해 인간 또는 동물 대상에 투여될 수 있으며, 상기 공지된 과정으로는 경구 투여, 비경구 투여 및 경피 투여를 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 상기 JTV-519는 근막외 (epifascial), 관절낭내 (intracapsular), 두개내 (intracranial), 피내 (intracutaneous), 경막내 (intrathecal), 근육내, 안와내 (Intraorbital), 복강내, 척추내, 줄기세포내 (intrastemal), 혈관내 (intravascular), 정맥내, 실질내 (parenchymatous), 피하, 또는 설하(sublingual) 주사에 의해 또는 카테터 (catheter)에 의해 비경구 투여된다. 일 실시 형태에 있어서, 상기 약제는 대상의 심장으로 삽입된 카테터를 통해 심근세포로의 표적 전달에 의해 대상에 투여된다.

경구 투여의 경우, JTV-519 제형은 캡슐제, 정제, 분말제, 과립제 또는 현탁제로 조제될 수 있다. 상기 제형은 락토즈, 만니톨, 옥수수 전분, 또는 감자 전분과 같은 통상적인 첨가제를 포함할 수 있다. 상기 제형은 또한 결정성 셀룰로즈, 셀룰로즈 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴과 같은 결합제로 조제될 수 있다. 부가적으로는, 상기 제형은 옥수수 전분, 감자 전분, 또는 소듐 카복시메틸셀룰로즈와 같은 붕해제로 조제될 수 있다. 상기 제형은 또한 이염기성 인산칼슘 무수물 또는 소듐 전분 글리콜레이트로 조제될 수 있다. 최종적으로, 상기 제형은 활성 또는 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제로 조제될 수 있다.

비경구 투여 (즉, 소화관 (alimentary canal) 이외의 경로를 통한 주사에 의한 투여)의 경우, JTV-519는 멸균 수용액과 결합될 수 있으며, 상기 멸균 수용액은 대상의 혈액과 등장성인 것이 바람직하다. 이 같은 제형은 염화나트륨, 글리신 등과 같은 약학적으로 허용 가능한 물질을 포함하고 수용액을 제조하기 위해 생리 조건과 상응하는 완충 pH를 갖는 물에 고체

활성 성분을 용해한 후에 상기 용액을 멸균함으로써 제조할 수 있다. 상기 제형은 임의의 주사형태로 전달될 수 있으며, 상기 주사형태로는 근막외 (epifascial), 관절낭내 (intracapsular), 두개내 (intracranial), 피내 (intracutaneous), 경막내 (intrathecal), 근육내, 안와내 (Intraorbital), 복강내, 척추내, 줄기세포내 (intrastemal), 혈관내 (intravascular), 정맥내, 실질내 (parenchymatous), 피하, 또는 설하 (sublingual) 주사 또는 카테터 (catheter)에 의한 투여를 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

경피 투여의 경우, JTV-519는 상기 JTV-519에 대한 피부의 투과성을 증가시키고 피부를 통해 혈류 내로 상기 JTV-519가 투과하도록 하는, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 이소프로판올, 에탄올, 올레익산, N-메틸피롤리돈 등과 같은 피부 투과 증진제와 결합될 수 있다. 상기 JTV-519/증진제 조성물은 에틸셀룰로즈, 하이드록시 셀룰로즈, 에틸렌/비닐아세테이트, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 중합체 물질과 추가로 조합되어 겔 형태의 조성물을 제공하며, 상기 겔 형태의 조성물은 염화메틸렌과 같은 용매에 용해되고, 목적하는 점도가 되도록 증발시킨 후, 소성물질에 도포하여 패치 (patch)를 제공한다.

본 발명의 방법에 따르면, JTV-519는 대상, 특히 대상의 세포에 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소를 제한하거나 방지하는데 효과적인 양으로 상기 대상에 투여될 수 있다 (그리고, JTV-519는 대상의 세포와 접촉될 수 있음). 이러한 양은 공지된 과정에 기초하여 당업계의 숙련자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 상기 과정으로는 시험관내에서 확립된 정량곡선 분석, 및 본원에 개시된 방법 및 분석법을 들 수 있다. 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소를 제한하거나 방지하기에 유효한 JTV-519의 적합한 양은 일일 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 범위일 수 있고/있거나, 약 300 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml 범위의 혈장 중 수준을 달성하기에 충분한 양일 수 있다. 바람직하게는, 상기 JTV-519 양은 일일 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 범위이다.

본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 상기 대상은 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전, 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사와 같은 심장 질병을 앓지 않는다. 이러한 경우, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소를 제한하거나 방지하는데 유효한 양은 대상에서 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥, 심부전, 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 예방하기에 유효한 JTV-519의 양일 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, "심장 질병을 예방하기에 유효한" 약물 (예를 들어, JTV-519)의 양은 심장 질병의 증상 또는 임상적 손상의 발생을 예방하기에 유효한 약물 (예를 들어, JTV-519)의 양을 포함한다. 예를 들어, 상기 심장 질환이 심방 세동인 경우에 심방 세동을 예방하기에 유효한 JTV-519의 양은 대상에서 두근거림 및/또는 혈액 응고를 예방하기에 유효한 JTV-519의 양일 수 있다. 유사하게도, 상기 심장 질환이 운동-유발성 심장 부정맥인 경우에 운동-유발성 심장 부정맥을 예방하기에 유효한 JTV-519의 양은 대상에서 운동-유발성 두근거림, 현기증, 심실 세동, 심실 빈맥 및 심장성 돌연사를 예방하기에 유효한 JTV-519의 양일 수 있다. 부가적으로, 상기 심장 질환이 심부전인 경우에 심부전을 예방하기에 유효한 JTV-519의 양은 대상에서 호흡곤란, 운동 내구력 감소, 및 조기 근육피로를 예방하기에 유효한 JTV-519의 양일 수 있다.

대상에서 심장 질병을 예방하기에 유효한 약물 (예를 들어, JTV-519)의 양은 각각의 경우의 특정 요인에 따라 변할 것이며, 상기 특정 요인으로는 심장 질병의 유형, 대상의 체중, 대상의 질환 중증도, 및 약제 (예를 들어, JTV-519)의 투여 양식을 들 수 있다. 이러한 양은 공지된 과정에 기초하여 당업계의 숙련자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 상기 과정으로는 임상시험, 및 본원에 개시된 방법을 들 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 운동-유발성 심장 부정맥을 예방하는데 유효한 약물 (예를 들어, JTV-519)의 양은 대상에서 운동-유발성 심장 부정맥을 예방하는데 유효한 약물 (예를 들어, JTV-519)의 양이다. 다른 실시 형태에 있어서, 상기 약물 (예를 들어, JTV-519)는 상기 대상에서 적어도 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전, 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사를 예방한다.

RyR2-결합 FKBP12.6을 안정화시키고 RyR2의 역동적인 PKA 인산화 및 탈인산화의 전후 관계에서 균형을 유지하고 회복하는 JTV-519의 능력으로 인해, 상기 JTV-519는 또한 심장 질환의 임상적인 증상을 이미 경험하기 시작한 대상을 치료하는데 유용할 수 있다. 심장 질환의 증상이 대상에서 조기에 충분히 관찰되는 경우, JTV-519는 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 추가적인 감소를 제한하고 방지하는데 효과적일 수 있다.

따라서, 본 발명의 다른 실시 형태에 있어서, 상기 대상은 심장 질병을 앓고 있었다. 예를 들어, 상기 대상은 운동을 해오고 있으며, 현재 운동을 하고 있으며, 운동-유발성 심장 부정맥을 앓고 있다. 이 같은 경우, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6

수준의 감소를 제한하고 방지하기에 효과적인 JTV-519의 양은 상기 대상에서 적어도 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥) 또는 심부전을 치료하기에 유효한 JTV-519의 양일 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, "심장 질병을 치료하는데 유효한" 약물 (예를 들어, JTV-519)의 양은 상기 심장 질병의 임상적인 손상 또는 증상의 발생을 치료하기에 유효한" 약제 (예를 들어, JTV-519)의 양을 포함한다. 예를 들어, 상기 심장 질병이 심방 세동인 경우에 심방 세동을 치료하는데 유효한 JTV-519의 양은 대상에서 두근거림 및/또는 혈액 응고를 완화하거나 개질시키는데 유효한 JTV-519의 양일 수 있다. 유사하게도, 상기 심장 질병이 운동-유발성 심장 부정맥인 경우에 운동-유발성 심장 부정맥을 치료하는데 유효한 JTV-519의 양은 대상에서 운동-유발성 두근거림, 현기증, 심실 세동, 및 심실 빈맥을 완화하거나 개질시키는데 효과적인 JTV-519의 양일 수 있다. 부가적으로, 상기 심장 질병이 심부전인 경우에 심부전을 치료하는데 유효한 JTV-519의 양은 대상에서 호흡곤란, 운동 내구력 감소, 및 조기 근육피로를 완화하거나 개질시키는데 효과적인 JTV-519의 양일 수 있다.

대상에서 심장 질병을 치료하는데 유효한 약물 (예를 들어, JTV-519)의 양은 심장 질병의 유형, 대상의 체중, 대상의 질병 중증도, 및 약물 (예를 들어, JTV-519)의 투여 양식에 따라 달라질 것이다. 이러한 양은 공지된 과정에 기초하여 당업계의 숙련자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 상기 과정으로는 임상실험, 및 본원에 개시된 방법을 들 수 있다. 본 발명의 실시 형태에 있어서, 약물 (예를 들어, JTV-519)는 대상에서 적어도 하나의 심장 질병을 치료한다.

본 발명은 대상에서 적어도 하나의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 또는 심부전)을 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 본 방법은 대상에서 적어도 하나의 심장 질병을 치료하기에 유효한 양으로 대상에게 JTV-519를 투여하는 단계를 포함한다. 대상에서 적어도 하나의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 또는 심부전)을 치료하는데 유효한 JTV-519의 적합한 양은 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일의 범위일 수 있고/있거나, 약 300 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml 범위의 혈청 수준을 달성하기에 충분한 양일 수 있다.

본 발명은 대상에서 적어도 하나의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 본 방법은 대상에서 적어도 하나의 심장 질병을 예방하기에 유효한 양으로 대상에게 JTV-519를 투여하는 단계를 포함한다. 대상에서 적어도 하나의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 예방하는데 효과적인 JTV-519의 적합한 양은 약 5mg/kg/일 내지 약 20mg/kg/일의 범위일 수 있고/있거나, 약 300ng/ml 내지 약 1000ng/ml 범위의 혈청 수준을 달성하기에 충분한 양일 수 있다.

상술한 방법의 다양한 실시 형태에 있어서, 상기 대상에서의 운동-유발성 심장 부정맥은 VT와 결부되어 있다. 바람직한 실시 형태에 있어서, 상기 VT는 CPVT이다. 이러한 방법의 다른 실시 형태에 있어서, 상기 대상은 운동-유발성의 심장성 돌연사에 대한 후보를 포함하는 운동-유발성 심장 부정맥의 후보이다.

부가적으로, 상기 방법의 견지에서, 본 발명은 적어도 하나의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 앓고 있거나 후보인 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한하거나 방지하는 방법에서의 JTV-519의 용도를 또한 제공한다. 본 발명은 또한 대상에서 적어도 하나의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료하거나 예방하기 위한 방법에서의 TV-519의 용도를 또한 제공한다.

신규한 스크리닝 방법

상기에서 논의되고 본원에서 제시된 바와 같이, 본 발명자들에 의한 데이터에서는 세린2809에 대한 심장 라이아노딘 수용체인 RyR2의 단백질 키나아제 A (PKA) 인산화는 FK506 결합 단백질인 FKBP12.6을 방출함으로써 상기 통로를 활성화시키는 것으로 나타났다. 심부전 심장 (인간의 심장 및 심부전의 동물 모델을 포함함)에서, RyR2는 PKA-과인산화되어, 결합된 FKBP12.6의 양을 감소시키고 칼슘-유도 활성화에 대한 민감도를 증가시키는 결합성 통로로 이어진다. 이들 변화의 최종 결과는 상기 RyR2 통로가 "누출성"으로 된다는 것이다. 이러한 통로 누출은 근육 수축을 위한 강력한 자극을 제공

하기 위해 근소포체 (SR)에서 더 이상 충분한 양의 칼슘이 존재하지 않은 정도로 세포내 칼슘 저장체의 고갈을 초래할 수 있다. 이는 심근의 약한 수축을 초래한다. 통로 누출의 두 번째 결과로서, RyR2 통로는 "심장 이완기"로서 알려진 심장 주기의 휴식기 동안에 칼슘을 방출한다. 심장 이완기 도중의 이러한 칼슘의 방출은 심장성 돌연사 (SCD)를 일으키는 치명적인 심장 부정맥 (예를 들어, 심실 빈맥 및 심실 세동)을 시작할 수 있다.

또한, 본 발명자들은 좌심실 보조 장치 (left ventricular assist device)로 지칭되는 기계적 펌핑 장치 (mechanical pumping device)를 이용한 심부전 치료는 심장을 휴식기 상태로 하고 정상화된 기능을 회복시키는 것으로, RyR2의 PKA 과인산화의 감소 및 상기 통로의 정상화된 기능과 결부되어 있다는 것을 제시하였다. 또한, 본 발명자들은 β -아드레날린 성 차단제 (β -차단제)를 이용한 개 (조울-유도성 심부전을 앓고 있는 개)의 치료는 상기 RyR2의 PKA 과인산화를 반대로 한다는 것을 제시하였다. β -차단제는 PKA를 활성화시키는 경로를 저해한다. 본 발명자들의 연구 결과로부터 안출될 수 있는 결론은, RyR2의 PKA 인산화가 상기 통로의 활성을 증가시켜, 통로의 소정의 자극 (활성화제)을 위해 상기 세포내로 더욱 많은 칼슘의 방출을 초래한다는 것이다.

본원에서 추가로 개시된 바와 같이, 본 발명자들은 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 비롯한 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전, 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)이 RyR2 단백질들 (특히, CPVT-결부 RyR2 돌연변이 단백질들)의 인산화의 증가, 및 RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소와 결부되어 있다는 것을 입증하였다. 이러한 기작을 이용하여 그러한 심장 질병을 치료하거나 예방하기 위한 효과적인 약제를 고안하는 것이 가능하다. RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소를 제한하거나 방지하는 능력을 갖는 후보 약제는 이러한 제한 및 방지 활성의 결과로서 RyR2-결부된 생물학적 사건에 대하여 영향을 미치며, 그럼으로써 이러한 심장 질병을 치료 또는 예방할 수 있다.

따라서, 본 발명은 하나 이상의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하는 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하는 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전, 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료하고 예방하는데 사용하기 위한 약제를 확인하는 방법을 제공한다. 본 방법은 (a) RyR2를 포함하는 세포 배양물을 수득하거나 생성하는 단계; (b) 이 세포를 후보 약제와 접촉시키는 단계; (c) 세포에서 RyR2의 인산화를 증가시키는 것으로 공지된 하나 이상의 조건에 세포를 노출시키는 단계; 및 (d) 약제가 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는지를 결정하는 단계를 포함한다.

본원에서 사용된 바와 같이, "약제"란 용어는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 핵산 (DNA 또는 RNA를 포함함), 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 분자, 화합물, 항생제, 약물, 및 이들의 임의의 조합 (들)을 포함한다. RyR2-결합 FKBP12.6 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 약제는 천연 또는 합성 약제일 수 있으며, RyR2 및/또는 FKBP12.6과 반응성인 약제 (즉, RyR2 및/또는 FKBP12.6에 대해 친화도를 갖거나, 이들과 결합하거나 또는 이들에 대한 약제)일 수 있다. 본원에서 추가로 사용된 바와 같이, "RyR2 포함" 세포는 RyR2, 이의 유도체 또는 동족체가 자연적으로 발현되거나 자연적으로 발생하는 세포 (바람직하게는, 심근세포)이다. 세포에서 RyR2의 인산화를 증가시키는 것으로 알려진 조건으로는 PKA를 들 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 방법에 있어서, 세포는 본원에 기술된 임의의 도입 및 투여 방식을 포함하여 약물/약제와 세포 사이의 접촉을 가져오는 임의의 표준 방법으로 후보 약제와 접촉시킬 수 있다. 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준은 당업계의 숙련자에게 공지되거나 본원에 기술되어 있는 임의의 방법, 분자적 절차 및 분석법을 포함하여 공지된 절차로 측정 또는 탐지할 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 본 약제는 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한하거나 방지한다.

본원에 개시되어 있는 바와 같이, RyR2는 횡문근 세포에 있어서 다수의 생물학적 사건에 연루되어 있다. 예를 들어, RyR2 통로는 심장 근육 세포에서 EC 커플링 및 수축성에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 세포에서, 특히 심장 근육 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하도록 고안된 치료용 또는 예방용 약물은 EC 커플링 및 수축성을 포함하여 다수의 RyR2-결부된 생물학적 사건의 조절에 유용할 수 있음이 명백하다. 따라서, 일단 본 발명의 후보 약제가 스크리닝되고, RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소에 대하여 적합한 제한 효과 또는 방지 효과를 미치는 것으로 결정되면, 세포, 특히 심장 근육 세포에서 EC 커플링 및 수축성에 대한 그의 영향에 대하여 평가할 수 있다. 본 발명의 치료제/예방제는 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사를 포함하는 심장 질병의 치료 또는 예방에 유용할 것으로 기대된다.

따라서, 본 발명의 방법은 (e) 후보 약제를 RyR2를 포함하는 세포 배양물과 접촉시키는 단계; 및 (f) 약제가 세포에서 RyR2-결부된 생물학적 사건에 대하여 영향을 미치는지를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "RyR2-결부된 생물학적 사건"은 RyR2의 수준 또는 활성이 연루된 생화학적 또는 생리학적 과정을 포함한다. 본원에 개시되어 있는 바와 같이, RyR2-결부된 생물학적 사건의 예는 제한됨이 없이 심장 근육 세포에서의 EC 커플링 및 수축성을 포함한다. 본 발명의 방법에 따르면, 후보 약제는 시험관 내에서 하나 이상의 세포 (바람직하게는 심장 근육 세포)와 접촉시킬 수 있다. 예를 들어, 세포의 배양물을 후보 약제를 함유하는 제제와 함께 인큐베이션시킬 수 있다. 이어서, RyR2-결부된 생물학적 사건에 대한 후보 약제의 영향을 면역블로팅, 단일-통로 기록 및 본원에 개시된 임의의 기타의 것을 포함하여 당업계에 공지된 임의의 생물학적 분석법 또는 방법으로 평가할 수 있다.

본 발명은 또한 상기의 확인 방법으로 확인되는 약제와, 이 약제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 약제는 대상에서 운동-유발성의 심장성 돌연사를 예방하는 데에 유용하며, 다른 RyR2-결부 질병을 치료 또는 예방하는 데에 유용할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, "RyR2-결부 질병"은 RyR2의 수준 또는 활성이 연루된 질병, 질환 또는 장애이며, RyR2-결부된 생물학적 사건 및 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 포함한다.

RyR2-결부된 질병은 대상에서 RyR2-결부된 질병을 치료 또는 예방하기에 유효한 양의 약제를 대상에게 투여함으로써 대상에서 치료 또는 예방될 수 있다. 이 양은 당업계의 숙련자에 의해 손쉽게 결정될 수 있다. 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 약제를 대상에서 하나 이상의 심장 질병을 치료 또는 예방하기에 유효한 양으로 대상에게 투여함으로써 대상에서 적어도 하나의 심장 질병 (심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 심장 질병 (심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료 또는 예방하는 데에 사용하기 위한 약제의 생체 내 확인 방법을 제공한다. 본 방법은 (a) RyR2를 포함하는 동물을 수득하거나 생성하는 단계; (b) 후보 약제를 동물에게 투여하는 단계; (c) 세포에서 RyR2의 인산화를 증가시키는 것으로 공지된 하나 이상의 조건에 동물을 노출시키는 단계; 및 (d) 약제가 동물에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는지를 결정하는 단계를 포함한다. 본 방법은 (e) 약제를 RyR2를 포함하는 동물에게 투여하는 단계; 및 (f) 약제가 동물에서 RyR2-결부된 생물학적 사건에 영향을 미치는지를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한 제공되는 것은 이 방법으로 확인되는 약제; 이 약제를 함유하는 약학 조성물; 및 이 약제를 대상에서 하나 이상의 심장 질병을 치료 또는 예방하기에 유효한 양으로 대상에게 투여함으로써 대상에서 하나 이상의 심장 질병 (심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료 또는 예방하는 방법이다.

본 발명자들의 연구에 의하면, PKA 활성화를 차단하는 화합물이 RyR2 통로의 활성화를 감소시켜, 칼슘이 세포 내로 덜 방출되게 할 것이라 기대된다는 것이 입증되었다. FKBP12.6 결합 부위에서 RyR2 통로에 결합하지만, 이 통로가 PKA에 의해 인산화될 경우 이 통로로부터 떨어지지 (come off) 않는 화합물은 PKA 활성화 또는 RyR2 통로를 활성화하는 기타 트리거 (trigger)에 응답하여 이 통로의 활성을 감소시킬 것으로 또한 기대된다. 그러한 화합물은 또한 세포 내로 칼슘을 덜 방출시킨다. 이러한 발견에 비추어 보면, 본 발명은 RyR2의 활성화를 차단 또는 저해한다는 점에서 심장 질병 (심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료 또는 예방하는 데에 유용할 수 있는 약제의 확인을 위한 추가의 분석법을 또한 제공한다.

예로서, 본 발명의 진단 분석에서는, 칼슘-민감성 형광 염료 (예를 들어, Fluo-3, Fura-2 등)를 사용하여, RyR2 통로를 통한 세포 내로의 칼슘의 방출을 스크리닝할 수 있다. 세포에 선택된 형광 염료를 로딩하고, 이어서 세포를 RyR2 활성화제로 자극하여 세포에 첨가된 화합물이 칼슘-의존성 형광 신호를 감소시키는지의 여부를 결정할 수 있다 (문헌[Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994]; 문헌[Gillo et al., Calcium entry during induced differentiation in murine erythroleukemia cells. Blood, 81: 783-92, 1993; 문헌[Jayaraman et al., Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. Science, 272: 1492-94, 1996]). 칼슘-의존성 형광 신호는 광전자증배관으로 모니터링하고, 이전에 기술된 바와 같이 적절한 소프트웨어를 이용하여 분석할 수 있다 (문헌[Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994]; 문헌[Gillo et

al., Calcium entry during induced differentiation in murine erythroleukemia cells. Blood, 81: 783-92, 1993]; 문헌 [Jayaraman et al., Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. Science, 272: 1492-94, 1996]). 이 분석법은 용이하게 자동화하여 다중웰 디쉬를 사용하여 다수의 화합물을 스크리닝할 수 있다.

RyR2-매개 세포내 칼슘 방출의 PKA-의존성 활성화를 저해하는 화합물의 확인을 위하여, 분석법은 이중성 발현 시스템, 예를 들어 Sf9, HEK293, 또는 CHO 세포에서의 재조합 RyR2 통로의 발현을 포함할 수 있다 (문헌 [Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994]). RyR2는 또한 베타-아드레날린성 수용체와 함께 동시-발현될 수 있다. 이는 베타-아드레날린성 수용체 작동제의 첨가에 응답하는 RyR2 활성화에 대한 화합물의 영향의 평가를 허용한다.

심부전 정도와 상관 관계가 있는 RyR2의 PKA 인산화 수준이 또한 분석될 수 있으며, 이어서 이를 사용하여 RyR2 통로의 PKA 인산화를 차단하도록 고안된 화합물의 효능을 측정할 수 있다. 그러한 분석법은 RyR2 단백질에 특이적인 항체의 사용에 기초할 수 있다. 예를 들어, RyR2-통로 단백질은 면역침전시킬 수 있고, 이어서 PKA 및 [감마³²P]-ATP로 역-인산화시킬 수 있다. 이어서 RyR2 단백질로 전해지는 방사성 [³²P] 표지체의 양을 포스포리미저 (phosphorimager)를 사용하여 측정할 수 있다 (문헌 [Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]).

본 발명의 다른 분석법은 Ser 2809 상에서 PKA 인산화되는 RyR2를 탐지하는 포스포에피토프-특이성 항체의 사용을 포함한다. 그러한 항체를 이용한 면역블로팅을 사용하여 심부전 및 심장 부정맥에 대한 치료법의 효능을 평가할 수 있다. 추가로, RyR2 S2809A 및 RyR2 S2809D 녹-인 (knock-in) 생쥐를 사용하여 심부전 및 심장 부정맥에 있어서의 치료법의 효능을 평가할 수도 있다. 그러한 생쥐는, RyR2 S2809A 돌연변이가 심부전 및 부정맥을 저해하며, RyR2 S2809D 돌연변이가 심부전 및 부정맥을 악화시킨다는 것을 보여줌으로써 RyR2의 PKA 과인산화가 심부전 및 심장 부정맥에 있어서 기여 요인이라는 증거를 또한 제공한다.

신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체 및 그의 합성 방법

1,4-벤조티아제핀 유도체, 특히 2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 유도체는 JTV-519를 포함하는 생물학적 활성 분자의 제조에서 중요한 빌딩 블록 (building block)이다. 본 발명자들은 1,4-벤조티아제핀 중간체 화합물, 예를 들어 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀의 신규한 제조 방법을 개발하였다. 본 발명자들의 방법에서는 손쉽게 입수가능하며 값싼 출발 재료가 이용되며, 본 방법은 고수율의 주요 1,4-벤조티아제핀 중간체를 제공한다.

1990년대 초에, Kaneko 등 (미국 특허 제5,416,066호; WO 92/12148; JP4230681)은 JTV-519가 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (1,4-벤조티아제핀 중간체)을 아크릴로일 클로라이드와 반응시키고, 이어서 생성된 생성물을 4-벤질 피페리딘과 반응시킴으로써 제조될 수 있다는 것을 개시하였다.

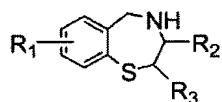
7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 및 유사 화합물을 제조하는 두 가지 방법이 문헌에 이전에 보고되었었다. Kaneko 등 (미국 특허 제5,416,066호)에 의해 개시된 첫번째 방법은 2,5-디히드록시벤조산으로 출발하는 6 단계의 합성 경로를 포함한다. 상기 방법에서, 2,5-디히드록시벤조산은 디메틸 술페이트로 선택적으로 메틸화되었다. 이어서 생성된 화합물은 디메틸티오카르바모일 클로라이드와 20시간 반응시키고, 이어서 고온 (270°C)에 9시간 동안 처하였다. 이 단계의 생성물을 메탄올 중 소듐 메톡시드를 이용하여 20시간 동안 환류시켰다. 이어서 환류 단계의 생성물을 염기성 조건 하에서 그리고 고온에서 2-클로로에틸아민과 반응시켜 환화 아미드를 생성하였다. 환화 아미드를 LiAlH₄로 환원시켜 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (1,4-벤조티아제핀 중간체)를 생성하였다.

7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀의 두번째 제조 방법은 Hitoshi에 의해 일본 특허 (JP 10045706)에 개시되어 있다. 상기 방법은 2-브로모-5-메톡시 벤즈알데히드로 출발하였다. 브로마이드를 NaSMe로 치환하고 생성된 생성물을 염소로 산화시키고, 이어서 물에서 환류시켜 디술포드 디알데히드를 생성하였다. 이 디알데히드를 2-클로로에틸아민으로 처리하고, 생성된 생성물을 환원제, 예를 들어 NaBH₄로 환원시켰다. 생성된 화합물을 환화시켜 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 생성하였다.

처음에, 본 발명자들은 상기에 기술된 방법을 사용하여 1,4-벤조티아제핀 중간체, 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 제조하려고 시도하였다. 그러나, Kaneko 등 (미국 특허 제5,416,066호)이 기술한 첫번째 방법은 고온 및 오랜 반응 시간의 합성 단계를 포함한다는 것이 발견되었다. 추가로, 본 발명자들은 제3 티올화 중간체 중 티오기가

공기에 의해 디설피드 화합물로 산화되어, 후속 환화 생성물을 합성하는 것이 불가능해진다는 것을 발견하였다. 또한 본 발명자들은 Hitoshi (JP 10045706)가 기술한 방법이 Cl_2 를 포함하며, 브로마이드의 NaSMe를 이용한 치환 이외에도 제1 중간체의 다른 특허된 제조 방법이 사용되어야만 한다고 단정하였다.

상기 문제점을 극복하기 위하여, 본 발명자들은 손쉽게 입수가능하며 값싼 출발 재료로부터 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 제조하는 신규한 방법을 개발하였다. 본 발명자들의 방법은 단리 및 정제 단계를 단순화하며, 하기에 예시된 일반 구조를 갖는, 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 및 기타 화합물을 포함하는 다양한 1,4-벤조티아제핀 중간체의 제조에 사용될 수 있다:



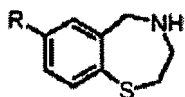
$R_1 = n\text{-MeO}, n\text{-MeS}, n\text{-알킬}, n = 6, 7, 8, 9$

$R_2 = \text{알킬}$

$R_3 = \text{알킬}$

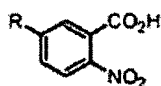
본 방법은 또한 JTV-519의 제조에 사용될 수 있다.

따라서, 전술한 사항에 비추어 보면, 본 발명은 하기 식:

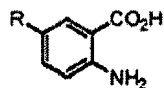


(식 중, R은 OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 H이며, R은 2, 3, 4, 또는 5위치일 수 있음)을 갖는 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은

(a) 하기 식:

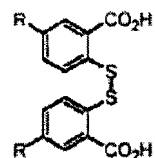


(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을, 선택적 축매의 존재 하에 환원제로 처리하여 하기 식:



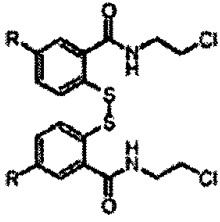
(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계;

(b) 단계 (a)에서 형성된 화합물을 디아조화제 및 디설피드로 처리하여 하기 식:



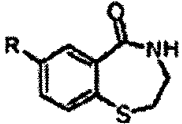
(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 형성된 화합물을 활성제 및 클로로에틸아민으로 처리하여 하기 식:



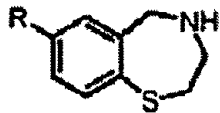
(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계;

(d) 단계 (c)에서 형성된 화합물을 환원제 및 염기로 처리하여 하기 식:



(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계; 및

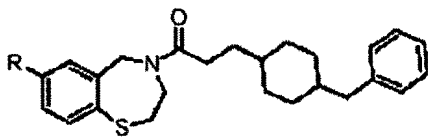
(e) 단계 (d)에서 형성된 화합물을 환원제로 처리하여 하기 식:



(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다.

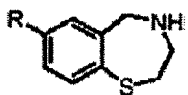
본 발명의 방법에 따르면, 단계 (a)에서의 환원제는 H_2 일 수 있다. 추가로, 단계 (b)에서의 디아조화제는 $NaNO_2$ 일 수 있으며, 단계 (b)에서의 디설파이드는 Na_2S_2 일 수 있다. 또한, 단계 (c)에서의 클로라이드는 $SOCl_2$ 일 수 있다. 단계 (d)에서의 환원제는 트리메틸포스핀 (PMe_3)일 수 있으며, 반면, 단계 (d)에서의 염기는 트리에틸 아민이다. 다른 실시 형태에 있어서, 단계 (e)에서의 환원제는 $LiAlH_4$ 이다.

본 발명은 또한 하기 식:



(식 중, R은 OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 H이며, R은 2, 3, 4, 또는 5 위치일 수 있음)을 갖는 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은

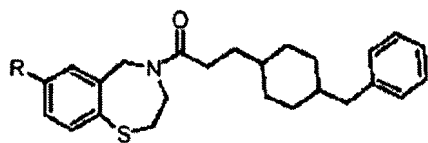
(a) 하기 식:



(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 3-브로모프로피온산 클로라이드 및 하기 식:

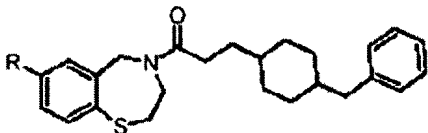


을 갖는 화합물로 처리하여 하기 식:

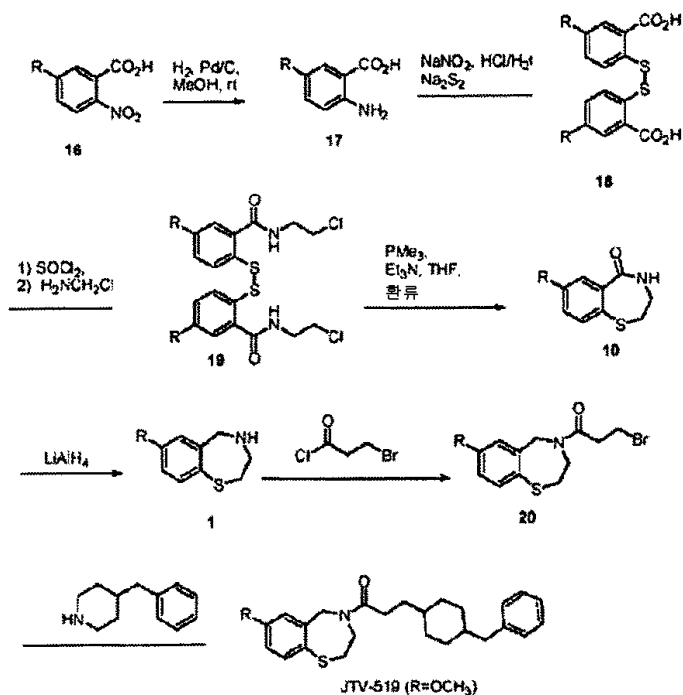


(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다.

예로서, 하기 식:



(식 중, R은 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며, R은 2, 3, 4, 또는 5 위치일 수 있음)을 갖는 화합물은 하기와 같이 합성될 수 있다:



R=OR', SR', NR', 알킬, 할라이드 ; R'=알킬, 아릴, H
R은 2, 3, 4, 또는 5 위치일 수 있음

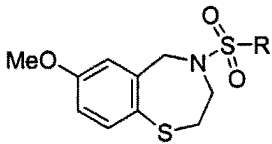
예로서, 그리고 하기 실시예 9 및 반응식 1에 예시되어 있는 바와 같이, 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀은 하기와 같이 2-니트로-5-메톡시벤조산으로부터 제조될 수 있다. 2-니트로-5-메톡시벤조산의 니트로기는 H_2 를 사용하여 Pd/C를 촉매로 이용하여 환원시켜 2-아미노-5-메톡시벤조산을 생성한다. 2-아미노-5-메톡시벤조산은 $NaNO_2$ 로 디아조화하고, 이어서 Na_2S_2 로 처리하여 안정한 디설피드 화합물을 제공할 수 있다. 추가의 정제 없이, 안정한 디설피드 화합물을 $SOCl_2$ 로 처리하고, 이어서 Et_3N 의 존재 하에 2-클로로에틸아민과 반응시켜 아마이드를 생성할 수 있다. 이어서 이 아마이드 화합물은 하기와 같이 단일-포트(one-pot) 절차를 통하여 환화 화합물로 전환시킬 수 있다. 환원제(예를 들어 트리메틸포스핀 또는 트리페닐포스핀) 및 염기(예를 들어 트리에틸아민)을 THF(테트라히드로푸란) 중 아마이드 화합물의 용액에 첨가할 수 있다. 이어서 생성된 반응 혼합물을 3시간 동안 환류시킬 수 있다. 환원제(트리메틸포스핀 또는 트리페닐포스핀)는 디설피드(S-S)를 그의 일설피드(-S)로 절단하며, 이는 원위치에서 클로라이드를 이용하여 분자내 환화를 받아 환화 아마이드를 생성한다. 이어서 환화 아마이드는 $LiAlH_4$ 로 환원시켜 1,4-벤조티아제핀 중간체, 7-메톡시-

2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 생성할 수 있다. 이어서 JTV-519는 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 3-브로모프로피온산 클로라이드와 반응시키고 이어서 생성된 화합물을 4-벤질 피페리딘과 반응시킴으로써 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀으로부터 제조할 수 있다.

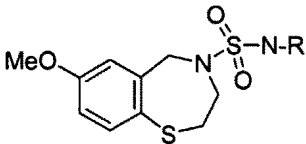
본 발명은 또한 방사성 표지화된 JTV-519를 함유하는 조성물을 제공한다. JTV-519의 표지는 당업계에서 공지된 다양한 상이한 방사능 표지체 중 하나를 사용하여 달성할 수 있다. 본 발명의 방사성 표지체는 예를 들어 방사성 동위원소일 수 있다. 방사성 동위원소는 제한됨이 없이 ^{35}S , ^{125}I , ^3H 또는 ^{14}C 를 포함하는 검출가능한 방사선을 방사하는 임의의 동위원소일 수 있다. 방사성(동위원소)에 의해 방사되는 방사능은 당업계에 잘 알려진 기술로 검출할 수 있다. 예를 들어, 방사성 동위원소로부터의 감마선 방사는 감마선 영상화 기술, 특히, 섬광 계수적 영상화법을 사용하여 검출할 수 있다.

예로서, 그리고 하기 실시예 10 및 반응식 2에 예시되어 있는 바와 같이, 방사성 표지화된 JTV-519는 하기와 같이 제조할 수 있다. JTV-519는 BBr_3 를 사용하여 페닐 고리에서 탈메틸화할 수 있다. 이어서 생성된 페놀 화합물은 염기 (예를 들어 NaH)의 존재 하에 방사성(동위원소) 표지화된 메틸화제 (예를 들어 ^3H -디메틸 술페이트)로 재메틸화시켜 ^3H -표지화된 JTV-519를 제공할 수 있다.

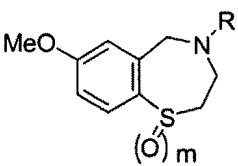
본 발명은 또한 JTV-519와 유사한 2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 포함하는 신규한 1,4-벤조티아제핀 중간체 및 유도체를 제공한다. 예로서, 본 발명은 하기 식들을 갖는 화합물을 제공한다:



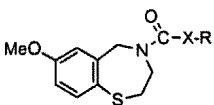
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, 또는 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



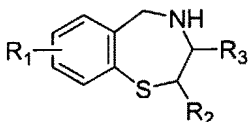
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, 또는 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



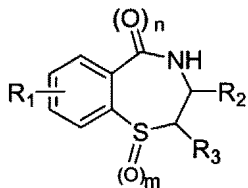
(식 중, R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 또는 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; m은 1 또는 2임); 및



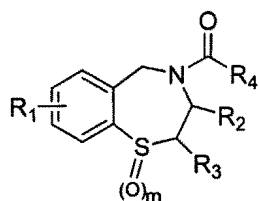
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임). 또한 제공되는 것은 하기 식들을 갖는 추가의 2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 화합물이다:



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R_2 는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 또는 아릴임);



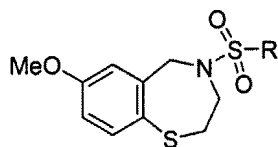
(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m 은 0, 1, 또는 2이며; n 은 0 또는 1임); 및



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 O, S, 또는 N을 포함하는 알킬, 카르복실산, 알케닐, 할라이드 또는 H이며; m 은 0, 1, 또는 2임).

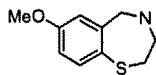
본 발명자들의 신규한 1,4-벤조티아제핀 화합물의 예는 제한됨이 없이 S7, S-20, S-25, S-27, 및 S36을 포함한다. 바람직하게는 본 화합물은 S36이다. S7, S-20, S-25, S-27, 및 S36의 구조는 본 출원의 도 15에서 발견할 수 있다. 본 발명의 이러한 화합물 및 임의의 기타 신규한 화합물은 약학 조성물의 형성을 위하여 상기한 바와 같이 약학적으로 허용가능한 담체와 결부될 수 있다.

본 발명은 또한 본원에 개시된 신규한 1,4-벤조티아제핀 화합물의 합성 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 하기 식:

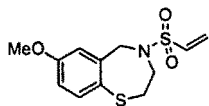


(식 중, R 은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n 은 0, 1, 2, 또는 3이며, R' 은 알킬 또는 시클로알킬임)을 갖는 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은

(a) 하기 식:



을 갖는 화합물을 술폰일 클로라이드 화합물 (임의의 술폰일 클로라이드 유도체를 포함함) 및 염기로 처리하여 하기 식:



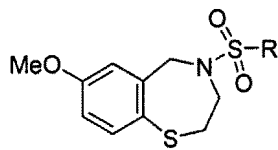
을 갖는 화합물을 형성하는 단계;

(b) 선택적으로, 단계 (a)에서 형성된 화합물을 일차 또는 이차 아민으로 처리하여 하기 식:

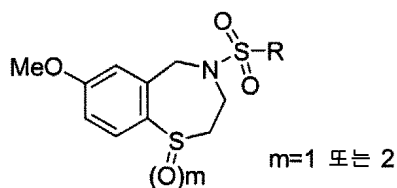


(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에 있어서, 단계 (a)에서의 술폰닐 클로라이드 화합물은 알킬술폰닐 클로라이드 및 아릴술폰닐 클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시 형태에 있어서, 단계 (a)에서의 염기는 Et_3N 이다. 또다른 실시 형태에 있어서, 단계 (b)에서의 일차 또는 이차 아민은 4-벤질피페리딘이다.

본 발명의 방법은 하기 식:

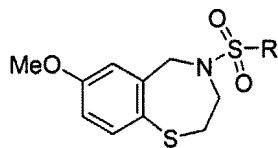


(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, 또는 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬 임)을 갖는 화합물을 산화제로 산화시켜 하기 식:



(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같으며, m은 1 또는 2임)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 산화제는 과산화수소이다.

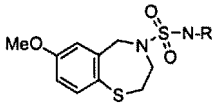
예로서, 그리고 실시예 11 및 반응식 3에 예시되어 있는 바와 같이, 본 발명자들은 하기 일반 구조를 갖는 화합물의 합성 방법을 개발하였다:



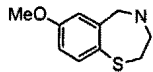
여기서, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, 또는 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 염기, 예를 들어 Et_3N 의 존재 하에 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 알킬술폰닐 클로라이드 또는 아릴술폰닐 클로라이드와 반응시킴으로써 제조할 수 있다. 추가의 반응 (예를 들어, 4-벤질 피페리딘의 첨가)을 수반하여 원할 경우 측쇄를 연장시킬 수 있다. 반응식 3이 보여주는 바와 같이, 2-클로로에탄술폰닐 클로라이드 (예를 들어, 180 mg; 1.1 mM) 및 Et_3N (예를 들어, 140 mg; 1.1 mM)은 0°C 에서 CH_2Cl_2 (예를 들어, 20 ml) 중 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (1) (예를 들어, 194 mg; 1 mM)에 첨가될 수 있다. 이어서 이 혼합물을 교반시키고 (예를 들어, 0°C 에서 2시간 동안), 세척하였다 (예를 들어, H_2O 및 포화 NaHCO_3 용액을 이용). 용매의 제거에 의해 조 생성물을 생성하고, 이를 실리카 겔 상에서의 크로마토그래피로 정제할 수 있다. 구조는 NMR로 확인할 수 있다. 반응식 3에는 생성된 화합물의 측쇄가 이 화합물 (예를 들어 28 mg; 0.1 mM)을 CH_2Cl_2 중 4-벤

질 피페리딘 (예를 들어, 21 mg; 0.13 mM)과 반응시킴으로써 연장될 수 있음이 또한 예시되어 있다. 반응이 완료된 후, 여분의 아민은 염기 제거제 (scavenger) (예를 들어, 3-(2-숙신산 무수물)프로필작용화 실리카 겔, 0.5 g)로 제거할 수 있다.

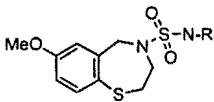
본 발명은 또한 하기 식:



(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임)의 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은 하기 식:

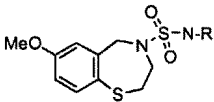


을 갖는 화합물을 염기의 존재 하에 염화술퍼릴 및 일차 또는 이차 아민으로 처리하여 하기 식:

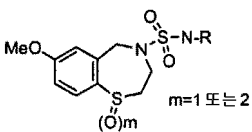


(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다. 본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 염기는 Et_3N 이다. 다른 실시 형태에 있어서, 일차 또는 이차 아민은 1-피페로닐피페라진이다.

본 발명의 방법은 하기 식:

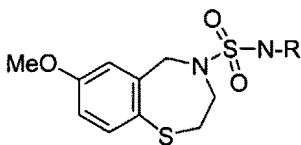


(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임)을 갖는 화합물을 산화시켜 하기 식:



(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같으며, m은 1 또는 2임)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시 형태에 있어서, 산화제는 과산화수소이다.

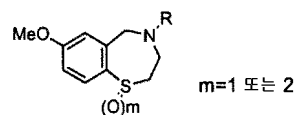
예로서, 그리고 실시예 11 및 반응식 4에 예시되어 있는 바와 같이, 본 발명자들은 하기 일반 구조를 갖는 화합물의 합성 방법을 개발하였다:



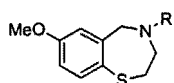
여기서, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 염기 (예를 들어, Et_3N)의 존재 하에서의 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀의 염화술퍼릴, 이어서 일차 또는 이차 아민과의 단일-포트 반응에 의해 제조할 수 있다. 반응식 4가 보여주는

바와 같이, 염화술퍼릴 (예를 들어, 15.0 mg; 0.111 mM) 및 Et₃N (예를 들어, 28.0 mg; 0.22 mM)을 0℃에서 CH₂Cl₂ (예를 들어, 20 ml) 중 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (예를 들어, 19.4 mg; 0.1 mM)에 첨가할 수 있다. 이 혼합물의 교반 (예를 들어, 0℃에서 2시간 동안) 후, 1-피페로닐피페라진 (예를 들어, 27 mg; 0.12 mM)을 첨가할 수 있다. 이 혼합물을 추가로 2시간 동안 교반시키고, 이어서 (예를 들어, H₂O 및 포화 NaHCO₃ 용액으로) 세척할 수 있다. 여분의 아민은 염기 제거제 (예를 들어, 3-(2-숙신산 무수물)프로필작용화 실리카 겔, 0.2 g)를 첨가하여 제거할 수 있다.

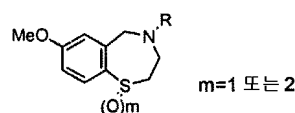
본 발명은 또한 하기 식:



(식 중, R은 CO(CH₂)_nXR'₂, SO₂(CH₂)_nXR'₂, 또는 SO₂NH(CH₂)_nXR'₂이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; m은 1 또는 2임)을 갖는 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은 하기 식:

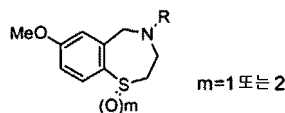


(식 중, R은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 산화제로 처리하여 하기 식:

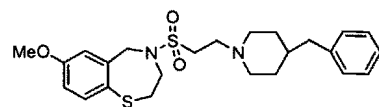


(식 중, R 및 m은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에 있어서, 산화제는 과산화수소이다. 또한 이 방법을 사용하여 JTV-519를 산화시킬 수 있다.

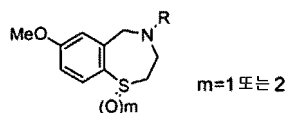
본 발명은 또한 하기 식:



(식 중, R은 CO(CH₂)_nXR'₂, SO₂(CH₂)_nXR'₂, 또는 SO₂NH(CH₂)_nXR'₂이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; m은 1 또는 2임)을 갖는 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은 하기 식:

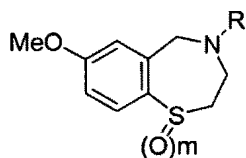


을 갖는 화합물을 산화제로 처리하여 하기 식:



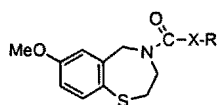
(식 중, R 및 m은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에 있어서, 산화제는 과산화수소이다. 또한 이 방법을 사용하여 JTV-519를 산화시킬 수 있다.

예로서, 실시예 11 및 반응식 5에 예시되어 있는 바와 같이, 본 발명자들은 하기 일반 구조를 갖는 화합물의 합성 방법을 개발하였다:

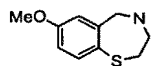


여기서, R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 또는 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; m은 1 또는 2이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 JTV-519, 또는 본원에 개시된 신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체 중 하나를 과산화수소로 산화시킴으로써 제조할 수 있다. 반응식 5에 예시되어 있는 바와 같이, MeOH(예를 들어, 5 ml) 중의 목적하는 1,4-벤조티아제핀 화합물(예를 들어, 21 mg; 0.05 mM)이 H_2O_2 (예를 들어, 0.1 ml, 과량)에 첨가될 수 있다. 이 혼합물을 교반시킬 수 있으며(예를 들어, 2일 동안), 생성된 생성물을 실리카 겔 상에서의 크로마토그래피(예를 들어, CH_2Cl_2 :MeOH = 10:1)로 정제할 수 있다.

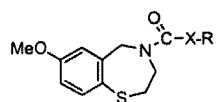
추가로, 본 발명은 하기 식:



(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, 또는 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임)을 갖는 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은 하기 식:

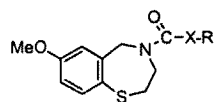


을 갖는 화합물을 염기의 존재 하에 카르보닐 클로라이드 화합물과, 그리고 일차 또는 이차 아민 또는 알코올로 처리하여 하기 식:



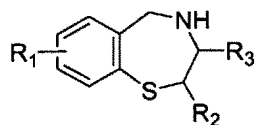
(식 중, R 및 X는 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에 있어서, 카르보닐 클로라이드 화합물은 트리포스젠이다. 다른 실시 형태에 있어서, 염기는 Et_3N 이다. 또다른 실시 형태에 있어서, 일차 또는 이차 아민은 4-벤질피페리딘이다.

예로서, 그리고 실시예 11 및 반응식 6에 예시되어 있는 바와 같이, 본 발명자들은 하기 일반 구조를 갖는 화합물의 합성 방법을 개발하였다:



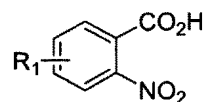
여기서, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 염기(예를 들어, Et_3N)의 존재 하에 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 트리포스젠과 반응시키고, 이어서 일차 또는 이차 아민 또는 알코올을 첨가함으로써 제조할 수 있다.

본 발명은 또한 하기 식:

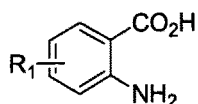


(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 OR' , SR' , NR' , 알킬, 또는 할라이드이며, R' 은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R_2 는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 또는 아릴임)을 갖는 2,3,4,5- 테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 화합물의 합성 방법을 제공하며, 본 방법은

(a) 하기 식:

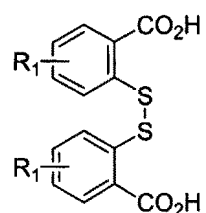


(식 중, R_1 은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 선택적 축매의 존재 하에 환원제로 처리하여 하기 식:



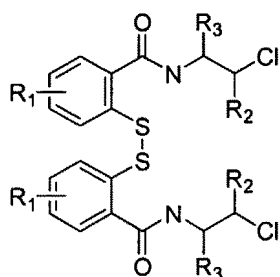
(식 중, R_1 은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계;

(b) 단계 (a)에서 형성된 화합물을 디아조화제 및 디설피드로 처리하여 하기 식:



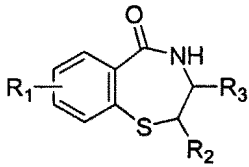
(식 중, R_1 은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 형성된 화합물을 황성제 및 클로로에틸아민으로 처리하여 하기 식:



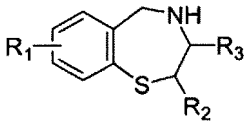
(식 중, R_1 , R_2 , 및 R_3 은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계;

(d) 단계 (c)에서 형성된 화합물을 환원제 및 염기로 처리하여 하기 식:



(식 중, R₁, R₂, 및 R₃은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계; 및

(e) 단계 (d)에서 형성된 화합물을 환원제로 처리하여 하기 식:



(식 중, R₁, R₂, 및 R₃은 상기에 정의된 바와 같음)을 갖는 화합물을 형성하는 단계를 포함한다.

신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체를 사용한 치료 및 예방 방법

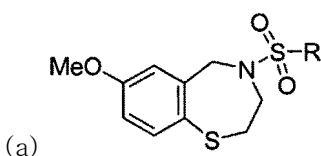
본 발명자들의 신규한 1,4-벤조티아제핀 화합물은 기능적 특성을 JTV-519와 공유한다. 예를 들어, JTV-519 (mwt = 423)와 같이, 화합물 S36 (mwt= 267)은 칼슘 통로를 조절한다. 실제로, S36 (카르복실산)은 칼슘 통로의 조절에 있어서 JTV-519보다 대략 10배 더 강력하다 (데이터는 예시되어 있지 않음). 그러나, JTV-519와는 달리, 본 발명자들의 신규한 화합물은 hERG의 약한 차단 활성을 나타낸다.

신속한 지연된 정류 (I (Kr)) 통로 - 칼슘 통로 - 가 심장 활동 전위의 재분극에 중요하다. hERG는 I (Kr) 통로의 세공 (pore) 형성 서브유닛이다. I (Kr) 기능의 억제 - 약물의 부작용 및/또는 hERG에서의 유전자 결함의 결과로서 - 는 QT 간격 연장 증후군 (long-QT (LQT) syndrome)에 이룰 수 있으며, 이는 생명을 위협하는 부정맥 (life-threatening arrhythmias)의 위험성 증가를 수반한다. 그 다음, hERG는 차단될 경우 심장 부정맥 및 심장성 돌연사를 야기할 수 있는 칼슘 통로 서브유닛이다.

본 발명자들의 화합물은 JTV-519와 비교할 때 hERG (I (Kr)) 통로의 차단을 유의하게 감소시켰다. 도 4-7에 도시되어 있는 바와 같이, 예를 들어 본 발명자들의 화합물 중 하나인 S36은 JTV-519의 hERG 차단 활성보다 대략 5 내지 10배 더 낮은 hERG 차단 활성을 갖는다. 본 발명자들의 화합물은 약한 hERG 차단 활성을 갖기 때문에, 본 화합물은 JTV-519보다 독성이 덜할 것으로 기대된다.

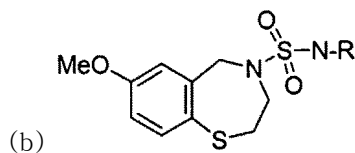
전술한 사항에 기초하면, 본 발명자들의 신규한 1,4-벤조티아제핀 화합물은 JTV-519보다 강력하며 감소된 독성을 갖는다. 따라서, 본 발명자들의 신규한 화합물은 제한됨이 없이, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사를 포함하는 하나 이상의 심장 질병이 있거나 그 후보인 대상을 포함하는 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 감소를 제한 또는 방지하는 상기에 기술한 방법들 중 임의의 방법에서 특히 유용할 것이라 생각된다. 또한, 본 발명자들의 화합물은 대상에서 그러한 심장 질병을 치료 또는 예방하는 방법에서 특히 유용할 것이라 생각된다.

따라서, 본 발명은 또한 약제를 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양으로 대상에게 투여함으로써 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법을 제공한다. 본 발명의 약제는 하기를 포함하는 임의의 1,4-벤조티아제핀 유도체일 수 있다:

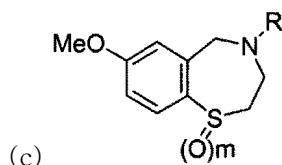


(a)

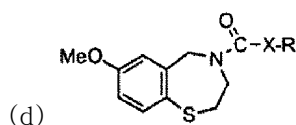
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



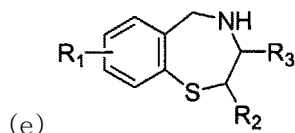
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



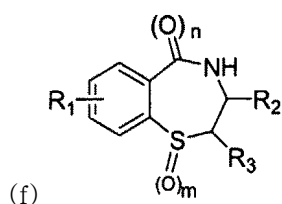
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



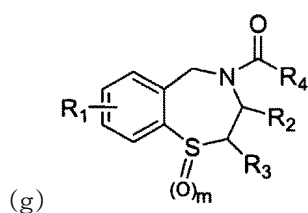
(식 중, R = 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 상기 화합물 (a)-(g)의 임의의 산화 형태. 또한 제공되는 것은 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한하거나 방지하는 방법에 있어서의 이러한 약제의 용도이다. 본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 본 약제는 S4, S7, S-20, S-24, S-25, S-26, S-27, 및 S36으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 약제의 구조는 도 15에서 발견할 수 있다. 바람직하게는, 본 약제는 S36이다.

상기한 바와 같이, 대상은 임의의 동물일 수 있지만, 바람직하게는 인간이다. 일 실시 형태에 있어서, 대상은 카테콜아민성 다형 심실 빈맥 (CPVT)을 갖는다. 다른 실시 형태에 있어서, 대상은 제한됨이 없이 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사를 포함하는 하나 이상의 심장 질병이 있거나 상기 질병의 후보이다.

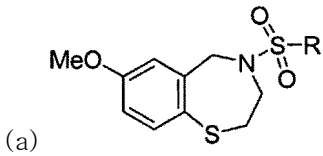
상기한 바와 같이, 본 발명의 방법에 있어서, 1,4-벤조티아제핀 유도체는 이 유도체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 치료 조성물의 일부로서 대상에게 투여될 수 있다. 본 유도체 또는 약학 조성물은 당업계에 공지되고/되거나 본원에 개시되어 있는 임의의 기술로 대상에게 투여될 수 있다.

본 발명의 방법에 따르면, 1,4-벤조티아제핀 유도체는 대상, 특히 대상의 세포에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양으로 대상에게 투여될 수 있다 (그리고 1,4-벤조티아제핀 유도체는 대상의 세포와 접촉될 수 있음). 이 양은 생체 내에서 확립된 적정 곡선의 분석을 포함하는 공지된 절차와, 본원에 개시된 방법 및 분석법에 기초하여, 당업계의 숙련자에 의해 손쉽게 결정될 수 있다. 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 적합한 양은 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일의 범위일 수 있고/있거나, 약 300 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml의 범위의 혈장 중 수준을 성취하기에 충분한 양일 수 있다. 바람직하게는, 1,4-벤조티아제핀 유도체의 양은 약 10 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일 범위이다.

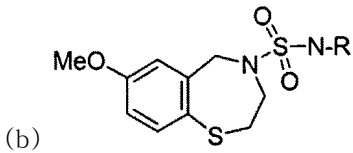
본 발명의 방법에 따르면, RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소는 대상에서 인산화 RyR2의 수준을 감소시킴으로써 대상에서 제한 또는 방지할 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 대상은 심장 질병, 예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사가 아직 발병하지 않았다. 이 경우, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 양은 대상에서 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥, 심부전, 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 예방하기에 유효한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 양일 수 있다. 일 실시 형태에 있어서, 1,4-벤조티아제핀 유도체는 대상에서 하나 이상의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 예방한다.

본 발명의 다른 실시 형태에 있어서, 대상은 이미 심장 질병이 발병하였다. 이 경우, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 양은 대상에서 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료하기에 유효한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 양일 수 있다. 바람직한 실시 형태에 있어서, JTV-519는 대상에서 하나 이상의 심장 질병을 치료한다.

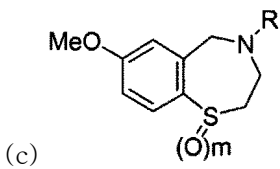
또한 본 발명은 대상에서 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 및 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 약제를 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하기에 유효한 양으로 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명의 약제는 하기 (a) 내지 (h)를 비롯한 임의의 1,4-벤조티아제핀 유도체일 수 있다:



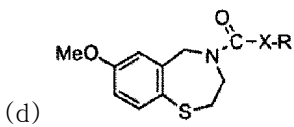
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



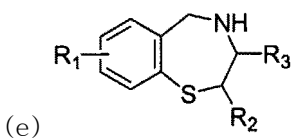
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



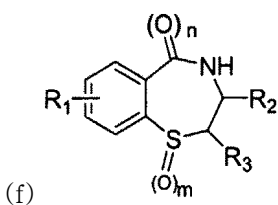
(식 중, R은 $CO(CH_2)_nXR'_2$, $SO_2(CH_2)_nXR'_2$, 또는 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



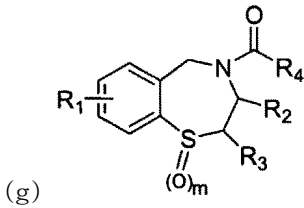
(식 중, R = 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



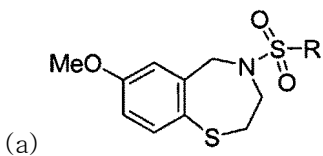
(식 중, R_1 은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R_2 는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_3 은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R_4 는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 상기 화합물 (a)-(g)의 임의의 산화 형태.

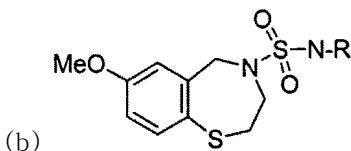
또한 본 발명은 대상에서의 하나 이상의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)의 치료 방법을 제공한다. 본 방법은 1,4-벤조티아제핀 유도체를 대상에서 하나 이상의 심장 질병을 치료하기에 유효한 양으로 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 대상에서 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료하기에 유효한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 적합한 양은 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일의 범위일 수 있고/있거나, 약 300 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml의 범위의 혈장 중 수준을 성취하기에 충분한 양일 수 있다.

또한 본 발명은 대상에서의 하나 이상의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)의 예방 방법을 제공한다. 본 방법은 1,4-벤조티아제핀 유도체를 대상에서 하나 이상의 심장 질병을 예방하기에 유효한 양으로 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 대상에서 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동 (지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥), 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 예방하기에 유효한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 적합한 양은 약 5 mg/kg/일 내지 약 20 mg/kg/일의 범위일 수 있고/있거나, 약 300 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml의 범위의 혈장 중 수준을 성취하기에 충분한 양일 수 있다.

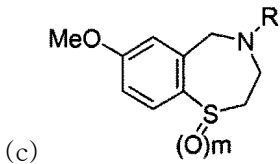
상기에 기술한 방법들에 따르면, 1,4-벤조티아제핀 유도체의 예는 제한됨이 없이 하기를 포함한다:



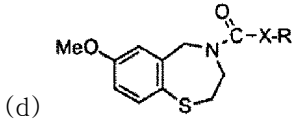
(식 중, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



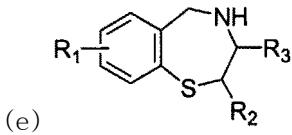
(식 중, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬임);



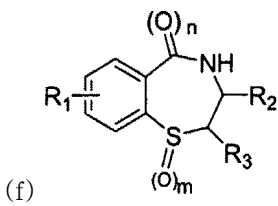
(식 중, R은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 또는 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며, m은 1 또는 2임)



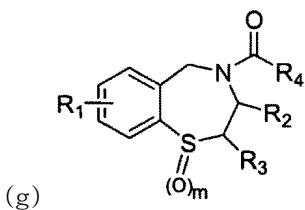
(식 중, R = 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬 또는 시클로알킬이며; X는 NH 또는 O임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 H이며; R₂는 H, 알킬, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 또는 아릴임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; m은 0, 1, 또는 2이며; n은 0 또는 1임);



(식 중, R₁은 페닐 고리 상의 2, 3, 4, 또는 5 위치의 H, OR', SR', NR', 알킬, 또는 할라이드이며, R'은 알킬, 아릴, 또는 아실이며; R₂는 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₃은 H, 알킬, 알케닐, 또는 아릴이며; R₄는 H, 할라이드, 알케닐, 카르복실산, 또는 O, S 또는 N을 포함하는 알킬이며; m은 0, 1, 또는 2임); 및

(h) 상기 화합물 (a)-(g)의 임의의 산화 형태. 본 발명의 일 실시 형태에 있어서, 1,4-벤조티아제핀 유도체는 S4, S7, S-20, S-24, S-25, S-26, S-27, 및 S36로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 1,4-벤조티아제핀 유도체는 S36이다. 본 발명은 또한 대상에서 하나 이상의 심장 질병 (예를 들어, 심장 부정맥 (예를 들어, 빈맥; 심방 빈맥 및 심방 세동

(지속성 및 비지속성 둘 모두)을 포함하여 심방 부정맥; 심실 세동을 포함하여 심실 부정맥; 및 운동-유발성 심장 부정맥, 심부전 또는 운동-유발성의 심장성 돌연사)을 치료 또는 예방하는 방법에 있어서의 이러한 1,4-벤조티아제핀 유도체의 용도를 제공한다.

또한 본 발명은 FKBP12.6 및 RyR2의 결합을 증강시키는 기타 작은 생물학적 활성 분자의 정기적이거나 많은 처리량의 스크리닝을 위한 신규한 분석법을 제공한다. 특히, 본 발명은 RyR2 및 FKBP12.6의 결합을 증강시키는 약제의 확인 방법으로서, (a) RyR2의 공급원을 수득하거나 생성하는 단계; (b) 후보 약제의 존재 하에 RyR2를 FKBP12.6에 노출시키는 단계; 및 (c) 약제가 RyR2와 FKBP12.6의 결합을 증강시키는지 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시 형태에 있어서, RyR2는 PKA-인산화된다. 다른 실시 형태에 있어서, RyR2는 PKA-과인산화된다. 또다른 실시 형태에 있어서, RyR2는 비인산화된다.

본 발명의 방법에 있어서, RyR2는 고체상, 예를 들어, 플레이트 또는 비드에 고정시킨다. RyR2-FKBP12.6 결합의 탐지를 용이하게 하기 위하여, FKBP12.6을 (예를 들어 ^{32}S 로) 방사성(동위원소)으로 표지할 수 있다. 또한, RyR2와 FKBP12.6의 결합의 증강은 FKBP12.6-결합제를 사용하여 탐지할 수 있다. 일 실시 형태에 있어서, FKBP12.6-결합제는 항-FKBP12.6 항체이다. 또한 본 발명은 이 방법으로 확인되는 약제와, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법; 대상에서 심부전, 심방 세동, 또는 운동-유발성 심장 부정맥을 치료 또는 예방하는 방법; 및 대상에서 운동-유발성의 심장성 돌연사를 예방하는 방법에 있어서의 이 약제의 용도를 제공한다.

추가로, 본 발명은 RyR2와 FKBP12.6의 결합을 증강시키는 약제를 확인하는 방법으로서, (a) FKBP12.6의 공급원을 수득하거나 생성하는 단계; (b) 후보 약제의 존재 하에 FKBP12.6을 RyR2에 노출시키는 단계; 및 (c) 약제가 RyR2와 FKBP12.6의 결합을 증강시키는지 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일 실시 형태에 있어서, RyR2는 PKA-인산화된다. 다른 실시 형태에 있어서, RyR2는 PKA-과인산화된다. 또다른 실시 형태에 있어서, RyR2는 비인산화된다.

본 발명의 방법에 있어서, FKBP12.6은 고체상, 예를 들어, 플레이트 또는 비드에 고정시킨다. RyR2-FKBP12.6 결합의 탐지를 용이하게 하기 위하여, RyR2를 (예를 들어 ^{32}P 로) 방사성(동위원소)으로 표지할 수 있다. 또한, RyR2와 FKBP12.6의 결합의 증강은 RyR2-결합제를 사용하여 탐지할 수 있다. 일 실시 형태에 있어서, RyR2-결합제는 항-RyR2 항체이다. 또한 본 발명은 이 방법으로 확인되는 약제와, 대상에서 RyR2-결합 FKBP12.6의 수준의 감소를 제한 또는 방지하는 방법; 대상에서 심부전, 심방 세동, 또는 운동-유발성 심장 부정맥을 치료 또는 예방하는 방법; 및 대상에서 운동-유발성의 심장성 돌연사를 예방하는 방법에 있어서의 이 약제의 용도를 제공한다.

예로서, 그리고 하기 실시예 12에 예시되어 있는 바와 같이, 작은 분자용의 많은 처리량의 스크리닝을 위한 고도로 효율적인 분석법을, 표준 절차를 사용하여 글루타티온으로 코팅된 96웰 플레이트 상으로 FKBP12.6 (예를 들어, 야생형 FKBP12.6 또는 융합 단백질, 예를 들어 GST-FKBP12.6)을 고정시킴으로써 개발할 수 있다. PKA-인산화된 제2형 라이아노딘 수용체 (RyR2)를 FKBP12.6-코팅된 플레이트 상으로 로딩하고, 다양한 농도 (10-100 nM)의 JTV-519 유사체 및 기타 1,4-벤조티아제핀 유도체와 함께 30분 동안 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 플레이트를 세척하여 미결합 RyR2를 제거하고, 이어서 항-RyR2 항체와 함께 (예를 들어, 30분 동안) 인큐베이션할 수 있다. 플레이트를 다시 세척하여 미결합 항-RyR2 항체를 제거하고, 이어서 형광-표지 이차 항체로 처리할 수 있다. 플레이트는 결합 활성에 대하여 자동 형광 플레이트 판독기로 판독될 수 있다.

대안적으로는, RyR2는 ^{32}P -ATP의 존재 하에 PKA-인산화될 수 있다. 방사성 PAK-인산화된 RyR2는 다양한 농도 (10-100 nM)의 JTV-519 유사체 및 기타 1,4-벤조티아제핀 유도체의 존재 하에 30분 동안 FKBP12.6-코팅된 96웰 플레이트 상으로 로딩할 수 있다. 플레이트를 세척하여 미결합 방사성(동위원소) 표지화된 RyR2를 제거하고, 이어서 자동 플레이트 판독기로 판독할 수 있다. PKA-인산화 RyR2를 또한 플레이트에 코팅하고, 이 유사체 및 유도체의 존재 하에 ^{32}S -표지된 FKBP12.6과 함께 인큐베이션시킬 수 있다.

본 발명을 하기 실시예에서 설명하는데, 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 나타난 것이며, 하기에 이어지는 청구의 범위에 정의되어 있는 본 발명의 범주를 어떠한 방식으로든 제한하는 것으로 파악되어서는 아니된다.

실시예

실시예 1 - FKBP12.6-결합 생쥐

이전에 기술한 바와 같이, FKBP12.6-결함 생쥐를 생성하였다 (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]). 간략하게는, 인간 FK506 결합 단백질 12.6 (FKBP12.6)의 짝과 오르토로그 (orthologue)에 대한 생쥐 게놈 λ -과지 클론을, 전장 짝과 cDNA 프로브를 사용하여 DBA/IIcJ 라이브러리로부터 단리하였다. 표적화 벡터는, 3.5 kb의 짝과 게놈 DNA를 선발가능한 PGK-neo 마커로 대체함으로써 엑손 3 및 4가 결실되도록 고안하였는데, 상기 엑손은 짝과 FKBP12.6의 전체 코딩 서열을 포함한다 (문헌[Bennett et al., Identification and characterization of the murine FK506 binding protein (FKBP) 12.6 gene. Mamm. Genome, 9: 1069-71, 1998]). 5.0-kb의 5' 단편 및 1.9-kb의 3' 단편은 PGK-neo 및 PGK-TK 카세트를 포함하는 골격 벡터인 pJNS2 내로 클로닝하였다. 확립된 프로토콜을 사용하여 DBA/lacJ 배아 줄기 (embryonic stem, ES) 세포를 배양하고 트랜스펙션시켰다. 표적화 ES 세포는 먼저 서던 (Southern) 분석으로 스크리닝하고, 5개의 양성 ES 세포주를 PCR로 분석하여 상동 재조합을 확인하였다. 수컷 키메라를 DBA/IIcJ 암컷에 대하여 번식시키고, 생식 세포 자손을 갈색의 털 색상으로 확인하였다. 생식 세포 자손은 5' 서던 분석법을 사용하여 유전자형을 결정하였다. 양성 FKBP12.6^{+/+} 수컷 및 암컷을 상호 교배하였으며, 자손은 대략 25%의 빈도로 FKBP12.6^{-/-} 생쥐로 되었다. FKBP12.6^{-/-} 생쥐는 수정 능력을 갖는 것이었다.

FKBP12.6^{-/-} 생쥐를 이용하여 수행한 모든 연구에서는 연령- 및 성별-매치되는 FKBP12.6^{+/+} 생쥐를 대조로 사용하였다. 하기의 배경에 대하여 증대된 (raised) FKBP12.6^{-/-} 생쥐들 사이에는 차이가 전혀 관찰되지 않았다: DBA/C57BL6 혼합, 순수 DBA, 및 순수 C57BL6.

실시예 2 - 생쥐에서의 위격 측정 기록 및 운동 시험

FKBP12.6^{+/+} 및 FKBP12.6^{-/-} 생쥐는 Institutional Animal Care and Use Committee of Columbia University에 의해서 승인된 프로토콜에 따라 유지 및 연구하였다. 생쥐를 2.5%의 이소플루란 흡입 마취법을 사용하여 마취시켰다. 보행 동물의 ECG 방사성 위격 측정 기록은 복강내 이식한지 >7일 후에 수득하였다 (Data Sciences International, 미국 미네소타주 세인트 폴 소재) (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]). 스트레스 시험에 있어서, 생쥐를 피로해질 때까지 경사진 트레드밀 (treadmill) 상에서 운동을 하게 하고, 이어서 에피네프린을 복강내로 주사하였다 (0.5-2.0 mg/kg) (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]). 보행 동물의 휴식 심박동수를 4시간에 걸쳐 평균하였다.

실시예 3 - 야생형 및 RyR2-S2809D 돌연변이체의 발현

이전에 기술한 바와 같이, RyR2 상의 PKA 표적 부위의 돌연변이 유발 (RyR2-S2809D)을 수행하였다 (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]). HEK293 세포는, Ca²⁺ 포스페이트 침전법을 사용하여, 20 μ g의 RyR2 야생형 (WT) 또는 돌연변이체의 cDNA, 및 5 μ g의 FKBP12.6의 cDNA로 동시 트랜스펙션시켰다. 이전에 기술한 바와 같이 RyR2 통로를 포함하는 소포 (vesicle)를 제조하였다 (문헌[Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. Cell, 113: 829-40, 2003]).

실시예 4 - RyR2의 PKA 인산화 및 FKBP12.6의 결합

이전에 기술한 바와 같이 심장 SR 막을 준비하였다 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]; 문헌[Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca²⁺-release channels from cardiac muscle. Circ. Res., 78: 990-97, 1996]). ³⁵S-표지된 FKBP12.6을 Promega (미국 위스콘신주 매디슨 소재)로부터의 TNTTM Quick Coupled Transcription/Translation 시스템을 사용하여 생성하였다. [³H]라이아노딘 결합을 이용하여 RyR2의 수준을 정량화하였다. 100 μ g의 마이크로솜을 100 μ l의 10-mM 이미다졸 완충제 (pH 6.8)에 희석시키고 250-

nM (최종 농도)의 [^{35}S]-FKBP12.6과 함께 37°C에서 60분 동안 인큐베이션시키고, 이어서 500 μL 의 빙냉 이미다졸 완충제로 켄칭하였다 (quenched). 샘플을 100,000 g에서 10분 동안 원심분리하고 이미다졸 완충제에서 3회 세척하였다. 결합된 [^{35}S]-FKBP12.6의 양을 펠렛의 액체 섬광 계수법으로 측정하였다.

실시예 5 - 면역블롯

실온에서 1시간 동안 항-FKBP12/12.6 (1:1,000), 항-RyR-5029 (1: 3,000) (문헌[Jayaraman et al., FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). J. Biol. Chem., 267: 9474-77, 1992]), 또는 항-포스포RyR2-P2809 (1:5,000) (문헌[Reiken et al., Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. Circulation, 107: 2459-66, 2003])를 이용하여 상기한 바와 같이 마이크로솜 (50 μg)의 면역블로팅을 수행하였다. P2809-포스포에피토프-특이성 항-RyR2 항체는, Ser²⁸⁰⁹에서 PKA-인산화된 RyR2에 상응하는, 펩티드 CRTRRI-(pS)-QTSQ를 사용하여 Zymed Laboratories (미국 캘리포니아주 샌 프란시스코 소재)가 주문 생산한 친화성-정제 다중클론 토끼 항체이다. HRP-표지된 항-토끼 IgG (1:5,000의 희석물; Transduction Laboratories, 미국 켄터키주 렉싱턴 소재)와 함께 인큐베이션한 후, 블롯을 ECL (Amersham Pharmacia, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용하여 발색시켰다. 항체는 하기의 비로 또한 사용할 수 있다: 1:4,000 (항-토끼 IgG); 및 1:5,000 (항-RyR2-5029 및 항-FKBP12.6).

실시예 6 - 단일-통로 기록

이전에 기술된 바와 같이, 설치류 (생쥐 또는 쥐) 심장 유래의 천연 RyR2 또는 재조합 RyR2의 단일-통로 기록은 0 mV에서의 전압-클램프 (clamp) 조건 하에서 획득하였다 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]). 통로 기록에 사용되는 대칭 용액 (symmetric solution)은 트랜스 (trans) 구획용은 HEPES, 250 mmol/L; Ba (OH)₂, 53 mmol/L (몇몇 실험에서, Ba (OH)₂는 Ca (OH)₂로 대체함); pH 7.35였으며; 시스 (cis) 구획용은 HEPES, 250 mmol/L; 트리스-염기, 125 mmol/L; EGTA, 1.0 mmol/L; 및 CaCl₂, 0.5 mmol/L; pH 7.35였다. 달리 나타내지 않는 한, 단일-구획 기록은 시스 구획에서 150-nM의 [Ca²⁺] 및 1.0-mM의 [Mg²⁺]의 존재 하에 행하였다. 라이아노딘 (5 mM)을 시스 구획에 가하여 모든 통로의 신원을 확인하였다. 데이터는 Fetch 소프트웨어 (Axon Instruments, 미국 캘리포니아주 유니온 시티 소재)를 사용하여 디지털화 전류 기록으로부터 분석하였다. 모든 데이터는 평균 \pm SE로 표현한다. 실험들간의 평균 값의 통계학적 비교에 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t-검정 (unpaired Student's t-test)을 이용하였다. p<0.05의 값을 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

RyR2 통로에 대한 JTV-519의 영향을 도 1-3 및 표 1 (하기)에 나타낸다. 도 3에서 입증되는 바와 같이, 단일-통로 연구에 의하면 특정 PKA 저해제, PKI₅₋₂₄(C)의 존재 하에서의 PKA 인산화에 비하여, PKA 인산화 (D) 이후 RyR2의 개방 확률이 증가됨이 밝혀졌다. 단일-통로 기능은 JTV-519의 존재 하에 FKBP12.6과 함께 인큐베이션한 PKA-인산화 RyR2에서 정상화하였다 (E). 크기 도수 분포도 (우측)에 의하면 PKA-인산화 RyR2에서는 증가된 활성 및 서브컨덕턴스 개방이 나타났지만, JTV-519 및 FKBP12.6을 이용한 처리 이후에는 그러하지 않았다. 도 3F에는 JTV-519의 존재 하에 PKA-인산화 RyR2를 FKBP12.6RHK 함께 인큐베이션하면 RyR2 활성화의 Ca²⁺-의존성이 우측으로 이동하여, 이것이 비인산화 통로의 Ca²⁺-의존성과 유사해진다는 것이 도시되어 있다.

[표 1]

운동 전, 운동 동안, 및 운동과 에피네프린 주사 이후의 보행 ECG 데이터

	SCL (ms)	HR (bpm)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)
기준선						
FKBP12.6 ^{+/+}	104 ± 6	586 ± 36	32 ± 1.5	9.9 ± 0.4	30 ± 1.0	29 ± 0.6
FKBP12.6 ^{+/+} + JTV-519	99 ± 5	608 ± 32	33 ± 0.6	9.3 ± 0.3	32 ± 2.7	32 ± 1.9
FKBP12.6 ^{-/-} + JTV-519	116 ± 9	527 ± 43	33 ± 0.4	10.0 ± 0.3	33 ± 1.3	30 ± 1.1
최대 운동						
FKBP12.6 ^{+/+}	80 ± 2	752 ± 18	28 ± 0.7	8.7 ± 0.4	30 ± 1.7	33 ± 1.6
FKBP12.6 ^{+/+} + JTV-519	90 ± 7	676 ± 49	29 ± 1.8	9.6 ± 0.4	34 ± 2.0	36 ± 0.9
FKBP12.6 ^{-/-} + JTV-519	83 ± 3	729 ± 22	29 ± 2	9.3 ± 0.3	30 ± 1.2	33 ± 0.9
운동 이후 에피네프린						
FKBP12.6 ^{+/+}	94 ± 4	645 ± 28	35 ± 2.6	9.3 ± 0.4	33 ± 1.8	34 ± 1.9
FKBP12.6 ^{+/+} + JTV-519	102 ± 4	592 ± 21	37 ± 2.6	9.9 ± 0.6	32 ± 2.3	32 ± 1.7
FKBP12.6 ^{-/-} + JTV-519	103 ± 4	585 ± 20	35 ± 3.8	11.1 ± 0.5	36 ± 1.2	36 ± 1.3

JTV-519로 처리한 FKBP12.6^{+/+} 생쥐 (n = 8) 또는 대조 (n = 6), 및 JTV-519로 처리한 FKBP12.6^{-/-} 생쥐 (n = 5)에서의 보행 ECG 데이터의 요약. SCL = 정상 (sinus) 사이클의 길이; HR = 심박동수; ms = 밀리초; bpm = 분당 맥박수; FKBP12.6^{+/+} = FKBP12.6 이형접합성 생쥐; FKBP12.6^{-/-} = FKBP12.6 결함 생쥐

실시예 7 - 심부전의 쥐 모델

이전에 기술한 바와 같이 25마리의 Sprague-Dawley (300-400 g)는 좌측 개흉술을 통하여 좌측 관상 동맥을 결찰시켜 심근 경색을 생성하였다 (문헌 [Alvarez et al., Late post-myocardial infarction induces a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in rat cardiomyocytes. J. Mol. Cell Cardiol., 32: 1169-79, 2000]). 간략하게는, 쥐를 150 mg/kg의 복강내용 케타민 및 15 mg/kg의 클로르프로마진의 혼합물로 마취시켰다. 호흡은 환기 보조 장치 및 기관 튜브로 유지하였다 (3 ml의 공기/60 스트로크/분). 좌측 중앙 개흉술 및 심낭막 개방 후, 좌측의 주요 관상 동맥은 좌심방이 (left atria appendage) 아래의 가장 근접한 지점에서 7-0 실크 봉합으로 폐색시켰다. sham 수술 (sham-operated) 쥐 (n = 5)는 동일한 방식으로 처리하였지만, 관상 동맥 결찰은 없었다.

심근 경색 6주 후, 심부전을 심초음파를 이용하여 확인하였다. JTV-519 또는 비히클 (DMSO)을 이식가능한 삼투성 주입 펌프 (Alzet 미니-삼투 펌프; Durect Corporation, 미국 캘리포니아주 쿠퍼티노 소재)에 의해 연속적으로 주입하였다 (0.5 mg/kg/h). 4주간의 연속 처리 후, 심초음파 및 혈액 역학적 측정을 수행하였다. 동물을 희생시키고, 조직 샘플을 수확하였다.

상기 기술에 따르면, 심부전은 좌전하행 관상 동맥 (left anterior descending coronary artery)의 결찰에 의해 쥐에서 유발되었다. 이는, 4주 이내에, 심장 기능이 감소된, 확장성 심근증으로 발전하는 심근 경색으로 이어진다. 각 군이 25마리인 하기의 3개 군의 동물을 연구하였다: sham 수술 (대조), 심부전 + 치료 (JTV-519), 및 치료하지 않은 심부전 (비히클). 심초음파에 의해 측정되는 바와 같이, JTV-519를 이용한 4주간의 치료에 의해 심장 이완 및 심장 수축 기능 장애가 유의하게 감소되었다 (도 4). 따라서, JTV-519를 이용한 치료는 허혈 유발성 심부전의 쥐 모델에서 유의하게 심장 기능을 개선시키며 심부전의 진행을 감소시켰다.

항시적-PKA-인산화 RyR2 통로를 모방하는 돌연변이 RyR2-S2809D 통로를 사용하여, JTV-519가 RyR2 통로에 대한 FKBP12.6의 친화도를 증가시킨다는 것을 결정하였다 (도 5). 구체적으로는, JTV-519로 처리하면 FKBP12.6이 돌연변이 통로에 결합하는 것이 가능해지며, 그림으로써 JTV-519가 심부전을 방지하는 기작을 나타낸다. 또한 JTV-519로 처리하면 심부전의 RyR2 통로에서 누출이 방지되었다 (도 6). 또한, JTV-519는 PKA-인산화 RyR2 및 항시적-PKA-인산화 RyR2를 모방하는 돌연변이 RyR2-S2809D 둘 모두에의 FKBP12.6의 결합을 용량에 의존적인 방식으로 회복시켰다 (도 7).

실시예 8 - 심방 세동의 개 모델

a) 동물에 대한 프로토콜

이전에 기술된 기술을 사용하여, 체중이 24-26 kg인 암컷 성체 잡종 개에 심박 조율기를 이식하였다 (문헌[Dun et al., Chronic atrial fibrillation does not further decrease outward currents. It increases them. Am.J.Physiol. Heart Circ. Physiol., 285: H1378-84, 2003]). 동물을 티오펜탈 소독으로 마취시키고 (17 mg/kg, i.v.), 이소플루란 (1.5-2%) 및 O₂ (2 l/분)로 환기시켰다. 능동 고정형 리드를 우심방 돌기 및 우심방 자유벽에 이식하고, 피하로 관통시키고, 각각 Itrel 펄스 발생기 및 Thera 8962 심박 조율기 (Medtronic, 미국 미네소타주 미니아폴리스 소재)에 연결하였다. 40%의 포름알데히드 (0.1-0.3 ml)를 히스 (His) 다발에 주사하여 완전한 AV 차단을 성취하였다. 심실 심박 조율기를 60 bpm의 맥박수로 프로그래밍하고, 조율 프로토콜 전반에 걸쳐 이 맥박수로 유지하였다. 회복 이후, 심방 조율은 600-900 bpm의 맥박수로 실행에 옮겼으며, 46±3일 동안 유지하거나, 동물이 만성 AF (>계속된 조율의 부재 하에 >5일간의 AF로서 정의됨) 상태가 될 때까지 유지하였다.

이어서 동물을 펜토바르비탈 (30 mg/kg)로 마취시키고, 심장을 꺼내었다. 심방 조직을 해부하고, 액체 질소에 즉시 급속 냉동시키고, -80℃에서 보관하였다.

b) 심장 수확

본 연구에서 제시하는 인간에 대한 데이터는 Institutional Review Board of the New York Presbyterian Hospital에 의해 승인된 프로토콜 하에서 동소 심장 이식 이후 말기 심부전의 세팅의 심방 세동이 있는 환자 유래의 5개의 인간 심장에서부터 유래되었다. 이외에도, 데이터는 이식에 적합하지 않은 3개의 정상 심장으로부터 취한 샘플로부터 또한 얻었다. 이 식시에, 심장은 외식체로 과소칼슘성 과칼륨성 심장마비용 냉 (4℃) 용액으로 보존하였다.

c) RyR2의 면역침전 및 역-인산화

이전에 기술한 바와 같이 (문헌[Marx, et al., PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts, Cell, 101: 365-376, 2000]) 좌심방 (LA) 조직으로부터 준비한 심장 막 (100 μg)을 0.5 ml의 RIPA 완충제 (50 mM의 트리스-HCl [pH 7.4], 0.9% NaCl, 0.25% 트리톤 100x, 5 mM NaF, 및 프로테아제 저해제)에 현탁시키고, 이어서 토끼 항-RyR2 항체와 함께 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 단백질 A 세파로스 비드를 첨가하고, 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 단백질 A 비드를 1x 키나아제 완충제 (50 mM 트리스-HCl, 50 mM의 피페라진-N,N'-비스[2-에탄술폰산], 8 mM MgCl, 및 10 mM EGTA [pH 6.8])로 세척하고, 이어서 1.5x 키나아제 완충제에 재현탁시켰다. 반응을 PKA (5단위), 100 μM MgATP, 및 [³²P] ATP (NEN Life Sciences, 미국 보스턴 소재)로 시작하고, 이를 실온에서 8분 동안 인큐베이션시키고, 이어서 5의 6x 로딩 완충제 (4% SDS 및 0.25 M DTT)로 중지시켰다. 샘플을 95℃로 가열하고, 이어서 6% SDS-PAGE 상에서 크기별로 분획화하였다. RyR2 방사능은 Molecular Dynamics Phosphorimager, 및 Imagequant 소프트웨어 (Amersham Pharmacia Biotech, 미국 뉴저지주 페스카타웨이 소재)를 사용하여 정량화하였다. 값은 면역침전된 RyR2의 DD (면역블로팅 및 농도측정술로 측정함)으로 나누고, [³²P] ATP 신호의 역으로서 표현하였다.

d) JTV-519와의 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 재결합

RyR2를 심방 SR로부터 면역침전시키고 (100 μg), 상기한 바와 같이 1x 키나아제 완충제로 세척하였다. 면역침전된 RyR2를 PKA (5단위) 및 100 μM의 MgATP를 이용하여 실온에서 인산화시키고, 반응을 빙냉 RIPA 완충제를 이용한 세척으로 8분 후에 종결시켰다. 그 후 재조합 칼스타빈2 (FKBP12.6; 200 nM)을 1,4-벤조티아제핀 유도체, JTV-519 (1 μM)의 존재 또는 부재 하에 실온에서 인산화 RyR2와 함께 인큐베이션하였다. 반응물을 RIPA 완충제로 세척한 후, 단백질을 15% SDS PAGE로 크기별로 분획화하고, 칼스타빈2 (FKBP12.6)에 대하여 면역블로팅하였다.

실시에 8의 실험과 관련하여 본 발명자들이 얻은 결과가 하기에 요약되어 있다:

심방 RyR2의 조절

심방 RyR2를 상기 기술에 따라 PKA 인산화하였다 (도 8A). 동시-면역침전법으로 측정되는 바와 같이, 심방 RyR2의 PKA 인산화는 RyR2 거대분자 복합체에서 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 양을 감소시켰다 (도 8C). 심방 RyR2에 대하여 이전에 보고된 바와 같이 (문헌[Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release

channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000]), 심방 RyR2 거대분자 복합체는 칼스타빈2 (FKBP12.6), PKA의 촉매 서브유닛, PKA 조절 서브유닛 (RII), PP2A, PP1, 및 mAKAP를 포함하였다 (도 8B).

심방 세동에서 라이아노딘 수용체의 PKA 과인산화

면역침전된 RyR2의 PKA 인산화는, 대조에 비하여 지속성 심방 세동 (AF)이 있는 개 유래의 심방 조직에서 130% 증가하였다 (AF의 경우 $n = 6$ 이며, 대조의 경우 $n = 6$ 임, $P < 0.001$; 도 9A). 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 RyR2에의 결합은 대조에 비하여 지속성 AF가 있는 개 유래의 심방 조직에서 72% 감소하였다 (AF의 경우 $n = 7$ 이며, 대조의 경우 $n = 6$, $P < 0.0005$; 도 9A).

이와 유사하게, 면역침전된 RyR2의 PKA 인산화는, 대조에 비하여 심부전 세팅에서 만성 심방 세동이 있는 인간 유래의 심방 조직에서 112% 증가하였다 (AF의 경우 $n = 5$, 대조의 경우 $n = 3$, $P = 0.002$; 도 9B). 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 RyR2에의 결합은 70% 감소하였다 (AF의 경우 $n = 5$, 대조의 경우 $n = 3$, $P < 0.0001$; 도 9B).

모든 역-인산화 및 동시-면역침전 실험에 있어서, 로딩된 RyR2의 총량은 면역침전 RyR2와 항-RyR2-5029 항체와의 필적하는 면역블롯으로 확인하였다 (도 9A 및 도 9B).

심장 라이아노딘 수용체 통로의 기능

AF 개에서 관찰되는 RyR2 PKA 과인산화의 생리학적 유의도를 결정하기 위하여, 대칭 이온 조건을 사용하여 평면형 지질 이중막에서 0 mV에서 전압-클램프 조건 하에서 RyR2 단일-통로 측정치를 취하였다. 심방 RyR2 단일-통로의 특성은 5마리의 AF 개 유래의 17개의 통로와, 5마리의 대조 개 유래의 11개의 통로에서 연구하였다. 대조 개 유래의 통로는 활성 증가를 전혀 보여주지 못하였으며, 반면, AF 개 유래의 17개의 통로 중 15개의 통로 (88%)는 유의하게 증가된 개방 확률 (P_o ; AF: 0.412 ± 0.07 ; 대조: 0.008 ± 0.002 ; $P < 0.001$) 및 개폐 빈도 (F_o ; AF: 21.9 ± 4.6 ; 대조: $1.6 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$; $P < 0.002$)를 나타내었다 (도 10A 및 10B).

JTV-519의 존재 하에서의 칼스타빈2 (FKBP 12.6)의 재결합

JTV-519 (1 mM)로 처리하면 재조합 칼스타빈2 (FKBP12.6)는 정상 개 심근으로부터 분리한 PKA-인산화 RyR2에 결합하였다. JTV-519의 부재 하에서는, 칼스타빈2 (FKBP12.6)는 이러한 실험에서 PKA-인산화 RyR2와 결부될 수 없었다 (도 11 B).

JTV-519의 존재 하에서의 FKBP-12.6 재결합의 생리학적 유의성은 평면형 지질 이중막에서의 Ry2 단일-통로 측정에 의해 입증되었다. 단독의 재조합 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 존재 하에, 단일 통로는 두드러지게 비정상적인 거동을 보여주었으며, 개방 확률 (P_o)은 증가되었으며 서브컨덕턴스 상태가 존재하였다. 통로 기능에서의 이러한 비정상은 특이적 PKA 저해제 (PKI)를 첨가했을 때는 보이지 않았는데, 이는 통로 기능에서의 관찰된 비정상이 PKA에 의한 RyR2 인산화에 특이적이라는 것을 나타내는 것이다. 재조합 칼스타빈2 (FKBP12.6)의 존재 하에 PKA-인산화 통로를 JTV-519로 처리할 경우, 단일-통로에 대한 측정치는 PKI의 존재 하에서 관찰한 것과 유사하였다 (도 11A).

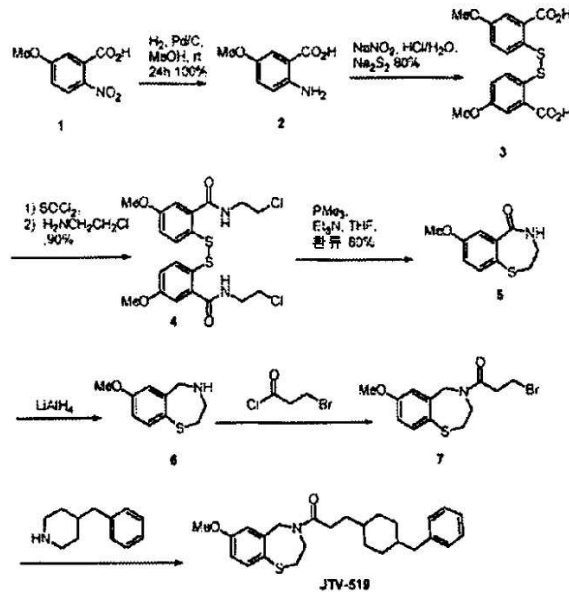
실시예 9 - 1,4-벤조티아제핀 유도체 및 JTV-519의 합성

생체 내 실험에 있어서, 본 발명자들은 그램 단위의 양의 JTV-519가 필요하였다. 그러나, 이 화합물을 보고된 1,4-벤조티아제핀 중간체, 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (하기 반응식 1에서의 화합물 6)를 통하여 제조하려는 처음의 시도는 성공적이지 못하였다. 이 중간체의 티오기는 공기에 의해 디설피드 화합물로 용이하게 산화되며, 이는 환화 생성물 (5)의 합성을 불가능하게 한다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 본 발명자들은 손쉽게 입수가 가능하며 값싼 2-니트로-5-메톡시벤조산 (1)으로 출발하는 신규한 공정을 개발하였다. 이 공정이 하기 반응식 1에 나타내어져 있다.

촉매로서 Pd/C를 이용하여 H_2 를 사용하여 화합물 (1)의 니트로기를 환원시켜 2-아미노-5-메톡시벤조산 (2)을 정량적 수율로 생성하였다. 화합물 (2)를 $NaNO_2$ 로 디아조화하고, 이어서 Na_2S_2 로 처리하여 안정한 디설피드 화합물 (3)을 80% 수율로 제공하였다. 추가의 정제 없이, 안정한 디설피드 (3)를 $SOCl_2$ 로 처리하고, 이어서 Et_3N 의 존재 하에 2-클로로에틸아

민과 반응시켜 아미드 (4)를 90% 수율로 생성하였다. 화합물 (4)를 THF 중 Et₃N 및 트리메틸포스핀을 이용하여 환류에 의해 단일-포트 절차를 통하여 환화 화합물 (5)로 전환시켰다. 이어서 환화 아미드 (5)를 LiAlH₄로 환원시켜 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (6)을 생성하였다.

반응식 1

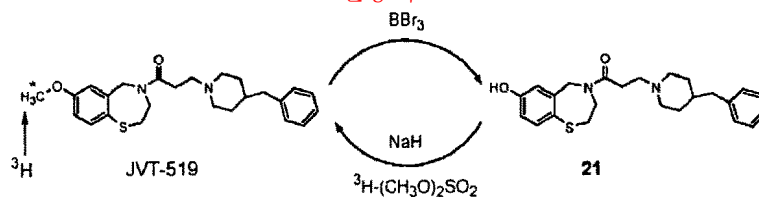


JTV-519는 화합물 (6)을 3-브로모프로피온산 클로라이드와 반응시키고 이어서 생성된 생성물을 4-벤질 피페리딘과 반응시킴으로써 제조하였다. JTV-519의 구조는 ¹H NMR로 확립하였다.

실시예 10 - 방사성(동위원소) 표지화된 JTV-519의 합성

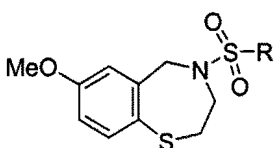
방사성(동위원소) 표지화된 JTV-519의 합성에 있어서의 본 발명자들의 신규한 공정이 하기 반응식 2에 예시되어 있다. 방사성(동위원소) 표지화된 JTV-519의 제조를 위하여, JTV-519를 BBr₃을 사용하여 페닐 고리에서 탈메틸화하여 페놀 화합물 (21)을 생성하였다. 페놀 화합물 (21)을 염기 (NaH)의 존재 하에 방사성(동위원소) 표지화된 메틸화제 (³H-디메틸 술페이트)로 재메틸화하여 ³H-표지 JTV-519를 제공하였다 (반응식 2).

반응식 2



실시예 11 - 신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체 및 그의 합성 방법

본 발명자들은 또한 심장 부정맥의 치료 및 예방에 사용하기 위한 신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체를 개발하였다. 특히, 본 발명자들은 하기의 일반 구조를 갖는 화합물을 제조하였다:

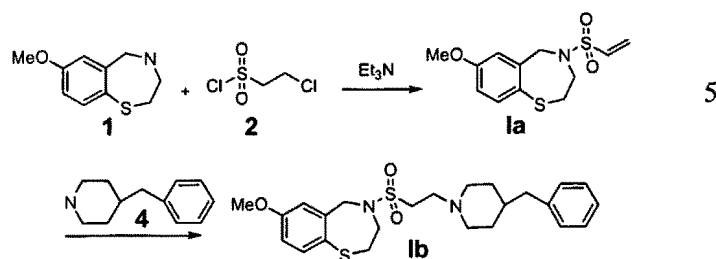


여기서, R은 아릴, 알케닐, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며; R'은 알킬 또는 시클로알킬이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 염기, 예를 들어 Et_3N 의 존재 하에 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀을 알킬술포닐 클로라이드 또는 아릴술포닐 클로라이드와 반응시킴으로써 제조하였다. 추가의 반응 (예를 들어, 4-벤질 피페리딘의 첨가)을 수반하여 원할 경우 측쇄를 연장시킬 수 있다. 이러한 일반적인 공정의 대표적인 합성법이 하기 반응식 3에 예시되어 있다.

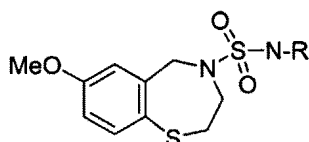
반응식 3이 보여주는 바와 같이, 2-클로로에탄술포닐 클로라이드 (180 mg; 1.1 mM) 및 Et_3N (140 mg; 1.1 mM)은 $0^\circ C$ 에서 CH_2Cl_2 (20 ml) 중 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (1) (194 mg; 1 mM)에 첨가하였다. 이 혼합물을 $0^\circ C$ 에서 2시간 동안 교반시키고, H_2O 및 포화 $NaHCO_3$ 용액으로 세척하였다. 용매를 제거하여 조 생성물 (Ia)를 생성하고, 이를 실리카 겔 상에서 크로마토그래피로 (석유 에테르:에틸 아세테이트 = 3:1) 정제하였다. 이 합성법으로부터의 수율은 280 mg, 또는 95%였다. 구조는 NMR로 확인하였다.

반응식 3에는 또한 화합물 (Ia)의 측쇄를, 화합물 (Ia) (28 mg; 0.1 mM)을 CH_2Cl_2 중 4-벤질 피페리딘 (21 mg; 0.13 mM)과 반응시킴으로써 연장시킨다는 것이 예시되어 있다. 반응의 완료 후 (TLC에 의한 것임), 여분의 아민을 염기 제거제 (3-(2-숙신산 무수물)프로필작용화 실리카 겔, 0.5g)로 제거하였다. 1H NMR 및 HPLC에 의하면, 생성물 (Ib)의 순도는 >98%라는 것이 밝혀졌다.

반응식 3



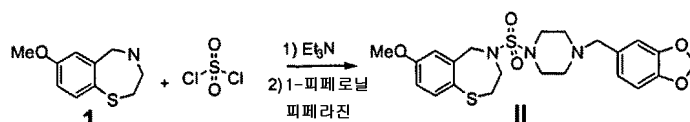
추가로, 본 발명자들은 하기 일반 구조를 갖는 화합물을 제조하였다:



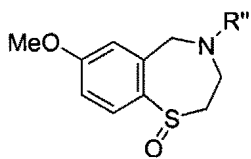
여기서, R은 아릴, 알킬, $-(CH_2)_nNR'_2$, 또는 $-(CH_2)_nSR'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며; R'은 알킬 또는 시클로알킬이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (1)을 염기 (Et_3N)의 존재 하에 술폰릴 클로라이드와, 이어서 일차 또는 이차 아민과 단일-포트 반응시킴으로써 제조하였다. 이러한 일반 공정의 대표적인 합성법이 하기 반응식 4에 예시되어 있다.

반응식 4가 보여주는 바와 같이, 술폰릴 클로라이드 (15.0 mg; 0.111 mM) 및 Et_3N (28.0 mg; 0.22 mM)을 $0^\circ C$ 에서 CH_2Cl_2 (20 ml) 중 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (1) (19.4 mg; 0.1 mM)에 첨가하였다. 이 혼합물을 $0^\circ C$ 에서 2시간 동안 교반시킨 후, 1-피페로닐피페라진 (27 mg; 0.12 mM)을 첨가하였다. 이 혼합물을 추가로 2시간 동안 교반시키고, 이어서 H_2O 및 포화 $NaHCO_3$ 용액으로 세척하였다. 여분의 아민을 염기 제거제 (3-(2-숙신산 무수물)프로필작용화 실리카 겔, 0.2 g)의 첨가로 제거하였다. 이 합성법으로부터의 수율은 36 mg, 또는 77%였다.

반응식 4

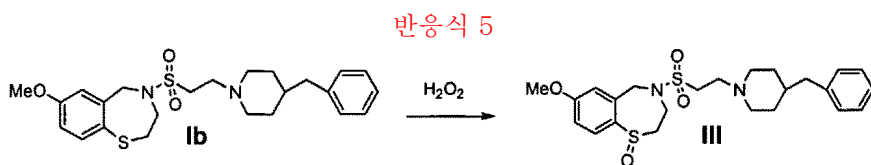


본 발명자들은 하기 일반 구조를 갖는 화합물도 제조하였다:

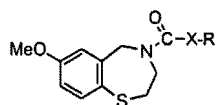


여기서, R''은 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'''_2$, $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'''_2$, 또는 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'''_2$ 이며, X는 N 또는 S이며, n은 1, 2, 또는 3이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 과산화수소를 이용하여 상기의 신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체 중 하나를 산화시키거나 JTV-519를 산화시켜 제조하였다. 이러한 일반 공정의 대표적인 합성법이 하기 반응식 5에 예시되어 있다.

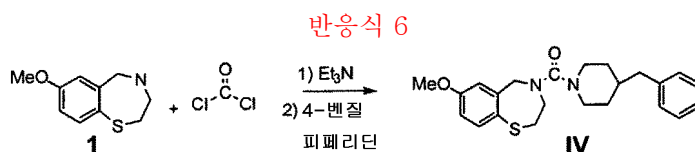
반응식 5가 보여주는 바와 같이, MeOH(5 ml) 중 화합물 (Ib) (21 mg; 0.05 mM)를 H_2O_2 (0.1 ml, 과량)에 첨가하였다. 이 혼합물을 2일 동안 교반시키고, 생성물 III을 실리카 겔 상에서 크로마토그래피로 (CH_2Cl_2 :MeOH = 10:1) 정제하였다. 이 합성법으로부터의 수율은 19 mg, 또는 91%였다.



마지막으로, 본 발명자들은 하기 일반 구조를 갖는 화합물을 제조하였다:



여기서, R은 아릴, 알킬, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ 이며, n은 0, 1, 2, 또는 3이며, R'은 알킬, 시클로알킬이며, X는 NH 또는 O이다. 이러한 일반 구조의 신규한 화합물은 7-메톡시-2,3,4,5-테트라히드로-1,4-벤조티아제핀 (1)을 염기 (Et_3N)의 존재 하에 트리포스젠과 반응시키고, 이어서 일차 또는 이차 아민 또는 알코올을 첨가함으로써 제조하였다. 이러한 일반 공정의 대표적인 합성법이 하기 반응식 6에 예시되어 있다.



실시예 12 - 많은 처리량의 스크리닝을 위한 분석

본 발명자들은 작은 생물학적 활성 분자의 스크리닝을 위한 분석법을 개발하였다. 이러한 분석법은 FKBP12 단백질의 RyR에의 재결합에 기초한다.

작은 분자에 대한 많은 처리량의 스크리닝을 위한 고도로 효율적인 분석법은 글루타티온으로 코팅된 96웰 플레이트 상으로 FKBP12.6 (GST-융합 단백질)을 고정시킴으로써 개발할 수 있다. PKA-인산화 제2형 라이아노딘 수용체 (RyR2)를 FKBP 12.6-코팅된 플레이트 상으로 로딩하고, 다양한 농도 (10-100 nM)의 JTV-519 유사체와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 플레이트를 세척하여 미결합 RyR2를 제거하고, 이어서 항-RyR2 항체와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 세척하여 미결합 항-RyR2 항체를 제거하고, 이어서 형광-표지 이차 항체로 처리하였다. 플레이트를 결합 활성에 대하여 자동 형광 플레이트 판독기로 판독한다.

대안적인 분석법에 있어서, RyR2를 ^{32}P -ATP의 존재 하에 PKA-인산화시킨다. 방사성 PKA-인산화 RyR2를 다양한 농도 (10-100 nM)의 JTV-519 유사체의 존재 하에 30분 동안 FKBP12.6-코팅된 96웰 플레이트 상으로 로딩한다. 플레이트를 세척하여 미결합 방사성 동위원소 표지 RyR2를 제거하고, 이어서 자동 플레이트 판독기로 판독한다.

실시예 13 - FKBP12.6의 RYR2와의 재결합을 허용하는 신규한 1,4-벤조티아제핀 유도체

심장 근소포체 (SR)를 PKA로 실온에서 30분 동안 인산화하여, RyR2 복합체로부터 FKBP12.6을 완전히 해리시켰다. 이어서 SR (50 mg)을 실온에서 30분 동안 250 nM FKBP12.6 및 시험 화합물과 함께 인큐베이션하였다. 샘플을 100,000 g에서 10분 동안 원심분리하고, 펠렛을 10 mM의 이미다졸 완충제로 3회 세척하였다. 세척 후, 단백질을 15% PAGE로 분리하였다. 면역블롯을 항-FKBP 항체를 사용하여 발색시켰다. 이 연구의 결과가 도 12에 나타내어져 있다.

실시예 14 - 생쥐에서의 위격 측정 기록 및 운동/EKG 시험

연구는 FKBP12.6^{+/−} 생쥐 (개재 군), 연령- 및 성별-매치 FKBP12.6^{−/−} 생쥐 (양성 대조) 및 야생형 FKBP12.6^{+/+} 생쥐 (음성 대조)를 이용하여 수행하였다. (FKBP12.6^{−/−})의 FKBP12.6 단백질의 부재, 또는 (FKBP12.6^{+/−})의 FKBP12.6 단백질의 감소는 심장 조직에서의 면역블로팅으로 입증하였다.

JTV-519 (혈장 중 표적의 농도: 1.0 μM) 또는 유도체, S36 (혈장 중 표적의 농도: 1.0 μM 또는 0.02 μM)은 운동 시험 이전에 시간 당 1.0 μL 의 속도로 7일 동안 미니-삼투 펌프 (Alzet Durect Co., 미국 캘리포니아주 쿠퍼티노 소재)를 통하여 FKBP12.6^{+/−} 또는 FKBP12.6^{−/−} 생쥐 내로 연속적으로 약물을 피하 주입하였다. 생쥐는 케타민 (50 $\mu\text{g/kg}$) 및 자일라진 (10 $\mu\text{g/kg}$)의 복강내 주사법을 이용하여 마취시키고, 라디오 EKG 전송기를 이식하였다. 보행 동물의 ECG 라디오 위격 측정 기록은 복강내 이식 이후 1주일에 얻었다 (Data Sciences International, 미국 미네소타주 세인트 폴 소재). 표준 기준을 사용하여 ECG 파라미터를 측정하였다.

스트레스 시험에 있어서, 생쥐는 계단식으로 피로해질 때까지 경사진 트레드밀 상에서 운동시키고, 이어서 최대의 교감 신경 자극을 위하여 에피네프린 (0.2 mg/kg)을 복강내로 주사하였다. 이어서 보행 동물의 휴식 심박동수를 4시간에 걸쳐 평균하였다. 운동 시험 후의 회복, 및 운동 후 사건의 모니터링을 하룻밤 수행하였다. 정상-사이클 길이 (sinus-cycle length, SCL)와, PR, QRS, 및 QT의 간격을 측정하고, 맥박수 보정 QT 간격 (QTc)을 Mitchell 식을 사용하여 계산하였다. 혈장 중 약물의 수준을 HPLC로 확인하였다. 결과가 도 13에 요약되어 있다.

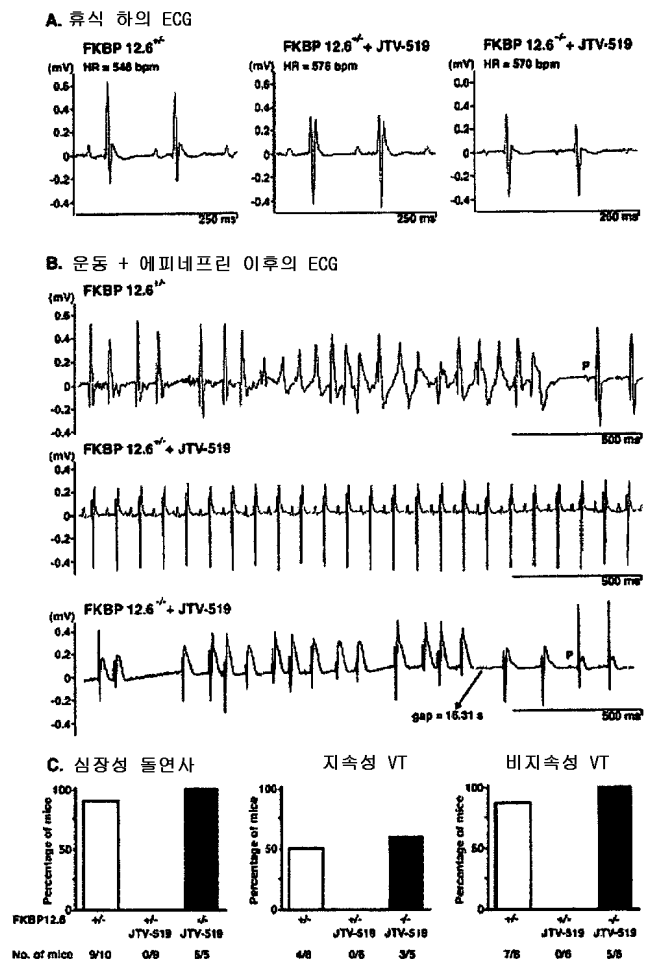
실시예 15 - 심부전의 쥐 모델에서 심장 수축성을 개선시키는 JTV-519

쥐는 좌측 관상 동맥의 결찰에 의해 심근 경색 (MI)에 처하였다. 이식성 삼투 펌프 (Alzet, Durect Corporation, 미국 캘리포니아주 쿠퍼티노 소재)를 사용하여 JTV-519 ($n = x$) 또는 비히클 ($n = x$)을 이용한 처리를 MI 직후 시작하였다. 심근 수축 (Ds) 및 이완 (Dd)에서의 직경은 MI 이후 24시간 및 6주에 심초음파를 이용하여 유두 중앙에서 측정하고, 이어서 분획 단축률 (fractional shortening)을 계산하였다. 도 14에 도시되어 있는 바와 같이, JTV-519로 처리하면 심부전이 있는 쥐에서 심장 기능이 유의하게 개선되었다.

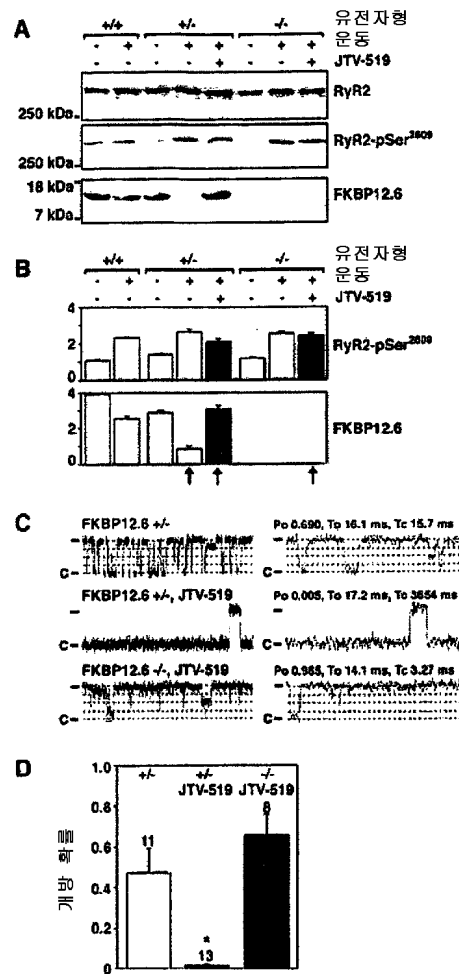
전술한 발명을 명료함 및 이해를 위해 일부 상세하게 기술하였지만, 당업계의 숙련자라면 본 개시 내용을 읽음으로써 첨부되는 청구의 범위에서의 본 발명의 실제 범주로부터 벗어남이 없이 형태 및 상세한 사항을 다양하게 변화시킬 수 있음을 인식할 것이다.

도면

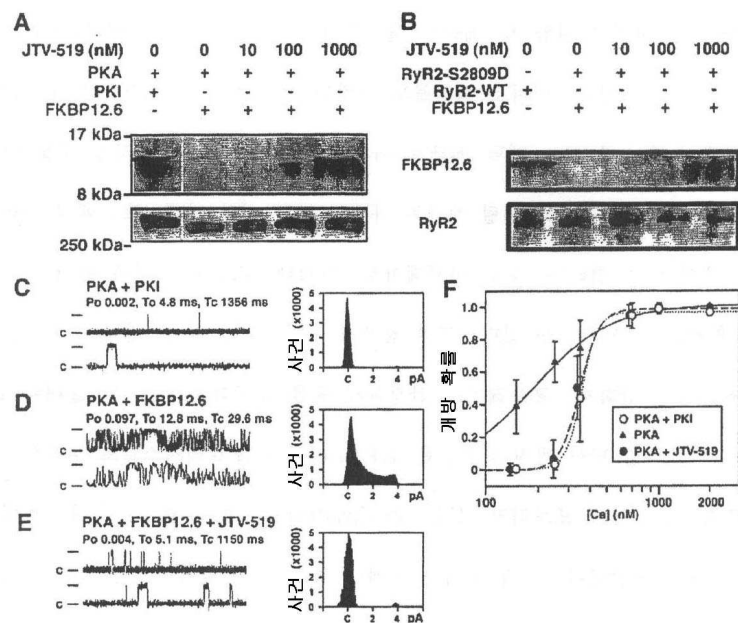
도면1



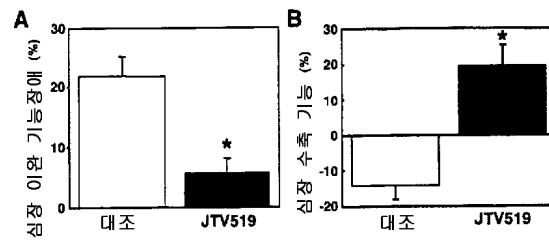
도면2



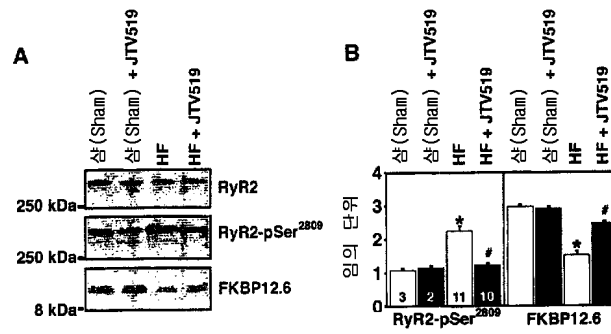
도면3



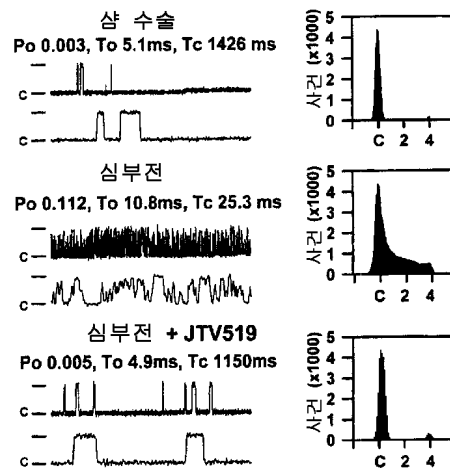
도면4



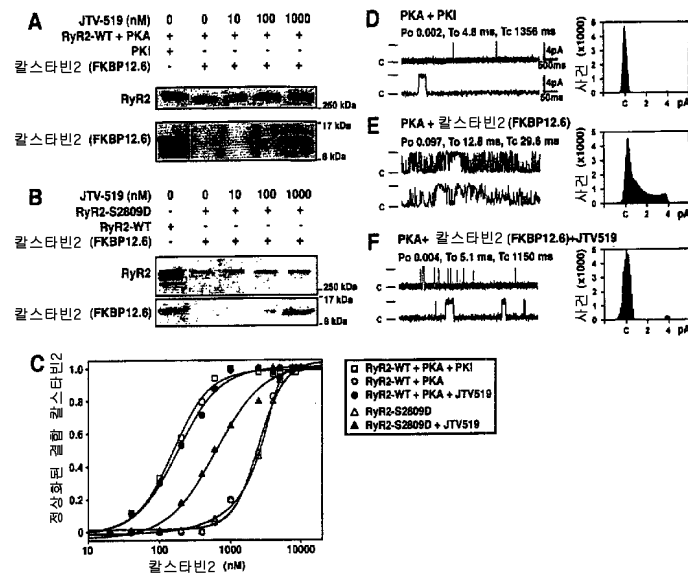
도면5



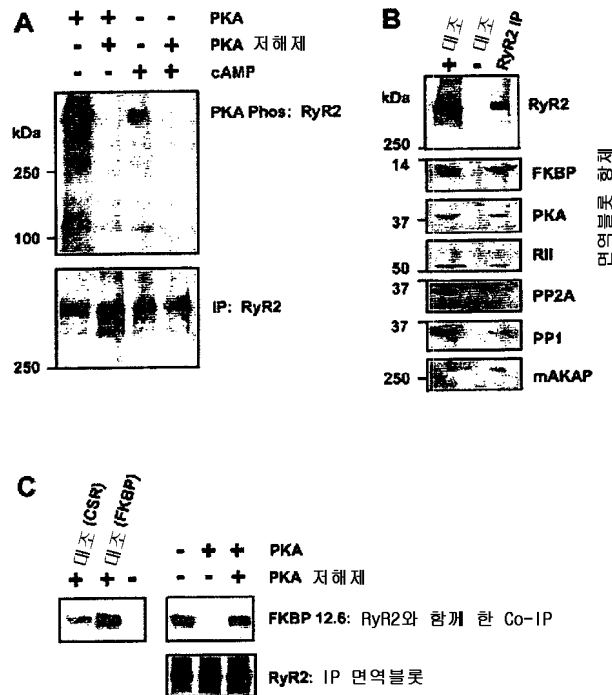
도면6



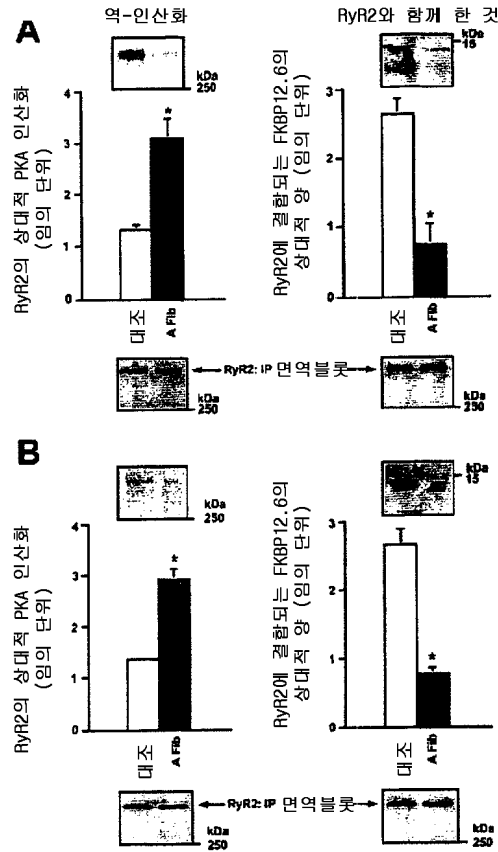
도면7



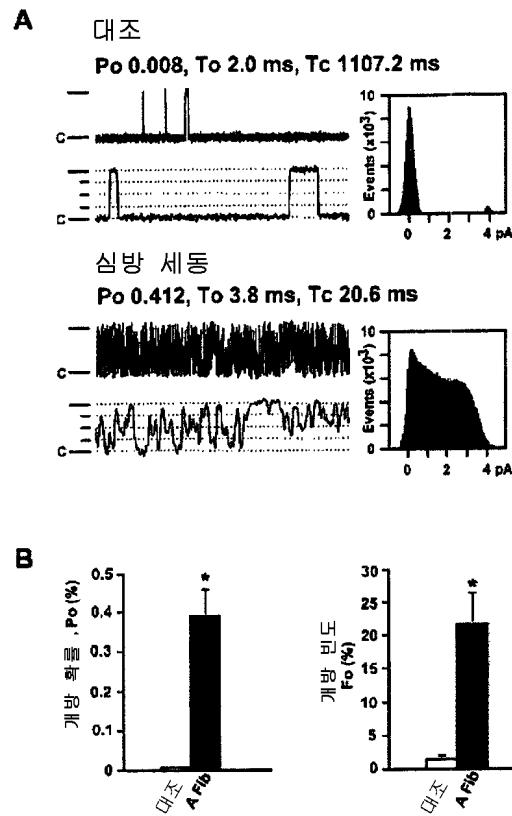
도면8



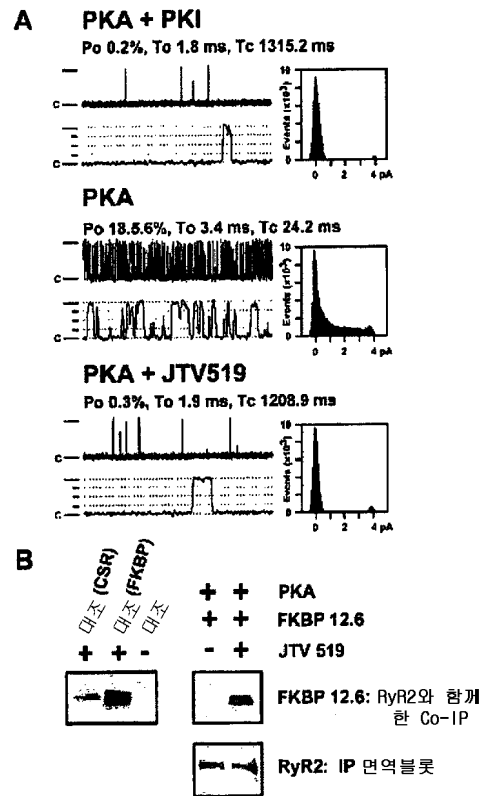
도면9



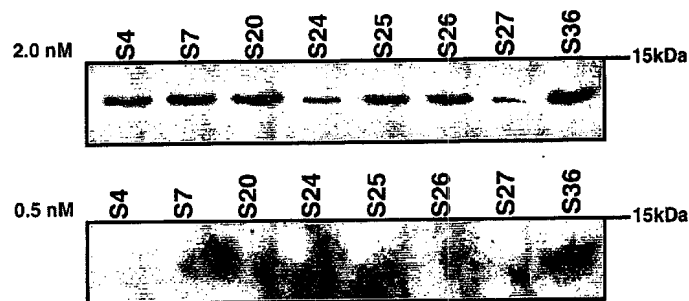
도면10



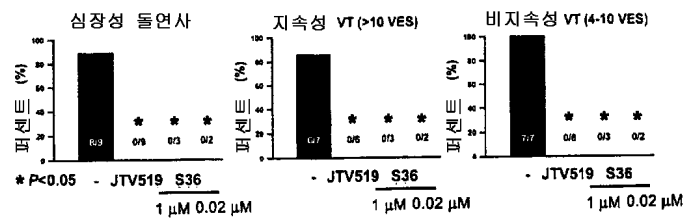
도면11



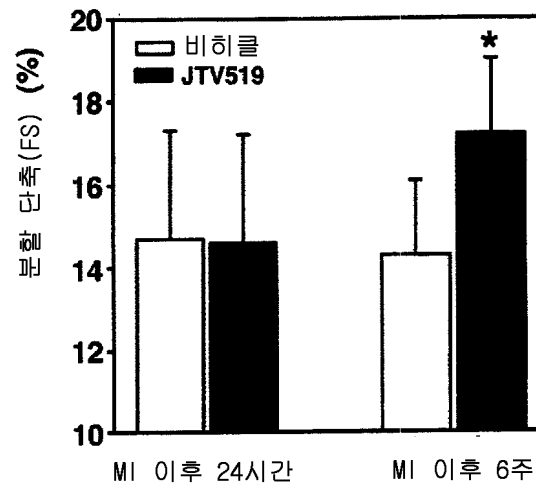
도면12



도면13



도면14



도면15

