



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101704799 B

(45) 授权公告日 2013.06.05

(21) 申请号 200910225228.X

A61P 9/06 (2006.01)

(22) 申请日 2005.03.22

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

EP 1147772 A1, 2001.10.24, 全文.

10/809,089 2004.03.25 US

US 2004048780 A1, 2004.03.11, 全文.

(62) 分案原申请数据

审查员 韦欣煜

200580015600.4 2005.03.22

(73) 专利权人 纽约市哥伦比亚大学理事会

地址 美国纽约

(72) 发明人 A·R·马克司 D·W·兰德瑞 S·邓

Z·Z·程

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

(51) Int. Cl.

C07D 281/10 (2006.01)

A61K 31/554 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书55页 附图10页

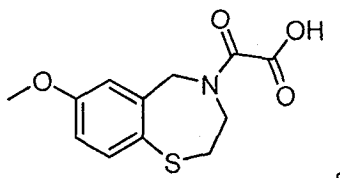
(54) 发明名称

靶向兰诺定受体渗漏的新颖抗心律失常和心力衰竭药物及其应用

(57) 摘要

本发明提供了限制或预防受试者中 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降的方法。本发明进一步提供了治疗和预防受试者房性和室性心律失常、心力衰竭和运动诱发的心源性猝死的方法。另外,本发明提供了 JTV-519 在限制或预防患有心房纤颤或成为心房纤颤候补者的受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降的方法中的应用。还提供了 1,4- 苯并硫氮杂草类衍生物在治疗和预防受试者房性和室性心律失常和心力衰竭和用于预防运动诱发的心源性猝死的方法中的应用。本发明还提供了鉴定用于治疗 and 预防心房纤颤和心力衰竭的活性剂的方法和通过这些方法鉴定的活性剂。

1. 下式结构表示的化合物，



2. 药物组合物,其包含权利要求1的化合物和药学上可接受的载体、添加剂或稀释剂。

3. 根据权利要求2的药物组合物,其包含下列物质中的一种或多种:抗氧化剂、着色剂、矫味剂、防腐剂、增甜剂、粘合剂、润滑剂、羧甲基纤维素、结晶纤维素、甘油、阿拉伯树胶、乳糖、硬脂酸镁、甲基纤维素、盐水、藻酸钠、蔗糖、淀粉、滑石粉或水;该药物组合物为胶囊、片剂、粉末、颗粒或混悬剂的形式。

4. 根据权利要求2或3的药物组合物,其用于制备药物,该药物用于限制或预防患有心脏病况的受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降。

5. 根据权利要求2或3的药物组合物,其用于制备药物,该药物用于治疗或预防受试者的心脏病况。

6. 根据权利要求4或5的药物组合物,其中所述的心脏病况是心律失常、心动过速、心房纤颤、心室纤颤、心力衰竭或心源性猝死。

7. 根据权利要求6的药物组合物,其中所述的心律失常是房性心律失常或室性心律失常;所述的心房纤颤是持续性心房纤颤或非持续性心房纤颤;所述的心动过速是室性心动过速;并且所述的心源性猝死是运动诱发的心源性猝死。

8. 根据权利要求7的药物组合物,其中所述的房性心律失常是房性快速性心律失常;并且所述的室性心动过速是持续性室性心动过速、非持续性室性心动过速或儿茶酚胺能多形态性室性心动过速。

9. 根据权利要求6的药物组合物,其中所述的心脏病况是心力衰竭。

10. 根据权利要求6的药物组合物,其中所述的心脏病况是儿茶酚胺能多形态性室性心动过速。

11. 权利要求1的化合物在制备药物中的用途,其中所述药物用于限制或预防患有心脏病况的受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平的下降,或用于治疗或预防受试者的心脏病况。

12. 根据权利要求11的用途,其中所述的心脏病况是心律失常、心动过速、心房纤颤、心室纤颤、心力衰竭或心源性猝死。

13. 根据权利要求12的用途,其中所述的心律失常是房性心律失常或室性心律失常;所述的心房纤颤是持续性心房纤颤或非持续性心房纤颤;所述的心动过速是室性心动过速;并且所述的心源性猝死是运动诱发的心源性猝死。

14. 根据权利要求13的用途,其中所述的房性心律失常是房性快速性心律失常;并且所述的室性心动过速是持续性室性心动过速、非持续性室性心动过速或儿茶酚胺能多形态性室性心动过速。

15. 根据权利要求12的用途,其中所述的心脏病况是心力衰竭。

16. 根据权利要求12的用途,其中所述的心脏病况是儿茶酚胺能多形态性室性心动过速。

靶向兰诺定受体渗漏的新颖抗心律失常和心力衰竭药物及其应用

[0001] 本申请是申请号为 200580015600.4、申请日为 2005 年 3 月 22 日、发明名称为“靶向兰诺定受体 (RyR2) 渗漏的新颖抗心律失常和心力衰竭药物及其应用”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求 2004 年 3 月 25 日提交的美国部分继续申请流水号 US10/809,089 的利益；要求 2004 年 1 月 22 日提交的美国部分继续申请顺序号 US 10/763,498 的利益；要求 2003 年 10 月 7 日提交的美国部分继续申请流水号 US 10/680,988 的利益；要求 2003 年 6 月 26 日提交的美国部分继续申请流水号 US 10/608,723 的利益；要求 2002 年 11 月 5 日提交的美国部分继续申请流水号 US 10/288,606 的利益；要求 2000 年 5 月 10 日提交的美国部分继续申请流水号 US 09/568,474 的利益，它是 2002 年 12 月 3 日授权的目前美国专利 US 6,489,125 B1；将这些文献的内容引入本文作为参考。

[0004] 政府利益的声明

[0005] 本发明在 NIH Grant No. PO 1 HL 67849-01 下得到政府支持。照此，美国政府拥有本发明中的某些权利。

[0006] 发明背景

[0007] 尽管在治疗中取得了进展，但是充血性心力衰竭仍然是西方国家中死亡率的重要原因。心力衰竭仅在美国就影响了 5 百万个体，并且特征在于 5- 年死亡率 ~ 50% (Levy 等，“心力衰竭的发生率和存活率的长期趋势”，N. Engl. J. Med. , 347 :1397-402, 2002)。

[0008] 心力衰竭的重要标志为心肌收缩力下降 (Gwathmey 等，“来自具有晚期心力衰竭患者的心肌中的异常胞内钙控制，Circ. Res. , 61 :70-76, 1987)。在健康心肌和其它横纹肌 (striated) 中，肌质网 (SR)、包括兰诺定受体 (ryanodine receptor) (RyRs) 上的钙释放通道有利于动作电位与肌细胞收缩的偶联 (即兴奋 - 收缩 (EC) 偶联)。当钙 (Ca^{2+}) 从 SR 释放入周围胞质时，收缩开始。在心力衰竭中，收缩异常部分是因使得心脏动作电位 (AP) 引起收缩的信号传导级联改变所致。特别地，在受损心脏中，全细胞 Ca^{2+} 暂态 (transient) 振幅下降 (Beuckelmann 等，“来自患有晚期心力衰竭的患者的离体心室肌细胞中胞内钙控制”，Circ. , 85 :1046-55, 1992 ;Gomez 等，“实验性心脏肥厚和心力衰竭中缺陷型兴奋收缩偶联”，Science, 276 :800-06, 1997)，并且期限延长 (Beuckelmann 等，“来自患有晚期心力衰竭的患者的离体心室肌细胞中胞内钙控制”，Circ. , 85 :1046-55, 1992)。

[0009] 已知心力衰竭的常见特征心律失常与结构正常心脏中的 SR Ca^{2+} 渗漏有关。在这些情况中，室性心动过速诱导和维持的最常见机制为自主性异常。

[0010] 称作触发性心律失常的自主性异常中的一种形式与 SR Ca^{2+} 异常释放有关，它启动延迟后除极或 DADs (Fozzard, H. A. , “后去极化和触发活动”，Basic Res. Cardiol. , 87 :105-13, 1992 ;Wit 和 Rosen, “心律失常的病理生理机制”，Am. Heart. J. , 106 :798-811, 1983)。DADs 为心脏动作电位复极化后发生的心肌细胞中的异常去极化。尚未完全阐明了导致 DADs 的异常 SR Ca^{2+} 释放的分子基础。然而，已知 DADs 被兰诺定阻断，由此提供了 RyR2

可能在这种异常 Ca^{2+} 释放的发病机制中起关键作用的证据 (Marban 等, “白鼬心室肌肉中致心律失常性延迟后除极和早期后除极的机制”, J. Clin. Invest., 78:1185-92, 1986; Song 和 Belardinelli, “ATP 促进心肌细胞中后去极化和触发活动的发展”, Am. J. Physiol., 267: H2005-11, 1994)。

[0011] 人中最常见的心律失常为心房纤颤 (AF)。它代表了发病率和死亡率的主要原因 (Chugh 等, “心房纤颤的流行病学和自然历史: 临床内含”, J. Am. Coll. Cardio., 37: 371-78, 2001; Falk, R. H., 心房纤颤, N. Engl. J. Med., 344:1067-78, 2001)。然而, 尽管存在其临床重要性, 但是对 AF 的治疗选择仍然受限, 部分是由于其基础分子机制难以理解这一事实所致。

[0012] 所有患有心脏病的患者中有约 50% 死于致命性心律失常。致命性心律失常实际上通常为室性的。在某些情况中, 心脏中的室性心律失常可以迅速致命 - 称作 “心源性猝死” (SCD)。致命性心律失常 (和 SCD) 还可能在年轻人中间发生, 另外, 还可能在尚不知存在结构性心脏病的健康个体中发生。实际上, 室性心律失常是猝死, 否则就是健康个体中猝死的最常见原因。

[0013] 儿茶酚胺能多形态性室性心动过速 (CPVT) 为存在结构异常心脏的个体中的遗传疾病。其特征在于紧张状态诱导的室性心动过速 - 可能导致 SCD 的致命性心律失常。在患有 CPVT 的受试者中, 强体力活动和 / 或紧张状态诱发在没有可检测到的结构性心脏病存在下导致 SCD 的双侧和 / 或多形态性室性心动过速 (Laitinen 等, “家族性多形性室性心动过速中的心脏兰诺定受体 (RyR2) 基的突变”, Circulation, 103:485-90, 2001; Leenhardt 等, “儿童中的儿茶酚胺能多形态性室性心动过速: 21 位患者的 7 年随访”, Circulation, 91: 1512-19, 1995; Priori 等., “患有儿茶酚胺能多形态性室性心动过速的患者的临床和分子特征”, Circulation, 106:69-74, 2002; Priori 等, “基于儿茶酚胺能多形态性室性心动过速中的心脏兰诺定受体基因 (hRyR2) 的突变”, Circulation, 103:196-200, 2001; Swan 等, “染色体 q42-q43 作图的心律失常疾病在结构异常心脏中导致恶性儿茶酚胺能多形态性室性心动过速”, J. Am. Coll. Cardiol., 34:2035-42, 1999)。

[0014] CPVT 主要是以常染色体显性方式遗传。患有 CPVT 的个体在进行运动时发生室性心律失常, 但在静止时不会发生心律失常。关联研究和直接测序已经鉴定了患有 CPVT 的个体中染色体 q42-q43 上的人 RyR2 基因的突变 (Laitinen 等, “家族性多形性室性心动过速中的心脏兰诺定受体 (RyR2) 基的突变”, Circulation, 103:485-90, 2001; Priori 等, 基于儿茶酚胺能多形态性室性心动过速中的心脏兰诺定受体基因 (hRyR2) 的突变”, Circulation, 103:196-200, 2001; Swan 等, “染色体 q42-q43 作图的心律失常疾病在结构异常心脏中导致恶性儿茶酚胺能多形态性室性心动过速”, J. Am. Coll. Cardiol., 34:2035-42, 1999)。

[0015] 存在三种类型的兰诺定受体, 它们均为高度相关的 Ca^{2+} 通道。在骨骼肌中发现了 RyR1, 在心脏中发现了 RyR2, 并且 RyR3 位于脑中。2 型兰诺定受体 (RyR2) 为 EC 偶联和心脏横纹肌中肌收缩所需的主要 Ca^{2+} - 释放通道。

[0016] RyR2 通道在释放胞内 Ca^{2+} 储存的 SR 的特定区中被填充成致密阵列, 并且由此引起肌收缩 (Marx 等, 个体骨骼肌 Ca^{2+} 释放通道 (兰诺定受体) 之间的偶联门控, Science, 281:818-21, 1998)。在 EC 偶联过程中, 在 AP 零相中的心肌细胞膜去极化激活了电压控制的 Ca^{2+} 通道。由此通过这些通道的 Ca^{2+} 内向通量在称作 Ca^{2+} - 诱导的 Ca^{2+} 释放的过程中经

过 RyR2 启动 Ca^{2+} 从 SR 中释放 (Fabiato, A., “来自心脏肌质网中的钙的钙诱导的释放”, Am. J. Physiol., 245 :C1-C14, 1983 ;Nabauer 等, “在心肌细胞中由钙电流, 而非门控电荷门控的钙释放的调节”, Science, 244 :800-03, 1989)。RyR2- 介导的 Ca^{2+} - 诱导的 Ca^{2+} 释放随后激活可产生心肌收缩的可收缩蛋白。

[0017] RyR2 为包括 4 种 565, 000-道尔顿 RyR2 多肽与 4 种 12, 000-道尔顿 FK506 结合蛋白 (FKBPs)、特别是 FKBP12.6(calstabin) 的蛋白质复合物。FKBPs 为广泛表达的顺式-反式肽基-脯氨酰基异构酶并且用于各种细胞功能 (Marks, A. R., “抑制免疫细胞功能 -Physiol. Rev., 76 :631-49, 1996)。FKBP12 蛋白与下列受体紧密结合并且调节其功能: 骨骼兰诺定受体 RyR1 (Brillantes 等, “通过 FK506- 结合蛋白稳定钙释放通道 (兰诺定受体) 功能”, Cell, 77 :513-23, 1994 ;Jayaraman 等, 与钙释放通道 (兰诺定受体) 有关的 FK506 结合蛋白, J. Biol. Chem., 267 :9474-77, 1992) ;心脏兰诺定受体 RyR2 (Kaftan 等, “雷帕霉素对来自心肌的兰诺定受体 / Ca^{2+} - 释放通道的作用”, Circ. Res., 78 :990-97, 1996) ;相关胞内 Ca^{2+} - 释放通道, 称作 1 型肌醇 1, 4, 5- 三磷酸受体 (IP3R1) (Cameron 等, “FKBP 12 结合亮氨酸-脯氨酸 (1400-1401) 上的肌醇 1, 4, 5- 三磷酸受体并且使神经钙蛋白与这种 FK506- 类结构域锚定”, J. Biol. Chem., 272 :27582-88, 1997) ;和 I 型转化生长因子 β (TGF β) 受体 (T β RI) (Chen 等, FKBP12 对 TGF β 受体抑制的机制-EMBO J., 16 :3866-76, 1997)。FKBP12.6 结合 RyR2 通道 (每个 RyR2 亚单位中一个分子), 稳定 RyR2- 通道功能 (Brillantes 等, “FK506- 结合蛋白稳定钙释放通道 (兰诺定受体)”, Cell, 77 :513-23, 1994), 并且有利于相邻 RyR2 通道之间的偶联门控 (Marx 等, “个体骨骼肌 Ca^{2+} 释放通道 (兰诺定受体) 之间的偶联门控”-Science, 281 :818-21, 1998), 由此防止心动周期静息期过程中通道的异常活化。

[0018] 显然 RyR2 通道渗漏与患病心脏和结构异常心脏中的大量病理状态有关。因此, 修复 RyR2 中渗漏的方法可以治疗或预防数以百万计的患者中的心力衰竭、心律失常和心源性猝死。

[0019] 1,4- 苯并硫氮杂^𪔐类衍生物 JTV-519 或 4-[3-(4- 苄基哌啶 -1- 基) 丙酰基]-7- 甲氧基-2,3,4,5- 四氢-1,4- 苯并硫氮杂^𪔐类一盐酸盐 (也称作 k201 或 ICP-Calstan 100) 为钙离子通道的新调节剂。除调节心肌细胞中的 Ca^{2+} 水平外, JTV-519 还调节豚鼠室细胞中的 Na^{+} 电流和内向整流 K^{+} 电流并且抑制豚鼠心房细胞中的延迟整流 K^{+} 电流。研究证实 JTV-519 对儿茶酚胺诱导的心肌损伤、心肌损伤诱导的肌纤维过度收缩和局部缺血 / 再灌注损伤具有强烈的心脏保护作用。在实验性肌纤维过度收缩模型中, JTV-519 表现出比普萘洛尔、维拉帕米和地尔硫^𪔐更大的心脏保护作用。实验数据还提示 JTV-519 通过降低动物模型中胞内 Ca^{2+} 过载水平而有效预防局部缺血 / 再灌注。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明基于令人意外的发现, 即 RyR2 为用于治疗和预防心力衰竭和心律失常, 包括心房纤颤、室性心律失常和运动诱发的心律失常的靶标。正如本文描述的, 本发明人制成了具有 7 种不同 CPVT 突变的突变体 RyR2 通道并且研究了其功能。所有 7 种突变体均具有在运动过程中刺激时变渗漏 (钙渗漏) 的功能缺陷。本发明人的研究在于首先确定机制, 通过该机制 SR 钙渗漏导致了 DADs。显然, 突变体 CPVT 通道中的缺陷使得这些通道看起来像患有晚期心力衰竭的患者心脏中的渗漏通道, 所述的晚期心力衰竭是一种以高发生率的

致命性心律失常为特征的障碍。因此,本发明人已经证实在 CPVT 中 VT 的机制与心力衰竭中 VT 的机制相同。

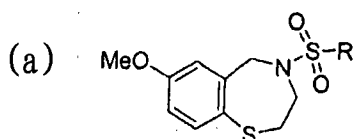
[0022] 本发明人在本文中还披露了 JTV-519(k201 或 ICP-Calstan 100) 和其它新的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物可修复 RyR2 通道中的渗漏。正如本发明人已经证实的,JTV-519 和相关衍生物促进 FKBP12.6 与 PKA- 磷酸化 RyR2 结合并且与突变体 RyR2s 结合,否则,该突变体 RyR2s 对 FKBP12.6 的亲合性就会降低或不与之结合。这种作用使引起致命性心律失常(心源性猝死(SCD))的 RyR2 渗漏固定并且促使心房/心室纤颤和心力衰竭中的心肌机能障碍。

[0023] 因此,本发明在一个方面中提供了用于限制或预防患有心房纤颤或成为心房纤颤候补者的受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降的方法,包括对该受试者给予有效限制或预防受试者 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降用量的 JTV-519,其中 RyR2 为心房 RyR2。还提供了 JTV-519 在限制或预防患有心房纤颤或成为心房纤颤候补者的受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降的方法中的应用。

[0024] 本发明在另一个方面中提供了用于治疗或预防受试者心房纤颤的方法,通过给予该受试者有效限制或预防受试者 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降用量的 JTV-519 来进行,由此治疗或预防受试者体内心房纤颤。在一个实施方案中,有效限制或预防受试者 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的 JTV-519 用量为有效治疗或预防受试者心房纤颤的 JTV-519 用量。

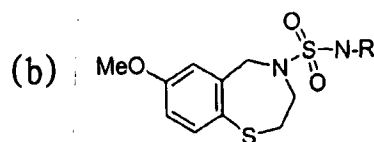
[0025] 本发明在另一个方面中提供了用于限制或预防受试者 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法,通过给予该受试者有效限制或预防受试者 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降用量的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物,其中 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物选自下列化合物组成的组:

[0026]



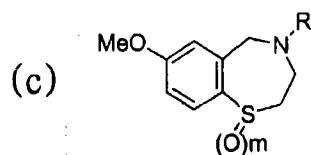
[0027] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$, 且 n = 0、1、2 或 3, 且 R' = 烷基或环烷基;

[0028]



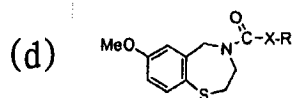
[0029] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$, 且 n = 0、1、2 或 3, 且 R' = 烷基或环烷基;

[0030]



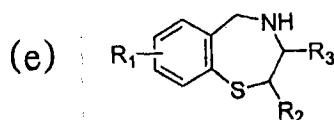
[0031] 其中 $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 、 $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 或 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 且 $X = \text{N}$ 或 S , 且 $n = 1, 2$ 或 3 , 且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基; 且其中 $m = 1$ 或 2 ;

[0032]



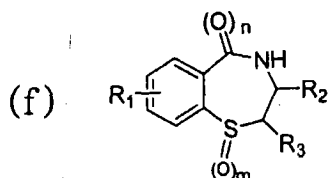
[0033] 其中 $R =$ 芳基、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, 且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 , 且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基; 且其中 $X = \text{NH}$ 或 0 ;

[0034]



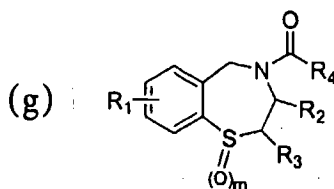
[0035] 其中 $\text{R}_1 =$ 在苯环上 2, 3, 4, 或 5 位上的 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物, 且 $\text{R}' =$ 烷基、芳基或 H ; 其中 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、烷基或芳基; 且其中 $\text{R}_3 = \text{H}$ 、烷基或芳基;

[0036]



[0037] 其中 $\text{R}_1 =$ 在苯环上 2, 3, 4, 或 5 位上的 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基, 或卤化物, 且 $\text{R}' =$ 烷基、芳基或酰基; 其中 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基; 其中 $\text{R}_3 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基; 其中 $m = 0, 1$ 或 2 ; 和其中 $n = 0$ 或 1 ;

[0038]

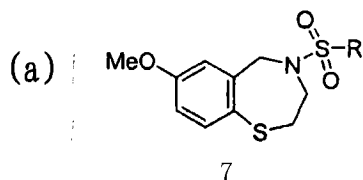


[0039] 其中 $\text{R}_1 =$ 在苯环上 2, 3, 4, 或 5 位上 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物, 且 $\text{R}' =$ 烷基、芳基或酰基; 其中 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基; 其中 $\text{R}_3 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基; 其中 $\text{R}_4 = \text{H}$ 、卤化物、链烯基、羧酸或含有 O 、 S 或 N 的烷基; 且其中 $m = 0, 1$ 或 2 ; 和

[0040] (h) 其任意的氧化形式。还提供了这些 1, 4- 苯并硫氮杂^草类衍生物在限制或预防受试者 $\text{RyR}2$ - 结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法中的应用。

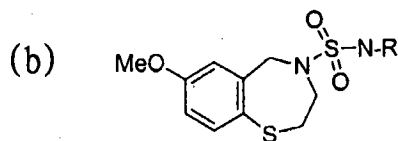
[0041] 本发明在另一个方面中提供了用于治疗或预防受试者心律失常、心力衰竭和 / 或运动诱发的心源性猝死的方法, 包括给予该受试者有效限制或预防受试者 $\text{RyR}2$ - 结合的 FKBP12.6 的水平下降用量的 1, 4- 苯并硫氮杂^草类衍生物, 其中 1, 4- 苯并硫氮杂^草类衍生物选自下列化合物组成的组:

[0042]



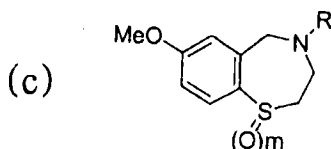
[0043] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；

[0044]



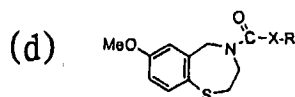
[0045] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；

[0046]



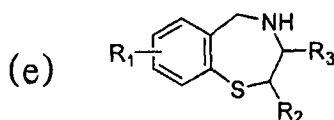
[0047] 其中 $R = CO(CH_2)_nXR'_2$ 、 $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ 或 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ ，且 $X = N$ 或 S ，且 $n = 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；且其中 $m = 1$ 或 2 ；

[0048]



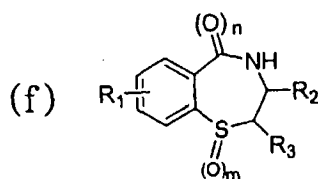
[0049] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 、 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；且其中 $X = NH$ 或 O ；

[0050]



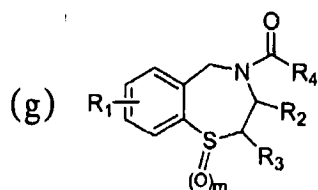
[0051] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或 H；其中 $R_2 = H$ 、烷基或芳基；且其中 $R_3 = H$ 、烷基或芳基；

[0052]



[0053] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基，或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和其中 $n = 0$ 或 1 ；

[0054]



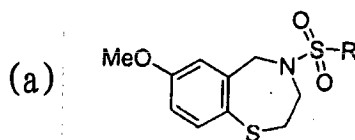
[0055] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$

烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_4 = \text{H}$ 、卤化物、链烯基、羧酸或含有 O、S 或 N 的烷基；且其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和

[0056] (h) 其任意的氧化形式。

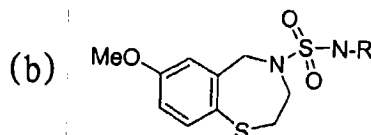
[0057] 本发明在另一个方面中提供了用于治疗或预防受试者心律失常、心力衰竭和 / 或运动诱发的心源性猝死的方法，包括给予该受试者有效治疗或预防受试者心律失常、心力衰竭和 / 或运动诱发的心源性猝死用量的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物，其中 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物选自下列化合物组成的组：

[0058]



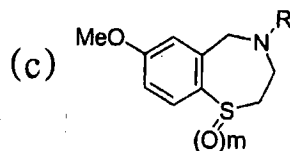
[0059] 其中 $R = \text{芳基}$ 、链烯基、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' = \text{烷基}$ 或环烷基；

[0060]



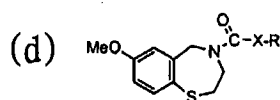
[0061] 其中 $R = \text{芳基}$ 、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' = \text{烷基}$ 或环烷基；

[0062]



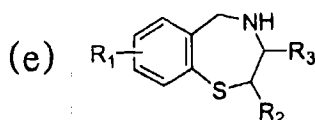
[0063] 其中 $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 、 $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 或 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ ，且 $X = \text{N}$ 或 S ，且 $n = 1, 2$ 或 3 ，且 $R' = \text{烷基}$ 或环烷基；且其中 $m = 1$ 或 2 ；

[0064]



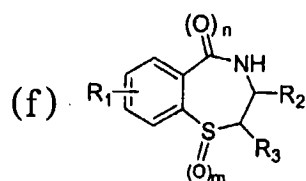
[0065] 其中 $R = \text{芳基}$ 、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' = \text{烷基}$ 或环烷基；且其中 $X = \text{NH}$ 或 O ；

[0066]



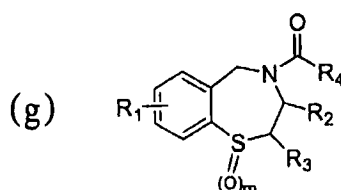
[0067] 其中 $R_1 = \text{在苯环上 } 2, 3, 4, \text{ 或 } 5 \text{ 位上的 } \text{OR}'、\text{SR}'、\text{NR}'、\text{烷基}$ 或卤化物，且 $R' = \text{烷基}$ 、芳基或 H ；其中 $R_2 = \text{H}$ 、烷基或芳基；且其中 $R_3 = \text{H}$ 、烷基或芳基；

[0068]



[0069] 其中 R_1 = 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基、或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $m = 0、1$ 或 2 ；和其中 $n = 0$ 或 1 ；

[0070]



[0071] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_4 = H$ 、卤化物、链烯基、羧酸或含有 O 、 S 或 N 的烷基；且其中 $m = 0、1$ 或 2 ；和

[0072] (h) 其任意的氧化形式。还提供了这些 1,4- 苯并硫氮杂革类衍生物在治疗或预防受试者心律失常、心力衰竭和 / 或运动诱发的心源性猝死的方法中的应用。

[0073] 本发明在另一个方面中提供了鉴定用于治疗或预防心房纤颤或心力衰竭的活性剂的方法，通过下列步骤进行：(a) 获得或产生含有 $RyR2$ 的细胞培养物；(b) 使细胞接触候选活性剂；(c) 使细胞接触一种或多种已知可增加细胞中 $RyR2$ 磷酸化的条件；和 (d) 确定该活性剂是否可以限制或预防细胞中 $RyR2$ - 结合的 FKBP12.6 的水平下降。在一个实施方案中，该方法进一步包括下列步骤：(e) 确定该活性剂是否对细胞中 $RyR2$ - 相关生物事件 (event) 具有作用。还提供了通过该方法鉴定的活性剂和该活性剂在治疗或预防心房纤颤和心力衰竭的方法中的应用。

[0074] 本发明在另一个方面中提供了鉴定用于治疗或预防心房纤颤或心力衰竭的活性剂的方法，包括下列步骤：(a) 获得或产生含有 $RyR2$ 的动物；(b) 对动物给予候选活性剂；(c) 使动物接触一种或多种已知可增加细胞中 $RyR2$ 磷酸化的条件；和 (d) 确定该活性剂是否可以限制或预防动物体内 $RyR2$ - 结合的 FKBP12.6 水平下降。在一个实施方案中，该方法进一步包括下列步骤：(e) 确定该活性剂是否对动物体内 $RyR2$ - 相关生物事件具有作用。还提供了通过该方法鉴定的活性剂和该活性剂在治疗或预防心房纤颤和心力衰竭的方法中的应用。

[0075] 本发明的其它方面根据如下描述显而易见。

[0076] 附图简述

[0077] 附图 1 表示 JTV-519 预防 FKBP12.6^{+/-} 小鼠中运动诱发的室性心律失常。(A) 未治疗的 FKBP12.6^{+/-} 小鼠、用 JTV-519 治疗的 FKBP12.6^{+/-} 小鼠和用 JTV-519 治疗的 FKBP12.6^{-/-} 小鼠的有代表性的动态心电图。在心率或任意测定的 ECG 参数方面没有显著性差异。(B) 上部描记图 (tracing)：在进行运动测试并且注射 1.0mg/kg 肾上腺素的未治疗 FKBP12.6^{+/-} 小鼠中记录的持续性多形态性室性心动过速。中部描记图：在相同方案后 JTV-519- 治疗的 FKBP12.6^{+/-} 小鼠的电图；未检测到心律失常。下部描记图：用 JTV-519 治

疗的FKBP12.6^{-/-}小鼠中的运动诱发的室性心律失常(VT)。虚线代表附图中未显示的16.31秒的VT。'P'表示P-波,它指示室性心动过速后的窦性节律。(C)棒形图表示分别用JTV-519治疗或不用其治疗的FKBP12.6^{+/+}和FKBP12.6^{-/-}小鼠中心源性猝死(左)、持续性室性心动过速(>10次搏动,中)和非持续性室性心动过速(3-10次异常搏动,右)的量化。应注意与未治疗的FKBP12.6^{+/+}小鼠(n=10)或JTV-519治疗的FKBP12.6^{-/-}小鼠(n=5)相比,使用JTV-519治疗完全防止了用JTV-519治疗的FKBP12.6^{+/+}小鼠(n=9)中运动-和肾上腺素-诱发的心律失常,从而提示JTV-519通过使FKBP12.6与RyR2重新结合预防FKBP12.6^{+/+}小鼠中的心律失常和猝死。

[0078] 附图2表示JTV-519通过增加FKBP12.6^{+/+}小鼠中FKBP12.6对RyR2的亲合性预防运动诱发的心源性猝死(SCD)。(A-B)使用RyR2-5029抗体免疫沉淀心脏兰诺定受体(RyR2)。显示了免疫印迹(A)和棒形图(B),它们分别代表在没有或有JTV-519存在下,在静止条件中和运动后野生型(FKBP12.6^{+/+})小鼠、FKBP12.6^{+/+}小鼠和FKBP12.6^{-/-}小鼠中定量的RyR2、PKA-磷酸化RyR2(RyR2-pSer²⁸⁰⁹抗体)和FKBP12.6。在静止条件下,~70%的FKBP12.6与FKBP12.6^{+/+}小鼠中的RyR2结合。在运动测试后,与RyR2复合物结合的FKBP12.6的量在FKBP12.6^{+/+}小鼠中显著增加,而这一情况可以通过使用JTV-519治疗恢复。(C)RyR2单通道分离自运动测试和肾上腺素注射后获得的肝脏。显示了来自使用和不使用JTV-519预治疗的FKBP12.6^{+/+}小鼠的通道和来自JTV-519预治疗后FKBP12.6^{-/-}小鼠的通道。应注意RyR2-通道功能在使用JTV-519治疗的运动FKBP12.6^{+/+}小鼠中得到标准化。来自使用JTV-519治疗后运动的FKBP12.6^{-/-}小鼠的有代表性的单通道表现出心脏中的FKBP12.6是JTV-519作用所需的。虚线代表不完全通道开放或'再分电导'开放并且指示FKBP12.6-缺失的RyR2通道。左侧的描记图表示5.0秒,而右侧的描记图表示500毫秒。在该附图中,Po=开放机率;To=平均开放时间;Tc=平均关闭时间;和c=通道的关闭状态。(D)汇总棒形图表示单一RyR2通道的开放机率(参见上文)。JTV-519显著减少了来自在舒张期钙浓度下(150nM)运动测试后的FKBP12.6^{+/+}小鼠的开放机率。

[0079] 附图3解释了JTV-519通过增加FKBP12.6与PKA-磷酸化RyR2通道的结合亲和性校准了RyR2-通道门控。(A,B)如上所述制备犬心脏SR膜(A)和重组表达的RyR2通道(B)(Kaftan等,雷帕霉素对来自心肌的兰诺定受体/Ca⁽²⁺⁾-释放通道的作用,Circ. Res., 78: 990-97, 1996)。(A)在有或没有PKA抑制剂PKI₅₋₂₄存在下的磷酸化缓冲液(8mM MgCl₂, 10mM EGTA和50mM Tris/PIPES; pH 6.8)中使用PKA催化亚单位(40U; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)使兰诺定受体(RyR2)磷酸化。将样品以100,000xg离心10分钟并且用咪唑缓冲液(10mM咪唑; pH 7)洗涤3次。在没有或有不同浓度的JTV-519存在下将重组表达的FKBP12.6(终浓度=250nM)加入到样品中。在60-分钟保温后,将样品以100,000xg离心10分钟并且用咪唑缓冲液洗涤2次。将样品加热至95℃并且使用SDS-PAGE进行大小分级分离。如上所述(Jayaraman等,“与钙释放通道(兰诺定受体)结合的FK506结合蛋白”, J. Biol. Chem., 267: 9474-77, 1992)使用抗-FKBP12.6抗体(1:1,000)和抗-RyR2-5029抗体(1:3,000)进行SR微粒体的免疫印迹。该附图表示JTV-519能够使FKBP12.6结合至:(A)PKA-磷酸化RyR2(在100nM下部分结合;在1000nM下完全结合)或(B)RyR2-S2809D突变体通道,其为组成性PKA-磷酸化RyR2通道。(C-E)单一-通道研究显示与有特异性PKA抑制剂PKI₅₋₂₄存在下的PKA磷酸化(C)相比,PKA磷酸化(D)后RyR2的开放机率增

加。在有 JTV-519 存在下与 FKBP12.6 一起保温的 PKA-磷酸化 RyR2 中校准单一-通道功能 (E)。通道开放向上,阴影线 (dash) 表示完全开放的水平 (4pA),字母 'c' 表示闭合状态。在压缩 (5 秒,上部描记图) 时间尺度和扩展 (500 毫秒,下部描记图) 时间尺度下显示了通道并且记录在 0mV 下。幅度直方图 (右) 揭示出 PKA-磷酸化 RyR2 中活性增加和再分电导开放,而在使用 JTV-519 和 FKBP12.6 治疗后不会。(F) 开放机率作为胞质 $[Ca^{2+}]$ 函数的标准化图。在有 JTV-519 存在下 PKA-磷酸化 RyR2 与 FKBP12.6 一起保温使得 RyR2 活化的 Ca^{2+} -依赖性向右移动,使得与未磷酸化通道的 Ca^{2+} -依赖性相似。

[0080] 附图 4 表示 JTV-519 改善了心力衰竭大鼠模型中的心肌收缩性。(A) 在使用 JTV-519 或载体 (对照组) 治疗前和 4 周治疗后使用超声波心动描记术测定中-乳突水平的心肌舒张期的横断面积。舒张期功能障碍的相对增加被 JTV-519 抑制。(B) 尽管在未治疗动物中收缩功能恶化,但是 JTV-519 显著增加了心肌梗死后 (后-MI) 心力衰竭大鼠中的收缩功能。

[0081] 附图 5 表示 JTV-519 增加心力衰竭大鼠中 calstabin2(FKBP12.6) 对 RyR2 的亲合性。使用抗-RyR2 抗体免疫沉淀等量的 RyR2 (A)。有代表性的免疫印迹 (A) 和棒形图 (B) 表示不同实验组中 RyR2 在 Ser2809 上 PKA 磷酸化的量 (B, 左) 和与 RyR2t 结合的 calstabin2(FKBP12.6) 的量 (B, 右)。在心力衰竭中,PKA 使 RyR2 显著超磷酸化 (B, 左),导致 calstabin2(FKBP12.6) 从通道复合物中解离 (B, 右)。使用 JTV-519 治疗导致 RyR2 的 PKA-磷酸化状态以及 FKBP12.6 与 RyR2 结合标准化。用棒形图表示实验的次数。* $P < 0.05$, HF vs. 模拟手术操作组; # $P < 0.05$, HF+JTV-519 vs. HF。

[0082] 附图 6 解释了 JTV-519 校准缺陷心脏中的 RyR2-通道门控。RyR2 通道分离自模拟手术操作的 (模拟手术操作组) 或心力衰竭 (HF) 大鼠。有代表性的单通道描记图显示 RyR2-通道开放机率 (P_o) 与模拟手术操作大鼠 (上部) 相比在缺陷心脏 (中部) 中显著增加。使用 JTV-519 治疗心力衰竭大鼠将通道开放机率校准至与模拟手术操作动物相似的水平。对每种条件而言,上部扫描代表 5000ms,而下部扫描代表 200ms。通道开放向上,阴影线表示完全开放水平的通道开放 (4pA),且 'c' 表示通道关闭的状态。幅度直方图 (右) 揭示出来自缺陷心脏的 P_o 和 RyR2 通道再分电导开放增加。

[0083] 附图 7 表示 JTV-519 通过增加 FKBP12.6(calstabin2) 与 RyR2 通道结合校准了 RyR2 通道门控。(A) 野生型 RyR2 (RyR2-WT) 通道在没有或有特异性 PKA 抑制剂 PKI_{5-24} 存在下 PKA 磷酸化,然后在有指定浓度下的 JTV-519 存在下与 calstabin2(FKBP12.6) 一起保温。RyR2 免疫印迹表示样品中等量的 RyR2;calstabin2 免疫印迹表示 JTV-519 能够使 calstabin2 与 PKA-磷酸化 RyR2 部分 (100nM) 或完全 (1000nM) 再结合。(B) 将模拟组成型-PKA-磷酸化 RyR2 的 RyR2-S2809D 与 calstabin2 在有指定浓度 JTV-519 存在下一起保温。RyR2 免疫印迹表示样品中等量的 RyR2;calstabin2 免疫印迹表示 JTV-519 能够使 calstabin2 与 RyR2-S2809D 部分 (100nM) 或完全 (1000nM) 再结合。(C) $[^{35}S]$ -标记的 calstabin2 结合曲线表示 JTV-519 将 calstabin2 与 PKA-磷酸化 RyR2 和 RyR2-S2809D 突变体通道的结合亲和性增加至与非-磷酸化 RyR2-WT 相差无几的水平。(D-F) 单通道研究证实 JTV-519 (1 μ M) 通过再结合 150nM $[Ca^{2+}]$ 下的 calstabin2 降低 PKA-磷酸化 RyR2-WT 的开放机率 (P_o) (D: $n = 11$; E: $n = 12$; F: $n = 13$)。通道开放向上,阴影线表示完全开放水平的通道开放 (4pA),且 'c' 表示通道关闭的状态。幅度直方图 (右) 揭示出 PKA-磷酸化

RyR2 中的 P_o 和再分电导开放增加 ; 在使用 JTV-519 ($1 \mu M$) 和 calstabin2 (FKBP12.6) 治疗后未观察到这一结果。

[0084] 附图 8 解释了心房组织中的 RyR2 大分子复合物。(A) 从心房肌质网 (SR) 中免疫沉淀 RyR2 并且使用 PKA 或环化腺苷酸 (cAMP) 磷酸化。添加 PKA 抑制剂 (PKI) 完全阻断了磷酸化反应。(B) 使 RyR2 大分子复合物中的组分与 RyR2 从心房 SR 免疫共沉淀。阳性对照为心房 SR (使用 50% 的免疫沉淀 (IP) 输入)。阴性对照代表使用抗体免疫沉淀的样品阻断了抗原肽。(C) 使 Calstabin2 (FKBP12.6) 与 RyR2 从心房 SR 免疫共沉淀。在通过 SDS PAGE 进行大小分级分离前, 在有和没有 PKI 存在下用 PKA 使样品磷酸化。PKA 磷酸化导致 calstabin2 (FKBP12.6) 以受 PKI 抑制的方式从通道复合物中解离。+Cont. (CSR) = 心房 SR ; +Cont. (FKBP) = 重组 FKBP ; -Cont. = 使用用抗原肽预吸收的抗体进行的 IP。

[0085] 附图 9 表示心房纤颤 (AF) 中 RyR2 的 PKA- 超磷酸化。(A) 用 PKA 使从对照组动物 (对照组 ; $n = 6$) 和患有心房纤颤的狗 (A Fib ; $n = 6$) 中免疫沉淀 (IP) 的 RyR2 磷酸化。为了进行反向磷酸化实验, 对 RyR2 平行进行免疫印迹, 以便测定在每种样品中免疫沉淀的 RyR2 蛋白的量。在左侧上的棒形图代表对反向磷酸化研究的定量。数值代表为免疫沉淀蛋白的量调整的 RyR2 的 PKA 磷酸化的相对程度。患有 AF 的狗与对照组相比显示出 PKA 磷酸化有 130% 的增加 (AF : $n = 6$; 对照组 : $n = 6$; $P = 0.001$)。使 Calstabin2 (FKBP12.6) 与 RyR2 免疫共沉淀。为了进行免疫沉淀实验, 对 RyR2 平行进行免疫印迹, 以便测定从每种样品中免疫沉淀的 RyR2 的量。在右侧的棒形图代表对免疫共沉淀实验的定量。数值代表为免疫沉淀蛋白的量调整的 calstabin2 (FKBP12.6) 与 RyR2 免疫共沉淀的量。Calstabin2 (FKBP12.6) 与 RyR2 结合与对照组相比在 AF 狗中显示出 72% 的减少 (对照组 : $n = 6$; AF : $n = 7$; $P < 0.0005$)。(B) 使用来自患有处于心力衰竭状态中的心房纤颤的患者的人心房组织 (A Fib ; $n = 5$) 和来自具有正常心脏的患者的心房组织 (对照组 ; $n = 3$) 进行相同系列的实验。在左侧上的棒形图代表对反向磷酸化研究的定量。患有 AF 的人与对照组相比显示出 PKA 磷酸化有 112% 的增加 (A Fib : $n = 5$; 对照组 : $n = 3$; $P = 0.002$)。在右侧的棒形图代表 calstabin2 (FKBP12.6) 免疫共沉淀实验结果。患有 AF 的人在 calstabin2 (FKBP12.6) 结合 RyR2 的量方面显示出 70% 的减少 (AFib : $n = 5$; 对照组 : $n = 3$; $P < 0.0001$)。

[0086] 附图 10 解释了 AF 中改变的 RyR2- 通道功能。(A) 上部描记图 (trace) 显示了来自对照组左心房的有代表性的 RyR2 通道 ; 下部描记图为 AF 通道。描记图的右侧为相应的电流幅度直方图。(B) 棒形图显示了对对照组狗 (Cont.) 和患有慢性心房纤颤的狗 (A Fib) 的开放几率 (P_o) 和开放频率 (F_o) 的定量。研究了来自 5 只 A Fib 狗的 17 个通道和来自 5 只对照组狗的 11 个通道。来自对照组狗的通道未显示出活性增加。相反, 来自 A Fib 狗的 17 个通道中的 15 个 (88%) 开放几率 (AF : 0.39 ± 0.07 ; 对照组 : 0.009 ± 0.002 ; $P < 0.001$) 和门控频率 (AF : $21.9 \pm 4.6 s^{-1}$; 对照组 : $1.6 \pm 0.6 s^{-1}$; $P < 0.002$) 显著增加。

[0087] 附图 11 表示了使用 JTV-519 治疗恢复了 AF 中的正常 RyR2 功能。(A) 在 $150 nM$ 的胞质 Ca^{2+} 浓度下 (作为在舒张期过程中出现的) 和有 $0.25 mM$ calstabin2 (FKBP12.6) 存在下, 来自狗心脏的单 RyR2 通道的有代表性的描记图显示, PKA 磷酸化后开放几率 (P_o) 和门控频率显著增加 (对照组 : $P_o = 0.3 \pm 0.2\%$, $n = 6$; PKA : $P_o = 14.8 \pm 3.2\%$, $n = 7$; $P < 0.001$)。正如在下部描记图中以较高时间分辨率和所有点直方图观察到的, RyR2 的 PKA 磷酸化导致可以在 calstabin2 (FKBP12.6) 从 RyR2 中解离时观察到的部分开放 (再分电导

状态)。与 PKA- 处理的 RyR2 相比, JTV-519 (1.0mM) 恢复了 PKA- 磷酸化 RyR2 的通道活性 ($P_o = 0.8 \pm 0.3\%$; $n = 6$; $P < 0.001$) ; JTV-519 还在直方图中产生了不连续的电流振幅分布,正如可以在未磷酸化对照组通道中观察到的。上部和下部描记图分别代表 5000 毫秒和 200 毫秒;关闭状态由 'c' 表示;完全通道开放如向上偏转至 4pA 水平所示,正如棒形图指示的;下部描记图中的虚线表示部分开放的 1pA 步骤。(B) 在有或没有 1,4- 苯并硫氮杂^草类衍生物 JTV-519 存在下,将重组 calstabin2 (FKBP12.6) 与 PKA- 磷酸化 RyR2 一起保温。使用抗-calstabin2 抗体进行免疫印迹揭示出 JTV-519 使得重组 calstabin2 (FKBP12.6) 与 PKA- 磷酸化 RyR2 结合。在没有 JTV-519 存在下, calstabin2 结合不会发生。

[0088] 附图 12 表示新 1,4- 苯并硫氮杂^草类衍生物在 0.5nM 下诱导 calstabin2 (FKBP12.6) 与 PKA- 磷酸化心脏兰诺定受体 (RyR2) 结合。上组 = 2.0nM 各化合物;下组 = 0.5nM 各化合物。

[0089] 附图 13 表示 1,4- 苯并硫氮杂^草类衍生物 S36 (附图 15 中所示) 在 200nM 下预防小鼠的心律失常。棒形图解释了如所示的在使用或不使用药物治疗的 FKBP12.6+/- 小鼠中进行运动测试过程中的心律失常情况或心源性猝死。左侧图解释了心源性猝死;中部的图解释了持续性 VT;且右侧图解释了非持续性 VT。数字指的是用于各组中的动物总数量。

[0090] 附图 14 表示 JTV-519 改善了心力衰竭大鼠模型中的心脏收缩性。

[0091] 附图 15 表示衍生物的结构。

[0092] 发明详述

[0093] 蛋白激酶 (PKA) 使心脏 RyR2 磷酸化是“抗击或逃离 (flight)”反应的重要组成部分;它通过扩大对指定触发器释放的 Ca^{2+} 的量增加心脏 EC- 偶联增益 (Marks, A. R., “心脏胞内钙释放通道:心力衰竭中的作用”, Circ. Res., 87:8-11, 2000)。这种信号传导途径提供了一种机制,通过该机制,作为对应激的反应的交感神经系统活化导致满足应激反应的代谢要求所需的心输出量增加。在结合儿茶酚胺类时, $\beta 1$ - 和 $\beta 2$ - 肾上腺素能受体通过刺激 G- 蛋白 G_{α_s} 活化腺苷酸环化酶。腺苷酸环化酶增加胞内环腺苷酸 (cAMP) 水平,从而活化 cAMP- 依赖性 PKA。RyR2 的 PKA 磷酸化通过从通道复合物中解离 calstabin2 (FKBP12.6) 增加通道开放几率。由此增加 RyR2 对 Ca^{2+} - 依赖性活化的敏感性 (Hain 等, “磷酸化调节来自心肌的肌质网的钙释放通道功能”, J. Biol. Chem., 270:2074-81, 1995; Valdivia 等, 心脏兰诺定受体的快速适应:通过 Mg^{2+} 和磷酸化调节, Science, 267:1997-2000, 1995; Marx 等, “PKA 磷酸化从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 KBP12.6:缺陷心脏中的缺陷调节”, Cell, 101:365-76, 2000)。

[0094] 缺陷心脏 (例如在患有心力衰竭的患者和心力衰竭的动物模型中) 的特征在于包括慢性过度肾上腺素能刺激的适应性反应机能障碍 (Bristow 等, “缺陷人心脏中的儿茶酚胺敏感性和 β - 肾上腺素能- 受体密度下降”, N. Engl. J. Med., 307:205-11, 1982)。通过降低 β - 肾上腺素能刺激和左心室心肌壁压力并且有效逆转心室重塑的治疗策略支持了心力衰竭中的这种刺激的致病含义 (Barbone 等, “患有重度心力衰竭的患者中对右和左心室对左心室辅助装置支持的反应比较:基于反重塑的机械卸下的主要作用”, Circulation, 104:670-75, 2001; Eichhorn 和 Bristow, “医学疗法可以改善慢性缺陷心脏的生物特性。心力衰竭治疗中的新时代”-Circulation, 94:2285-96, 1996)。在心力衰竭中,慢性 β - 肾上腺素能刺激与心脏中 β - 肾上腺素能受体活化有关,这种受体通过与 G- 蛋白偶联活化腺苷

酸环化酶且由此增加胞内 cAMP 浓度。CAMP 活化了 cAMP- 依赖性 PKA, 已经证实它可以诱导 RyR2 超磷酸化。因此, 慢性心力衰竭是长期肾上腺素能过度状态 (Chidsey 等, “对患有充血性心力衰竭的患者运动的血浆去甲肾上腺素反应的加强”, N. Engl. J. Med., 267 :650, 1962), 这种状态可产生几种病理后果, 包括 RyR2 的 PKA 超磷酸化 (Marx 等, “PKA 磷酸化从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 FKBP12.6 :缺陷心脏中的缺陷调节”, Cell, 101 :365-76, 2000)。

[0095] 已经将 RyR2 的 PKA 超磷酸化提示为促使心力衰竭中收缩功能受阻和心律失常发生的因素 (Marks 等, “心力衰竭的进展 :蛋白激酶是兰诺定受体超磷酸化的贡献因素吗?”, Circulation, 105 :272-75, 2002 ;Marx 等, “PKA 磷酸化从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 FKBP12.6 :缺陷心脏中的缺陷调节”, Cell, 101 :365-76, 2000)。与这种推定一致, 已经在进行心脏移植患有心力衰竭的动物模型和患者中在体内证实了缺陷心脏中的 RyR2 的 PKA 超磷酸化 (Antos 等, “因蛋白激酶 A 的组成型活化导致的扩张性心肌病和猝死”, Circ. Res., 89 :997-1004, 2001 ;Marx 等, “PKA 磷酸化从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 FKBP12.6 :缺陷心脏中的缺陷调节”, Cell, 101 :365-76, 2000 ;Ono 等, “FKBP12.6 与兰诺定受体改变的相互作用作为心力衰竭中异常 Ca^{2+} 释放的原因”, Cardiovasc. Res., 48 :323-31, 2000 ;Reiken 等, “ β -肾上腺素能受体阻滞剂恢复心力衰竭中的心脏钙释放通道 (兰诺定受体) 结构和功能”, Circulation, 104 :2843-48, 2001 ;Semsarian 等, “L-型钙通道抑制剂地尔硫草预防小鼠模型中的心肌病”, J. Clin. Invest., 109 :1013-20, 2002 ;Yano 等, “心力衰竭中 FKBP12.6 与兰诺定受体改变的化学计算作为通过兰诺定受体异常 Ca^{2+} 渗漏的原因”, Circulation, 102 :2131-36, 2000)。

[0096] 在缺陷心脏中, PKA 使 RyR2 超磷酸化诱导可调节的 FKBP12.6 亚单位从 RyR2 通道中解离 (Marx 等, “PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 :缺陷心脏中的缺陷调节”, Cell, 101 :365-76, 2000)。这一结果导致 RyR2 通道的生物物理学特性显著改变。这类改变从如下情况中证实 :因对 Ca^{2+} - 依赖性活化的敏感性增加所致开放几率 (P_o) 增加 (Brillantes 等, “FK506- 结合蛋白稳定钙释放通道 (兰诺定受体) 功能”, Cell, 77 :513-23, 1994 ;Kaftan 等, “雷帕霉素对来自心肌的兰诺定受体 / Ca^{2+} - 释放通道的作用”, Circ. Res., 78 :990-97, 1996) ;通道失去稳定性, 导致再分电导状态 ;和通道偶联门控受损, 导致缺陷性 EC 偶联和心脏机能障碍 (Marx 等, “个体骨骼肌 Ca^{2+} 释放通道 (兰诺定受体) 之间的偶联门控”, Science, 281 :818-21, 1998)。因此, PKA- 超磷酸化的 RyR2 对低水平的 Ca^{2+} 刺激极为敏感, 并且这使其自身表现为 SR Ca^{2+} 通过超磷酸化通道渗漏。

[0097] 对心力衰竭中应激的适应性反应机能障碍导致 FKBP12.6 从通道大分子复合物中排空。这导致 RyR2 对 Ca^{2+} - 诱导的 Ca^{2+} 释放的敏感性左移, 从而产生在低-中度 $[\text{Ca}^{2+}]$ 下更具活性的通道 (Marx 等, “PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 :缺陷心脏中的缺陷调节”, Cell, 101 :365-76, 2000 ;Yamamoto 等, “从心动过速-诱发的心力衰竭中心脏肌质网中的异常 Ca^{2+} 释放”, Cardiovasc. Res., 44 :146-55, 1999 ;Yano 等, “心力衰竭中 FKBP12.6 与兰诺定受体改变的化学计算作为通过兰诺定受体异常 Ca^{2+} 渗漏的原因”, Circulation, 102 :2131-36, 2000)。随着时间的推移, 通过 RyR2 的“渗漏”增加导致 SR Ca^{2+} 含量恢复至较低水平, 由此减少 EC 偶联增益并且促使收缩期收缩性受损 (Marx 等, “PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 :缺陷心脏中的缺陷调节”, Cell,

101 :365-76,2000)。

[0098] 特别为“渗漏的” RyR2 通道亚群在心动周期的舒张期过程中释放 SR Ca^{2+} 。这导致称作延迟后除极 (DADs) 的心肌细胞膜去极化, 已知它们可引起致命性心律失常 (Wehrens 等, “与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道 (兰诺定受体) 功能”, *Cell*, 113 :829-40, 2003)。

[0099] 在结构正常的心脏中, 类似的现象可以处于工作中。特别地, 已知运动和应激诱导活化心脏中 β -肾上腺素能受体的儿茶酚胺类释放。活化 β -肾上腺素能受体导致 RyR2 通道的超磷酸化。证据还提示因 β -肾上腺素能-受体活化所致的 RyR2 的超磷酸化提供了突变的 RyR2 通道, 以使心动周期的舒张期的开放更为可能, 从而增加心律失常的可能性。

[0100] 本发明人在本文中已经证实 JTV-519 预防后 -MI 心力衰竭大鼠模型中的心力衰竭。在这种动物模型中, JTV-519 在减少舒张期功能障碍和改善的收缩功能方面改善了心脏功能。此外, 本发明人已经证实 RyR 通道的骨骼肌形式 RyR1 在心力衰竭骨骼肌中也是缺陷性的 (或渗漏), 这是因 PKA-超磷酸化所致 (Reiken 等, “PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离: 缺陷心脏中的缺陷调节”, *J. Cell Biol.*, 160 :919-28, 2003)。因此, 预计 JTV-519 也可以改善患有心力衰竭的患者的骨骼肌功能。照此, JTV-519 提供了治疗心力衰竭中的两种主要症状 - 早期疲劳和短促呼吸的新治疗手段, 所述的两种主要症状分别因骨端 (extremities) 和隔膜中的骨骼肌衰弱所致。

[0101] 如上所述, 儿茶酚胺能多形态性室性心动过速 (CPVT) 为具有结构正常心脏的个体中的遗传性疾病。其特征在于紧张诱发的室性心动过速, 即一种可以导致心源性猝死的致命性心律失常 (SCD)。位于肌质网 (SR) 上的 RyR2 通道突变与 CPVT 相关。

[0102] 所有患有 CPVT 的个体均具有运动诱发的心律失常。本发明人在先证实运动诱发的心律失常和猝死 (在患有 CPVT 的患者中) 因 FKBP12.6 对 RyR2 的亲合性下降所致。本发明人在本文中已经证实运动活化 RyR2 作为被腺苷-3', 5' - 一磷酸 - 依赖性蛋白激酶 (PKA) 磷酸化的结果。

[0103] 为了确定基于 CPVT 中的致命性心律失常的分子机制, 本发明人研究了 CPVT- 关联突变体 RyR2 通道 (例如 S2246L、R2474S、N4104K、R4497C)。与野生型通道相比, 在基础条件下在平面脂双层中具有正常功能的突变体 RyR2 通道对 PKA 磷酸化 - 表现出活性增加 (开放机率) 和开放状态延长导致的活化更为敏感。此外, PKA-磷酸化突变体 RyR2 通道耐 RyR2 通道的生理抑制剂 Mg^{2+} 的抑制作用并且表现出与 FKBP12.6 结合减少 (使关闭状态中的通道稳定)。这些发现表明在运动过程中, 当 RyR2 通道 PKA-磷酸化时, 突变体 CPVT 通道更为可能的是在心动周期的舒张期 (舒张期) 开放, 从而增加 SR Ca^{2+} 渗漏引发的心律失常发生的可能性。由于心力衰竭是全世界中死亡的主要原因, 所以修复 RyR2 中的渗漏的方法可以预防数以百万计的患者中的致命性心律失常。

[0104] 本发明人在本文中进一步证实实验药物 JTV-519, 即 1,4- 苯并硫氮杂䓬类衍生物可预防对 FKBP12.6 基因而言杂合的小鼠中的致命性室性心律失常。目前已经证实 JTV-519 减少了心力衰竭动物模型中舒张期 SR Ca^{2+} 渗漏 (Yano 等, “FKBP12.6- 介导的钙释放通道 (兰诺定受体) 稳定作为对心力衰竭的新治疗策略”, *Circulation*, 107 :477-84, 2003 ; Kohno 等, “新的心脏保护剂 JTV519 改善心力衰竭中兰诺定受体的缺陷通道门控”, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 14 :14, 2002)。在目前的研究中, 本发明人检验了

JTV-519在心律失常模型中的功效和作用机制。就其体内实验而言,本发明人需要克用量级的 JTV-519(4-[3-(4-苄基哌啶-1-基)丙酰基]-7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂~~草~~类一盐酸盐)。

[0105] 为了测试心律失常,使FKBP12.6^{+/-}和FKBP12.6^{-/-}小鼠进行上述运动方案(Wehrens等,“与运动诱发的心源性猝死相关的FKBP12.6缺陷和缺陷性钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,113:829-40,2003;Mohler等,“锚蛋白-B突变导致4型长-QT心律失常和心源性猝死”,Nature,421:634-39,2003)。尽管FKBP12.6^{+/-}小鼠中有88%(8只中的7只)在该方案过程中表现出室性快速型心律失常(VT)或晕厥情况,但是用JTV-519预治疗的FKBP12.6^{+/-}小鼠中没有1只(6只中有0只)发生心律失常或晕厥情况(附图1)。此外,90%的FKBP12.6^{+/-}小鼠(10只中有9只)在运动过程中或之后死亡,而JTV-519治疗的FKBP12.6^{+/-}小鼠中没有1只(9只中有0只)死亡(附图1C)。与预治疗的FKBP12.6^{+/-}小鼠相反,尽管使用JTV-519治疗(附图C),但是用JTV-519治疗的100%的FKBP12.6^{-/-}小鼠(5只中有5只)在应激方案过程中发生VT并且死亡。这些数据共同提示FKBP12.6是JTV-519抗-心律失常作用所需的。

[0106] 为了进一步表征JTV-519的抗-心律失常特性,本发明人对FKBP12.6^{+/+}、FKBP12.6^{+/-}和FKBP12.6^{-/-}小鼠进行程控电刺激方案。在注射0.5mg/kg异丙肾上腺素后,通过在71%的FKBP12.6^{+/-}小鼠(7只中的5只),而不在野生型FKBP12.6^{+/+}小鼠中进行快速超速起搏诱发VTs($P < 0.05$, $n = 5$)。用JTV-519(0.5mg/kg/h)预治疗的FKBP12.6^{+/-}小鼠对超速起搏诱发的VTs的敏感性明显低于未治疗的FKBP12.6^{+/-}小鼠(7只中有1只vs.7只中有5只; $P < 0.05$)。相反,用JTV-519预治疗的67%FKBP12.6^{-/-}小鼠(6只中有4只)在超速起搏过程中发生VTs。

[0107] 可以在71%的FKBP12.6^{+/-}小鼠(7只中有5只)中使用过早搏动诱发VTs。在使用JTV-519预治疗的7只FKBP12.6^{+/-}小鼠中未观察到VTs。使用双过早搏动方案(S1-S2-S3),在100%未治疗的FKBP12.6^{+/-}小鼠(7只中有7只)中可再现地诱发VTs。使用JTV-519治疗完全消除了FKBP12.6^{+/-}小鼠中可诱导的VTs(7只中有7只)。JTV-519治疗不会预防FKBP12.6^{-/-}小鼠中的VTs,从而支持了FKBP12.6是JTV-519的抗-心律失常作用所需的概念。

[0108] 本发明人在先证实了RyR2在Ser2809上的PKA磷酸化导致FKBP12.6从RyR2通道中解离(Marx等,“PKA磷酸化使FKBP12.6从钙释放通道(兰诺定受体)中解离:缺陷心脏中的缺陷调节”,Cell,101:365-76,2000)。在目前的研究中,使用JTV-519预治疗(0.5mg/kg/h)不会影响FKBP12.6^{+/-}和FKBP12.6^{-/-}小鼠中RyR2 PKA磷酸化的程度(附图2)。与FKBP12.6^{+/+}小鼠相比,来自FKBP12.6^{+/-}小鼠的RyR2复合物在运动后明显地更加缺失了FKBP12.6($*P < 0.05$)。然而,使用JTV-519预治疗在FKBP12.6^{+/-}小鼠中防止了运动过程中FKBP12.6从RyR2大分子复合物中损耗(附图2; $*P < 0.05$)。

[0109] 与来自运动的FKBP12.6^{+/+}小鼠的通道相比,来自进行运动的FKBP12.6^{+/-}小鼠的RyR2通道的开放机率(P_o)显著增加($+/-: 0.47 \pm 0.12$, $n = 11$; $+/: 0.04 \pm 0.01$, $n = 13$; $P < 0.05$)。与未治疗的运动小鼠相比,使用JTV-519(0.5mg/kg/h)治疗运动的FKBP12.6^{+/-}小鼠显著减少了通道 P_o (0.02 ± 0.01 , $n = 13$) (附图2)。这种观察结果与FKBP12.6在RyR2复合物中的量增加一致(附图2)。相反,JTV-519治疗运动的FKBP12.6^{-/-}小鼠不会产生具有

低 P_o 的通道。

[0110] 使用 150nM 的低顺式（胞质） $[Ca^{2+}]$ ，将 Ca^{2+} 作为载流子检验 RyR2 单通道。当 RyR2 通道应具有低开放几率以便预防可能引发心律失常的舒张期 SR Ca^{2+} 渗漏时，这些条件刺激了舒张期过程中的那些情况。因此，正如在 JTV-519 治疗的运动 FKBP12.6^{+/-} 小鼠中观察到的，RyR2 P_o 显著下降提示 RyR2 通道在舒张期 d 观察中不“渗漏”，这与没有观察到的心律失常存在一致。

[0111] 为了进一步检验 JTV-519 预防 VTs 的机制，本发明人使用野生型 RyR2 (RyR2-WT) 通道的 PKA 磷酸化模拟了运动条件。然后将 PKA-磷酸化 RyR2 通道与 FKBP12.6 (250nM) 一起在有增加浓度 JTV-519 存在下保温。与 100nM 或 1000nM JTV-519 一起保温诱导 FKBP12.6 与 PKA-磷酸化 RyR2 结合（附图 3）。JTV-519 还诱导 FKBP12.6 结合模拟组成型 -PKA-磷酸化 RyR2 通道的突变体 RyR2-S2809D 通道（附图 3）。

[0112] 通过添加 JTV-519 显著增加了 FKBP12.6 对 PKA-磷酸化 RyR2 通道的亲和性。FKBP12.6 结合通道的解离常数 (K_{ds}) 为：RyR2-WT+PKA+PKI₅₋₂₄ (PKA 抑制剂) : 148 ± 59.0 nM ; RyR2-WT+PKA : 1972 ± 39.9 nM ; RyR2+PKA+JTV-519 : 158 ± 56.4 nM (PKA-磷酸化通道 vs. 使用 JTV-519 的 PKA-磷酸化通道 : $P < 0.05$, $n = 2$) (附图 3)。使用 RyR2-S2809D 突变体通道（模拟组成型 -PKA-磷酸化通道）获得相似的结果。FKBP12.6 结合的 K_{ds} 为：RyR2-S2809D : 2123 ± 104 nM ; 且 RyR2-S2809D+JTV-519 : 428 ± 39 nM。RyR2 的 PKA 磷酸化活化了该通道 ($P_o = 0.01 \pm 0.002$ (PKA+PKI ; $n = 11$) vs. $P_o = 0.40 \pm 0.02$ (PKA ; $n = 12$; $P < 0.05$)。将 FKBP12.6 (250nM) 添加到 PKA-磷酸化 RyR2-WT 通道中不会降低 P_o 。然而，添加 $1 \mu M$ JTV-519+FKBP12.6 将 P_o 降至与非 -PKA-磷酸化通道相差无几的水平 ($P_o = 0.002 \pm 0.001$; $n = 13$; $P < 0.05$)。

[0113] 本发明人的结果共同表明通过使用 1,4- 苯并硫氮杂~~革~~类衍生物 JTV-519 治疗可逆转 FKBP12.6 从与 FKBP12.6^{+/-} 小鼠中增加的 RyR2 开放机率、室性心动过速和心源性猝死相关的 RyR2 大分子复合物中缺失。因此，本发明人已经确定了用于治疗室性心律失常的新分子机制：RyR2 对 FKBP12.6 亲和性的增加预防引发心律失常的舒张期 SR 钙渗漏。由于 RyR2 大分子复合物中的 FKBP12.6 缺陷 (Marx 等, “PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道（兰诺定受体）中解离：缺陷心脏中的缺陷调节”，Cell, 101 : 365-76, 2000) 和遗传性运动诱发的室性心律失常 (Wehrens 等, “与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道（兰诺定受体）功能”，Cell, 113 : 829-40, 2003) 为心力衰竭中的常见特征，所以预计 TV-519 可提供治疗引发心源性猝死的 RyR2 中的分子缺陷的新的特异性途径。

[0114] 如上所讨论的，心房纤颤为人心律失常的最常见形式。迄今为止，已经确立了结构重塑和电重塑 - 包括心房不应性缩短、不应性心率 (rate) 相关性适应的丧失 (Wijffels 等, “心房纤颤引起心房纤颤：长期仪器唤醒山羊的研究”，Circulation, 92 : 1954-68, 1995 ; Morillo 等, “长期快速心房起搏：持续性心房纤颤新模型的结构、功能和电生理特征”，Circulation, 91 : 1588-95, 1995 ; Elvan 等, “起搏诱发的慢性心房纤颤损害狗的窦房结功能：电生理重塑”，Circulation, 94 : 2953-60, 1996 ; Gaspo 等, 慢性狗模型中基于心动过速诱发的持续性心房纤颤的功能机制, Circulation, 96 : 4027-35, 1997) 和折返波长缩短 - 伴随持续性折返 (Rensma 等, “正常有意识狗中兴奋波长和对折返房性心律失常的易感性”，Circ. Res., 62 : 395-410, 1988)。这种重塑在心房纤颤发生、维持和进展中可能是重要的。

还提示钙控制可能在心房纤颤中的电重塑中起作用 (Sun 等,“持续性房性心动过速导致的心房收缩机能障碍的细胞机制”, *Circulation*, 98 :719-27, 1998 ;Goette 等,心房纤颤中的电重塑 :时程和机制, *Circulation*, 94 :2968-74, 1996 ;Daoud 等,“维拉帕米和普鲁卡因胺对心房纤颤 - 诱导的人体电重塑的作用”, *Circulation*, 96 :1542-50, 1997 ;Yu 等,“心动过速诱发的人体内心房不应期的改变 :心动过速的比例依赖性和作用”, *Circulation*, 97 :2331-37, 1998 ;Leistad 等,“维拉帕米减轻短期心房纤颤后的心房收缩机能障碍,而 BAY K8644 增加心房纤颤后的心房收缩机能障碍”, *Circulation*, 93 :1747-54, 1996 ;Tieleman 等,“维拉帕米减少心动过速诱发的心房电重塑” - *Circulation*, 95 :1945-53, 1997)。

[0115] 已经对 AF 提出了各种基于改变的离子通道功能的机制。例如,研究证实在延长的房性心动过速环境中, L- 型 Ca^{2+} 电流 $I_{\text{Ca,L}}$ 和瞬时外向电流 (I_{to}) (Yue 等,“基于心房纤颤犬模型中的动作电位改变的离子重塑”, *Circ. Res.*, 81 :512-25, 1997)。观察到的 $I_{\text{Ca,L}}$ 的减量调节可能至少部分解释了 AERP 的缩短和不应性频率相关性适应性丧失 - 这两者是伴随 AF 的电重塑过程的标志 (Yue 等,“基于心房纤颤犬模型中的动作电位改变的离子重塑”, *Circ. Res.*, 81 :512-25, 1997)。在快速心房起搏的实验性动物模型和对患有 AF 的患者的临床研究中,已经证实维拉帕米可抑制电重塑,由此提示涉及 Ca^{2+} 过载 (Daoud 等,“维拉帕米和普鲁卡因胺对心房纤颤 - 诱发的人体内电重塑的作用”, *Circulation*, 96 :1542-50, 1997 ;Leistad 等,“维拉帕米减轻短期心房纤颤后的心房收缩机能障碍,而 BAY K8644 增加短期心房纤颤后的心房收缩机能障碍”, *Circulation*, 93 :1747-54, 1996)。

[0116] 尽管肉膜离子通道显然在伴随房性心动过速和 AF 的重塑中起重要作用,但是胞内 Ca^{2+} 控制的贡献尚未得到充分研究。然而,存在证据提示异常胞内 Ca^{2+} 控制确实在重塑过程中起作用。例如,在先研究已经证实频率适应性丧失胞内完全被解释为肉膜离子电流,诸如 $I_{\text{Ca,L}}$ 和 I_{to} 改变 (Ramirez 等,“犬心房动作电位的数学分析 :频率、局部因素和电重塑”, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 279 :H1767-85, 2000 ;Kneller 等,“因房性心动过速导致的 Ca^{2+} - 控制的重塑 :频率适应性丧失中的作用的证据”, *Cardiovasc. Res.*, 54 :416-26, 2002)。研究还证实心动过速 - 诱导的胞内该控制改变还显著促使了频率适应性丧失,认为这是 AF 发病机制的关键 (Sun 等,“持续性房性心动过速导致的心房收缩机能障碍的细胞机制”, *Circulation*, 98 :719-27, 1998 ;Kneller 等,“因房性心动过速导致的 Ca^{2+} - 控制的重塑 :频率适应性丧失中的作用的证据”, *Cardiovasc. Res.*, 54 :416-26, 2002 ;Hara 等,“纤维化犬心房中的稳态和非稳态动作电位 :异常频率适应性及其可能的机制”, *Cardiovasc. Res.*, 42 :455-69, 1999)。

[0117] 在先研究中,来自起搏诱发的 AF 的犬模型的心房表现出 AP- 期间 - 速率适应性丧失和 AP 特征改变,这种情况可以通过存在的兰诺定逆转。这些观察结果提示所述的改变至少部分是因胞内 Ca^{2+} - 依赖性过程所致 (Hara 等,“纤维化犬心房中的稳态和非稳态动作电位 :异常频率适应性及其可能的机制”, *Cardiovasc. Res.*, 42 :455-69, 1999)。此外,在患有持续性起搏诱发的房性心动过速的犬心房中,存在 Ca^{2+} 瞬态的显著减少 (Sun 等,“持续性房性心动过速导致的心房收缩机能障碍的细胞机制”, *Circulation*, 98 :719-27, 1998)。

[0118] 因为 Ca^{2+} 瞬态因引发 Ca^{2+} - 诱导的 Ca^{2+} 通过 RyR2 从 SR 中释放的肉膜 Ca^{2+} 进入所致,所以在先研究结果提示胞内钙控制的改变伴随心动过速诱导的重塑过程。这类异常减少的 Ca^{2+} 瞬态与分离的心房肌细胞阻抑性缩短有关,表明钙控制促使伴随 AF 的心房收缩机

能障碍 (Sun 等, 持续性房性心动过速导致的心房收缩机能障碍的细胞机制”, *Circulation*, 98 :719-27, 1998)。

[0119] 正如本文披露的, 本发明人提供了钙平衡在伴随持续性房性心动过速和 AF 的电和收缩重塑方面起重要作用。RyR2 释放 SR Ca^{2+} 储存作为心肌 Ca^{2+} 平衡的整合成分保持稳定。RyR2 调节在犬和人的心室组织中得到充分表征, 并且 RyR2 涉及心室肌的疾病, 包括心力衰竭和心源性猝死 (Marx 等, “PKA 磷酸化从钙释放通道 (兰诺定受体) 中解离 KBP12.6 : 缺陷心脏中的缺陷调节”, *Cell*, 101 :365-76, 2000 ;Wehrens 等, “与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道 (兰诺定受体) 功能”, *Cell*, 113 :829-40, 2003 ;Reiken 等, “ β -阻滞剂恢复人心力衰竭中的钙释放通道功能并且改善心肌性能”, *Circulation*, 107 :2459-66, 2003)。尽管存在 Ca^{2+} 控制在房性心律失常中起作用的证据, 但是心房兰诺定受体的调节和功能在这种环境中尚未得到充分表征。特别地, 在本发明前, 尚不了解这种通道在 AF 中的作用。

[0120] 本发明人在本文中证实, 正如在心室肌中一样, 心房胞内-钙-释放通道作为大分子复合物存在。本发明人的免疫共沉淀实验结果表明, 心房 RyR2 在以物理方式与主要的调节亚单位 calstabin2 (FKBP12.6)、与磷酸酶 PP1 和 PP2A 并且与 PKA 的调节和催化亚单位结合。此外。本发明人已经证实内源性 PKA 使心房肌质网中的 RyR2 特异性磷酸化, 从而导致 calstabin2 (FKBP12.6) 在通道复合物中缺失。这些发现提示心房中收缩功能的调节可以通过心房 RyR2 的 PKA 磷酸化以与在心室肌中观察到类似的方式介导 (Brillantes, 等 “FK-506 结合蛋白对钙释放通道 (兰诺定受体) 功能的稳定”, *Cell*, 77 :513-523, 1994)。

[0121] 在目前的研究中, 本发明人观察到 RyR2 的 PKA 超磷酸化与犬 AF 心房中 calstabin2 (FKBP12.6) 缺失有关。类似地, 本发明人观察到 PKA 超磷酸化与来自患有心力衰竭环境中的 AF 的人的心房组织中 calstabin (FKBP12.6) 缺失相关。RyR2 的这种异常 PKA 超磷酸化功能后果为在刺激心脏舒张期的条件下开放机率增加 (低胞质 Ca^{2+})。这类功能异常为已经缺失了 calstabin2 (FKBP12.6) 的通道的特征 (Brillantes, 等, “FK-506 结合蛋白对钙释放通道 (兰诺定受体) 功能的稳定”, *Cell*, 77 :513-523, 1994)。AF 的这种异常通道功能与在先的研究一致, 表明在 PKA 超磷酸化环境下, calstabin2 (FKBP12.6) 从 RyR2 中丧失产生 “渗漏性通道”, 它们易感对 Ca^{2+} -诱导的 Ca^{2+} 释放敏感性增加继发的舒张期 Ca^{2+} 渗漏 (Brillantes 等, “FK-506 结合蛋白对钙释放通道 (兰诺定受体) 功能的稳定”, *Cell*, 77 :513-23, 1994 ;Kaftan 等, “帕霉素对来自心肌的兰诺定受体 / Ca^{2+} -释放通道的作用”, *Circ. Res.*, 78 :990-97, 1996)。在没有 calstabin2 (FKBP12.6) 存在下, 还已知通道随机开放和关闭 (闸门), 而非谐调性开放和关闭 (偶联闸门) (Marx 等, “个体骨骼肌 Ca^{2+} 释放通道 (兰诺定受体) 之间的偶联门控”, *Science*, 281 :818-21, 1998)。

[0122] 有证据提示, AF 一般因过早房性期前收缩开始 (Bennett 和 Pentecost, “人体心房纤颤的发作和自发停止的模式”, *Circulation*, 41 :981-88, 1970), 已知它们是因后去极化所致 (Crane-field, P. F., “动作电位、后电位和心律失常”, *Circ. Res.*, 41 :415-23, 1977)。已经观察到在心律失常终止后房性期前收缩使 AF 即刻重新开始 (Timmermans 等, “体内心房除颤后心房纤颤即刻重新开始”, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 9 :122-28, 1998 ;Wellens 等, “Atrioverter :用于治疗心房纤颤的可植入装置”, *Circulation*, 98 :1651-56, 1998), 并且特别与早期后除极相关 (Burashnikov 和 Antzelevitch, “晚期 3 早期后除极

诱导的触发活动介导心律失常终止后即刻的心房纤颤的重新诱导”，Circulation, 107 : 2355-60, 2003)。期外收缩特别可能产生心房有效不应期缩短环境中的 AF (Wang 等, “确定狗体内心房纤颤诱发和维持的局部和功能因素”, Am. J. Physiol., 271 : H148-58, 1996), 与伴随心房电重塑的情况类似。

[0123] 如上所述, 存在如下证据: 来自“渗漏” PKA-超磷酸化 RyR2 的异常舒张期 Ca^{2+} 释放导致足以引发致命性室性心律失常的延缓后去极化 (DADs) (Wehrens 等, 与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道 (兰诺定受体) 功能, Cell, 113 : 829-40, 2003)。认为机能障碍性 RyR2 钙控制还可以用于以一种类似的方式启动 AF。本发明人观察到的异常通道功能可以通过提供引发 AF 必不可少的 DADs 源促使 AF 的发病机制, 还可以提供对与心律失常相关的重塑而言完整性的机能障碍性钙控制。得到了本文提供的证据, 即来自患有在心力衰竭环境中的 AF 的人的心肌 PKA-超磷酸化并且缺失了 calstabin2(FKBP12.6), 机能障碍性 RyR2 功能部分可以解释 AF 患者中房性心律失常的频率。

[0124] JTV-519 修复 RyR2 钙控制中特异性分子-水平缺陷的能力使得它成为新治疗剂的有吸引力的候选物。JTV-519 的潜能可划归于正在增长中的涉及 RyR2 机能障碍调节的重要心脏病, 包括心力衰竭和致命性室性心律失常 (即 PKA 超磷酸化和 calstabin2(FKBP12.6) 从通道复合物中丧失可能是其发病机制的重要贡献者)。

[0125] JTV-519 的初步研究集中在其抗-局部缺血特性方面 (Personal Communication, Aetas)。然而, 近来, 已经证实 JTV-519 抑制心房纤颤的犬无菌心包炎模型中 AF 的诱导 (Kumagai 等, “一种新的心脏保护药物 JTV-519 对犬无菌心包炎模型中心房纤颤 / 扑动的抗心律失常作用”, J. Cardiovasc. Electrophysiol., 14 : 880-84, 2003)。然而, 该研究没有确定 JTV-519 阻止 AF 可诱导性和维持性的机制。

[0126] 正如本文证实的, 本发明人已经确定使用 JTV-519 (1 μM) 治疗使得重组 calstabin2(FKBP12.6) 与已经在体外分离自犬心肌的 PKA-磷酸化 RyR2 结合。使用未处理的通道不会发生 calstabin2(FKBP12.6) 与 PKA-磷酸化 RyR2 结合。calstabin2(FKBP12.6) 与通道复合物重新结合恢复了 PKA-超磷酸化通道中的正常功能。因此, RyR2-通道功能恢复可以在 JTV-519 抑制 AF 可诱导性和维持性方面起作用, 正如 Kumagai 等观察到的 (“一种新的心脏保护药物 JTV-519 对犬无菌心包炎模型中心房纤颤 / 扑动的抗心律失常作用”, J. Cardiovasc. Electrophysiol., 14 : 880-84, 2003)。

[0127] 心房纤颤是一种复杂的电生理过程; 其分子发病机制可能是多因素的。异常心肌 Ca^{2+} 控制看起来显著地促进了该病的过程。本发明人的研究提示因 RyR2 的 PKA 超磷酸化所致的胞内 $-\text{Ca}^{2+}$ -释放通道功能可以提供 AF 中的重塑过程并且能够作为心律失常的触发器。

[0128] 使用 JTV-519 治疗和预防的新方法

[0129] 按照上述描述, 本发明提供了用于限制或预防受试者体内 RyR2-结合的 FKBP12.6 水平下降的方法。本文所用的“FKBP12.6”包括“FKBP12.6 蛋白质”和“FKBP12.6 类似物”。除非另有说明, “蛋白质”应包括蛋白质、蛋白质结构域、多肽或肽及其任意片段。“FKBP12.6 类似物”为具有 FKBP12.6 生物活性的 FKBP12.6 蛋白质的功能变体, 它与 FKBP12.6 蛋白质具有 60% 或 60% 以上的氨基酸序列同源性。本文进一步使用的术

语“FKBP12.6 生物活性”指的是在本文所述的试验条件下表现出以物理方式与未磷酸化或非超磷酸化 RyR2 连接或与之结合的蛋白质或肽的活性（即高于阴性对照的背景结合约 2 倍，或更优选约 5 倍的结合），不过，亲和性可以不同于 FKBP12.6 的亲和性。

[0130] 此外，本文所用的术语“RyR2”包括“RyR2 蛋白质”（例如心房 RyR2 蛋白质或心室 RyR2 蛋白质）和“RyR2 类似物”。“RyR2 类似物”为具有 RyR2 生物活性的 RyR2 蛋白质的功能变体，它与 RyR2 蛋白质具有 60% 或 60% 以上的氨基酸序列同源性。本文所用的术语“RyR2 类似物”包括 RyR1-RyR2- 和 RyR3 的骨骼肌的同种型。本发明的 RyR2 可以未磷酸化、磷酸化（例如通过 PKA）或超磷酸化（例如通过 PKA）；优选 RyR2 磷酸化或超磷酸化。作为本文进一步使用的术语“RyR2 生物活性”指的是在本文所述的试验条件下表现出以物理方式与 FKBP12.6 连接或与之结合的蛋白质或肽的活性（即高于阴性对照的背景结合约 2 倍，或更优选约 5 倍的结合），不过，亲和性可以不同于 RyR2 的亲和性。

[0131] 如上所述，心脏兰诺定受体 RyR2 为包括 4 种 565,000- 道尔顿 RyR2 蛋白质与 4 种 12,000- 道尔顿 FKBP12.6 蛋白质结合的蛋白质复合物。FK506 结合蛋白 (FKBPs) 为广泛表达的顺式-反式肽基-脯氨酰基异构酶，并且用于各种细胞功能。FKBP12.6 蛋白质与 RyR2 紧密结合并且调节其功能。FKBP12.6 以每个 RyR2 亚单位一个分子的方式结合 RyR2 通道，稳定 RyR2- 通道功能并且有利于相邻 RyR2 通道之间的偶联门控，由此防止心动周期的静息期过程中通道的异常活化。因此，本文所用的术语“RyR2- 结合的 FKBP12.6”包括结合 RyR2 蛋白质亚单位的 FKBP12.6 蛋白质分子或与 RyR2 四聚体结合的 FKBP12.6 的四聚体。术语“RyR2- 结合的 FKBP12.6”还包括结合 FKBP12.6 蛋白质分子的 RyR2 蛋白质亚单位或与 FKBP12.6 四聚体结合的 RyR2 四聚体。因此，“受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降”包括受试者体内 FKBP12.6- 结合的 RyR2 水平下降和受试者体内的 FKBP12.6-RyR2 复合物水平下降。

[0132] 按照本发明的方法，受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平“下降”指的是受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平可检测到的下降、减低或降低。当这种下降因给予 JTV-519（如下所述）而以任何方式停止、受阻、阻碍、阻塞或减少时，这类下降得到限制或预防，使得受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平高于它在没有 JTV-519 存在下的水平。受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的“水平”指的是受试者体内的总水平，包括受试者体内的血液（循环）、组织和细胞（例如细胞质或细胞核）中 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平。然后，作为实例，受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 总水平的下降伴随有在受试者血液、组织和 / 或细胞中 RyR2- 结合的 FKBP 12.6 的水平的下降。

[0133] 可以通过标准试验和技术检测受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平，包括那些本领域技术人员易于确定的试验和技术（例如免疫技术、杂交分析、免疫沉淀、蛋白质印迹分析、荧光成像技术和 / 或辐射检测等）以及本文披露的任何试验和检测方法。例如，可以使用本领域公知的标准方法从受试者细胞中分离并且纯化蛋白质，包括但不限于细胞：从细胞中提取（例如术语增溶蛋白质的洗涤剂），如果需要，随后使用柱进行亲和色谱；色谱法（例如 FTLIC 和 HPLC）；免疫沉淀（使用抗体）；和沉淀（例如使用异丙醇和诸如 Trizol 这类试剂）。可以在分离和纯化蛋白质后进行电泳（例如使用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶）。可以通过将给予治疗剂 / 预防剂（例如 JTV-519 或另一种 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物，按照下述方法）前检测到的 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的量与在给予所述治疗剂 / 预防剂后适当

时间检测到的量进行比较确定受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降或对其限制或预防。

[0134] 在本发明的方法中,例如,可以通过下列方式限制或预防受试者体内(例如在受试者的细胞中)RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降:抑制受试者体内 FKBP12.6 和 RyR2 的解离;增加受试者体内 FKBP12.6 与 RyR2 结合;或使受试者体内的 RyR2-FKBP12.6 复合物保持稳定。本文所用的术语“抑制解离”包括阻断、减少、抑制、限制或预防受试者体内 FKBP12.6 亚单位从 RyR2 分子上的物理解离或分离并且阻断、减少、抑制、限制或预防受试者体内 RyR2 分子从 FKBP12.6 亚单位上的物理解离或分离。本文进一步使用的术语“增加结合”包括提高、增加或改善受试者体内磷酸化 RyR2 以物理方式与 FKBP12.6 结合的能力(例如高于阴性对照的背景结合约 2 倍,或更优选约 5 倍的结合)并且提高、增加或改善受试者体内磷酸化 FKBP12.6 以物理方式与磷酸化 RyR2 结合的能力(例如高于阴性对照的背景结合约 2 倍,或更优选约 5 倍的结合)。

[0135] 另外,在本发明的方法中,可以通过直接降低受试者体内磷酸化 RyR2 的水平或通过间接降低受试者体内磷酸化 RyR2 的水平(例如通过靶向酶(诸如 PKA)或另一种调节或调制细胞中磷酸化 RyR2 功能或水平的内源性分子)限制或预防受试者体内(例如在受试者细胞中)RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平的下降。优选受试者体内磷酸化 RyR2 的水平在本发明的方法中至少下降了 10%。更优选磷酸化 RyR2 的水平至少下降了 20%。

[0136] 按照本发明的方法,受试者体内(例如在受试者细胞中)RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降得到限制或预防。本发明的受试者可以为任意的动物,包括两栖动物、鸟类、鱼、哺乳动物和有袋类动物,但优选哺乳动物(例如人;家畜,诸如猫、狗、猴、小鼠或大鼠;或商品化动物,诸如母牛或猪)。在本发明的某些实施方案中,受试者患有心脏病或为心脏病的候补者。“心脏病”的实例包括但不限于心律失常(例如心动过速;心动过速,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭和运动诱发的心源性猝死。

[0137] 心律失常是表现为心率或心节律异常的心脏电活动性紊乱。心动过速(例如房性、结性(结)、室性和发作性心动过速)是与特别在心率高于每分钟 100 次时心脏活动过快相关的疾病。快速性心律失常是与正常心节律中的不规则性相关的心动过速。运动诱发的心律失常是在受试者已经进行身体锻炼过程中/之后发生的心脏病(例如心室纤颤或室性心动过速,包括导致心源性猝死的任何情况)。

[0138] 心房纤颤为快速性心律失常的实例。更具体的说,心房纤颤是与异常和不规则心节律相关的疾病,其中在心脏的上室或心房遍在无序地产生电信号。心房纤颤的常见症状包括但不限于心悸(心脏快速和不规则搏动的不适感)。心房纤颤还可以使血块从心脏输送到大脑,导致中风。心房纤颤的最新治疗包括控制危险因素,给药以减慢心率和/或使心脏转化至正常节律并且预防与凝血相关的并发症。

[0139] 心力衰竭是表现为心脏收缩功能(收缩性)下降的疾病。心力衰竭的症状包括呼吸急促、运动耐力下降和早期肌肉疲劳。

[0140] 心脏病(例如心律失常或心力衰竭)的“候补者”为已知或认为或疑似处于发生心脏病的危险中的受试者。心脏病候补者的实例包括但不限于:疑似患有心律失常(例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室

性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)和/或心力衰竭的动物/人;和已知或认为或疑似处于发生心律失常(例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭和/或运动诱发的心源性猝死的危险中的动物/人。

[0141] 运动诱发的心律失常的“候补者”是已知或认为或疑似处于身体锻炼过程中/之后发生心律失常危险中的受试者。运动诱发的心律失常的候补者实例包括但不限于:已知患有儿茶酚胺能多形态性室性心动过速(CPVT)的动物/人;疑似患有CPVT的动物/人;和已知或认为或疑似处于身体锻炼过程中/之后处于心律失常危险中的和准备进行锻炼、目前正在锻炼或刚好完成锻炼的动物/人。如上所述,CPVT为具有结构正常心脏的个体中的遗传性疾病。其特征在于应激诱发的室性心动过速-可以导致心源性猝死的致命性心律失常。在患有CPVT的受试者中,强体力活动和/或应激在没有可检测到的结构性心脏病存在下可诱发导致心源性猝死(SCD)的双向和/或多形态性室性心动过速。患有CPVT的个体在进行锻炼时存在室性心律失常,但在静止时不会发生心律失常。

[0142] 在本发明的方法中,受试者的细胞优选为横纹肌细胞。横纹肌是排列在整个细胞的标记处的可收缩肌原纤维的重复单元(肌原纤维节),产生可以在光学显微镜等级下观察到的横纹或斜纹。横纹肌细胞的实例包括但不限于随意(骨骼)肌细胞和心肌细胞。在优选的实施方案中,在本发明方法中使用的细胞为人心肌细胞。本文所用的术语“心肌细胞”包括心肌纤维,诸如那些在心脏心肌层中发现的纤维。心肌纤维由连续的心肌细胞链或在闰盘上头尾相接的心肌细胞组成。这些盘具有两种类型的细胞连接:沿其横向部分延伸的扩展桥粒和间隙连接,其最长部分沿其纵向部分展开。

[0143] 在本发明的方法中,通过对受试者给予JTV-519限制或诱发受试者体内(例如受试者的细胞中)RyR2-结合的FKBP12.6的水平下降;这一方法随后能够使受试者细胞与JTV-519接触。JTV-519(4-[3-(4-苄基哌啶-1-基)丙酰基]-7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂~~草~~类一盐酸盐),也称作k201为1,4-苯并硫氮杂~~草~~类的衍生物,并且是钙离子通道的调节剂。除调节心肌细胞中的 Ca^{2+} 水平外,JTV-519调节豚鼠心室细胞中的 Na^+ 电流和内向-整流 K^+ 电流并且抑制豚鼠细胞中延迟的-整流 K^+ 电流。FK506和雷帕霉素为可以用于设计稳定本发明受试者体内RyR2-FKBP12.6复合物的其它化合物的药物。FK506和雷帕霉素均可使FKBP12.6从RyR2中解离。能够设计和/或筛选与这些药物结构相关、但具有相反作用的化合物。

[0144] 在本发明的方法中,可以通过治疗包括JTV-519和药物上可接受的载体的组合物对受试者给予JTV-519。药物上可接受的载体必须是“可接受的”含义是与组合物中的其它组分相容,并且对其接受者而言无害。本文使用的。药物上可接受的载体选自各种有机或无机物,它们可以用作药物制剂中的材料并且可以作为止痛剂、缓冲剂、粘合剂、崩解剂、稀释剂、乳化剂、赋形剂、填充剂、助流剂、增溶剂、稳定剂、悬浮剂、张力剂(tonicity agent)、媒介物和增粘剂掺入。如果必要,还可以加入药物添加剂,诸如抗氧化剂、芳香剂、着色剂、矫味剂、防腐剂和增甜剂。可接受的药物载体的实例包括羧甲基纤维素、微晶纤维素、甘油、阿拉伯树胶、乳糖、硬脂酸镁、甲基纤维素、粉末、盐水、藻酸钠、蔗糖、淀粉、滑石粉和水等。

[0145] 可以通过制药领域众所周知的方法制备本发明的药物制剂。例如,可以将JTV-519与载体或稀释剂混合成混悬液或溶液。还可以可选地加入一种或多种助剂(例如缓冲剂、

矫味剂、表面活性剂等)。对载体的选择取决于给药途径。

[0146] 可以通过在受试者体内使靶细胞(例如心肌细胞)接触 JTV-519 对受试者给予 JTV-519。可以使用用于导入和给予蛋白质、核酸和其它药物的公知技术使 JTV-519 接触(例如导入)受试者细胞。使细胞接触 JTV-519(即用其处理细胞)的方法的实例包括但不限于吸收、电穿孔、浸入、注射、导入、脂质体递送、转染、载体和其它递药载体和方法。当靶细胞位于受试者特定部分时,需要通过注射或通过其它方式将 JTV-519 直接导入细胞(例如通过将 JTV-519 导入血液或另一种体液)。例如,受试者的心脏组织中可以包含靶细胞并且可以通过易于由公知技术确定的标准检测方法检测心脏组织中的靶细胞,其实例包括但不限于免疫技术(例如免疫组织化学染色)、荧光成像技术和显微镜技术。

[0147] 另外,可以通过公知操作步骤对人或动物受试者给予本发明的 JTV-519,包括但不限于口服给药、非肠道给药和透皮给药。优选通过筋膜上、囊内、颅内、皮内、鞘内、肌内、眶内、腹膜内、静脉内、薄壁组织(parenchymatous)、皮下或舌下注射或通过导管经非肠道给予 JTV-519。在一个实施方案中,通过经插入受试者心脏的导管靶向递送至心肌细胞将活性剂给予受试者。

[0148] 为了口服给药,可以将 JTV-519 制剂制成胶囊、片剂、粉末、颗粒或混悬液。该制剂可以含有常用添加剂,诸如乳糖、甘露糖醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉。还可以使用如下组分制备制剂:粘合剂,诸如微晶纤维素、纤维素衍生物;阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶。另外,可以使用崩解剂,诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠制备制剂。还可以使用二碱式磷酸钙或羟基乙酸淀粉钠制备制剂。最后,可以使用润滑剂,诸如滑石粉或硬脂酸镁制备制剂。

[0149] 为了非肠道给药(即通过非消化道的途经注射给药),可以将 JTV-519 与优选与受试者血液等渗的无菌水溶液合并。可以通过下列步骤制备这类制剂:将固体活性组分溶于含有生理上相容的物质,诸如氯化钠、甘氨酸等的水,并且具有与生理条件相容的缓冲 pH,以便产生水溶液,然后使该溶液无菌。可以将制剂制成单位或多剂量容器,诸如密封安瓿或小瓶。可以通过任意注射方式递送制剂,包括但不限于筋膜上、囊内、颅内、皮内、鞘内、肌内、眶内、腹膜内、脊柱内、胸骨内、血管内、静脉内、实质、皮下或舌下或通过插入受试者心脏的导管。

[0150] 为了透皮给药,可以将 JTV-519 与皮肤渗透促进剂合并,诸如丙二醇、聚乙二醇、异丙醇、乙醇、油酸、N-甲基吡咯烷酮等,它们可增加皮肤对 JTV-519 的渗透性并且使得 JTV-519 透入皮肤和进入血流。还可以将 JTV-519/促进剂组合物进一步与聚合物合并,诸如乙基纤维素、羟丙基纤维素、乙烯/乙烯基乙酸酯、聚乙烯吡咯烷酮等合并,以便产生凝胶形式的组合物,可以将其溶于溶剂,诸如二氯甲烷,蒸发至所需粘度且然后涂布在裱背材料上而制成贴剂。

[0151] 按照本发明的方法,可以将 JTV-519 给予受试者(并且可以使 JTV-519 接触受试者细胞),其用量可有效限制或预防受试者体内,特别是受试者细胞中 RyR2-结合的 FKBP12.6 的水平下降。该用量易于由本领域技术人员基于公知操作步骤确定,包括建立的体内滴定曲线分析和本文披露的方法和试验。有效限制或预防受试者体内 RyR2-结合的 FKBP12.6 的水平下降的 JTV-519 的合适的量可以在约 5mg/kg/天-约 20mg/kg/天的范围,和/或可以为足以达到约 300ng/ml-约 1000ng/ml 血浆水平的用量。优选 JTV-519 的用量

约为 10mg/kg/ 天 - 约 20mg/kg/ 天。

[0152] 在本发明的一个实施方案中,受试者尚未发生心脏病,诸如心律失常(例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死。在这种情况下,有效限制或预防受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的 JTV-519 的量可以为有效预防受试者体内的心脏病(例如心律失常、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死)的 JTV-519 的用量。

[0153] 本文所用的“有效预防心脏病”的药物(例如 JTV-519)量包括有效预防心脏病的临床损害或症状的药物(例如 JTV-519)量。例如,如果心脏病为心房纤颤,那么有效预防心房纤颤的 JTV-519 的量可以为有效预防受试者心悸和/或血块的 JTV-519 的量。类似地,如果心脏病为运动诱发的心律失常,那么有效预防运动诱发的心律失常的 JTV-519 的量可以为有效预防受试者中运动诱发的心悸、晕厥、心室纤颤、室性心动过速和心源性猝死的 JTV-519 的量。另外,如果心脏病为心力衰竭,那么有效预防心力衰竭的 JTV-519 的量可以为有效预防受试者中呼吸急促、运动耐力下降和早期肌肉疲劳的 JTV-519 的量。

[0154] 有效预防受试者体内心脏病的药物(例如 JTV-519)的量随每一病例的具体因素的不同而改变,包括心脏病的类型、受试者的体重、受试者疾病的严重程度和药物(例如 JTV-519)的给药方式。该用量易于由本领域技术人员基于公知操作步骤确定,包括本文披露的临床试验和方法。在本发明的一个实施方案中,有效预防运动诱发的心律失常的药物(例如 JTV-519)的量为有效预防受试者中运动诱发的心源性猝死的药物(例如 JTV-519)的量。在另一个实施方案中,药物(例如 JTV-519)预防至少一种受试者体内的心脏病(例如心律失常(例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死)。

[0155] 由于稳定 RyR2- 结合的 FKBP12.6 以及维持和恢复 RyR2 的动态 PKA 磷酸化和脱磷酸化平衡的能力,所以 JTV-519 还可以用于治疗已经开始发生心脏病临床症状的受试者。如果在早期充分观察到受试者中的心脏病的症状,那么 JTV-519 可以有效限制或预防受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平的进一步下降。

[0156] 因此,在本发明的另一个实施方案中,受试者已经发生了心脏病。例如,受试者已经进行了锻炼或目前正在锻炼并且已经发生了运动诱发的心律失常。在这类情况中,有效限制或预防受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的 JTV-519 的量可以为有效治疗受试者体内心脏病(例如心律失常(例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)或心力衰竭)的 JTV-519 的量。

[0157] 本文所用的“有效治疗心脏病”的药物(例如 JTV-519)的量包括有效缓解或改善心脏病临床损害或症状的药物(例如 JTV-519)的量。例如,如果心脏病为心房纤颤,那么有效治疗心房纤颤的 JTV-519 的量可以为有效缓解或改善受试者体内的心悸和/或血块的 JTV-519 的量。类似地,如果心脏病为运动诱发的心律失常,那么有效治疗运动-诱发的 JTV-519 的量可以为有效缓解或改善受试者运动诱发的心悸、晕厥、心室纤颤和室性心动过速的 JTV-519 的量。另外,如果心脏病为心力衰竭,那么有效治疗心力衰竭的

JTV-519 的量可以为有效缓解或改善受试者的呼吸急促、运动耐力下降和早期肌肉疲劳的 JTV-519 的量。

[0158] 有效治疗受试者体内心脏病的药物（例如 JTV-519）的量随每一病例的具体因素的不同而改变，包括心脏病的类型、受试者的体重、受试者疾病的严重程度和药物（例如 JTV-519）的给药方式。该用量易于由本领域技术人员基于公知操作步骤确定，包括本文披露的临床试验和方法。在优选的实施方案中，药物（例如 JTV-519）治疗受试者体内的至少一种心脏病。

[0159] 本发明进一步提供了治疗受试者体内至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）或心力衰竭）的方法。该方法包括对该受试者给予有效治疗受试者体内至少一种心脏病的用量的 JTV-519。有效治疗受试者体内心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动-诱发的心律失常）或心力衰竭）的 JTV-519 的合适的量可以在约 5mg/kg/天 - 约 20mg/kg/天的范围，和 / 或可以为足以达到约 300ng/ml - 约 1000ng/ml 血浆水平的用量。

[0160] 本发明还提供了预防受试者体内至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死）的方法。该方法包括对该受试者给予有效治疗受试者体内至少一种心脏病的用量的 JTV-519。有效治疗受试者体内心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死）的 JTV-519 的合适的量可以在约 5mg/kg/天 - 约 20mg/kg/天的范围，和 / 或可以为足以达到约 300ng/ml - 约 1000ng/ml 血浆水平的用量。

[0161] 在上述方法的不同实施方案中，受试者中运动诱发的心律失常与 VT 相关。在优选的实施方案中，VT 为 CPVT。在这些方法的其它实施方案中，受试者为运动-诱发的心律失常的候补者，包括运动诱发的心源性猝死的候补者。

[0162] 另外，根据上述方法，本发明还提供了 JTV-519 在限制或预防患有至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死）或为这些疾病的候补者的受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法中的应用。本发明还提供了 JTV-519 在治疗或诱发受试者体内至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）、心力衰竭或诱导诱发的心源性猝死）的方法中的应用。

[0163] 新筛选方法

[0164] 如上所述和本文提供的，本发明人的数据证实 2809 位丝氨酸上的心脏兰诺定受体 RyR2 的蛋白激酶 A(PKA) 磷酸化通过释放 FK506 结合蛋白 FKBP12.6 活化通道。在缺陷心脏（包括心力衰竭的人心脏和动物模型）中，RyR2 为 PKA- 超磷酸化的，产生具有降低量

的结合的 FKBP12.6 并且具有对钙诱导的活化敏感性增加的缺陷性通道。这些改变的净结果在于 RyR2 通道“渗漏”。这些通道渗漏可以导致钙的胞内储存缺失至在肌质网 (SR) 中不再有足够的钙存在的程度,从而对肌收缩提供强刺激。这可以导致心肌收缩。作为通道渗漏的第二个结果,RyR2 通道在称作“舒张期”的心动周期静息期过程中释放钙。这种在舒张期过程中的钙释放可以引发导致心源性猝死 (SCD) 的心脏致命性心律失常 (例如室性心动过速和心室纤颤)。

[0165] 本发明人还证实使用称作左心室辅助装置 (LVAD) 的使心脏处于安静和恢复状态的机械泵装置治疗心力衰竭与 RyR2 的 PKA 超磷酸化下降有关并且可以校准通道功能。此外,本发明人已经证实使用 β 肾上腺素能阻断药 (β 阻滞剂) 治疗狗 (患有搏动诱发的心力衰竭) 可以逆转 RyR2 的 PKA 超磷酸化。 β 阻滞剂抑制活化 PKA 的途径。可以从本发明人工作结果中提取的结论在于 RyR2 的 PKA 磷酸化增加通道的活性,导致更多的钙释放入指定通道触发器 (活化剂) 的细胞。

[0166] 正如本文进一步披露的,本发明人已经确立了心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死) 与 RyR2 蛋白质 (特别是 CPVT- 相关 RyR2 突变体蛋白质) 的磷酸化增加和 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降有关。能够使用这种机制设计用于治疗 and 预防这类心脏病的有效药物。具有限制或预防 RyR2- 结合的 FKBP 12.6 的水平下降的能力的候选活性剂具有对 RyR2- 相关生物事件的作用作为这种限制或预防活性的结果,由此治疗或预防这类心脏病。

[0167] 因此,本发明进一步提供了鉴定用于治疗或预防至少一种心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死) 的活性剂的方法。该方法包括下列步骤:(a) 获得或产生含有 RyR2 的细胞培养物;(b) 使细胞接触候选活性剂;(c) 使细胞接触一种或多种已知可增加细胞中 RyR2 磷酸化的条件;和 (d) 确定该活性剂是否可以限制或预防细胞中 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降。

[0168] 本文所用的“活性剂”应包括蛋白质、多肽、肽、核酸 (包括 DNA 或 RNA)、抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 片段、分子、化合物、抗生素、药物及其任意组合。限制或预防 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的活性剂可以为天然或合成的并且可以为与 RyR2 和 / 或 FKBP12.6 反应的活性剂 (即对其具有亲和性、与之结合或定向于它们的活性剂)。正如本文进一步使用的,“含有 RyR2”的细胞为如下细胞 (优选心肌细胞),其中 RyR2 或衍生物或其同源物为天然表达或天然存在的。已知增加细胞中 RyR2 磷酸化的条件包括但不限于 PKA。

[0169] 在本发明的方法中,可以提供使药物 / 活性剂与细胞进行接触的任意标准方法使细胞与候选活性剂接触,包括任意的导入方式和本文披露的给药。可以通过公知操作步骤测定或检测细胞中 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平,包括本领域技术人员公知或本文所述的任意方法、分子操作步骤和试验。在本发明的一个实施方案中,所述的活性剂限制或预防细胞中 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降。

[0170] 正如本文披露的,RyR2 涉及横纹肌细胞中的许多生物事件 (event)。例如,已经证实 RyR2 通道在心肌细胞中的 EC 偶联和收缩性方面起重要作用。因此,显然为限制或预防

细胞中 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降而设计的治疗或预防性药物可以用于调节许多 RyR2- 相关的生物事件,包括 EC 偶联和收缩性。因此,一旦筛选出了本发明的候选活性剂并且确定它们对 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降具有合适的限制或预防作用,就可以评价其对细胞中 EC 偶联和收缩性的作用。预计本发明的治疗剂 / 预防剂可用于治疗或预防心脏病,包括心律失常 (例如心动过速 ;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性) ;室性心律失常,包括心室纤颤 ;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭和诱导诱发的心源性猝死。

[0171] 因此,本发明的方法可以进一步包括下列步骤 : (e) 使候选活性剂接触含有 RyR2 的细胞培养物 ;和 (f) 确定该活性剂是否对细胞中 RyR2- 相关生物事件具有作用。本文所用的 " RyR2- 相关生物事件 " 包括涉及 RyR2 水平或活性的生化或生理过程。正如本文披露的, RyR2- 相关生物事件的实例包括但不限于心肌细胞中的 EC 偶联和收缩性。按照本发明的该方法,可以使候选活性剂在体外接触一种或多种细胞 (优选心肌细胞)。例如,可以将细胞培养物与含有候选活性剂的制品一起保温。然后通过本领域公知的任意生物试验或方法评价候选活性剂对 RyR2- 相关生物事件的作用,包括免疫印迹、单通道记录和本文披露的任意其它方法。

[0172] 本发明进一步涉及通过上述鉴定方法鉴定的活性剂以及包括该活性剂和药物上可接受的载体的药物组合物。所述的活性剂可以用于预防受试者中运动诱发的心源性猝死并且用于治疗或预防其它 RyR2- 相关情况。本文所用的 " RyR2- 相关情况 " 为涉及 RyR2 水平或活性的情况、疾病或病症并且包括 RyR2- 相关生物事件和心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速 ;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性) ;室性心律失常,包括心室纤颤 ;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭,或运动诱发的心源性猝死)。

[0173] 可以通过对受试者给予有效治疗或预防受试者体内 RyR2- 相关情况的用量的所述活性剂治疗或预防受试者体内 RyR2- 相关情况。该用量易于由本领域技术人员测定。在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防受试者体内至少一种心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速 ;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性) ;室性心律失常,包括心室纤颤 ;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死) 的方法,通过给予该受试者有效治疗或预防受试者体内至少一种心脏病的用量的所述活性剂来进行。

[0174] 本发明还提供了鉴定用于治疗或预防心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速 ;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性) ;室性心律失常,包括心室纤颤 ;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死) 的活性剂的体内方法。该方法包括下列步骤 : (a) 获得或产生含有 RyR2 的动物 ; (b) 给予动物候选活性剂 ; (c) 使动物接触一种或多种已知可增加细胞中 RyR2 磷酸化的条件 ;和 (d) 确定该活性剂是否可以限制或预防动物体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 水平下降。该方法进一步包括下列步骤 : (e) 给予含有 RyR2 的动物所述的活性剂 ;和 (f) 确定该活性剂是否对动物体内 RyR2- 相关生物事件具有作用。还提供了通过该方法鉴定的活性剂 ;包括该活性剂的药物组合物 ;和用于治疗或预防受试者体内至少一种心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速 ;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性) ;室性心律失

常,包括心室纤颤 ;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死)的方法,通过给予受试者有效治疗或预防受试者体内至少一种心脏病的用量的该活性剂来进行。

[0175] 本发明人的工作已经证实预计阻断 PKA 活化活化的化合物可以减少 RyR2 通道活化,从而导致该较少释放入细胞。预计在 FKBP12.6 结合位点上结合 RyR2 通道,但在通道被 PKA 磷酸化时不会脱离通道的化合物可以减少通道活性作为对 PKA 活化或其它活化 RyR2 通道的触发器的反应。这类化合物还可以使得该较少释放入细胞。根据这些发现,本发明进一步提供了鉴定可以用于治疗或预防心脏病(例如心律失常(例如心动过速 ;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤 ;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死)的额外试验,因为它们可以阻断或抑制 RyR2 活化。

[0176] 作为实例,本发明的诊断试验可以使用钙灵敏性荧光染料(例如 Fluo-3、Fura-2 等)筛选钙通过 RyR2 通道释放入细胞。可以使细胞载入选择的荧光染料,然后使用 RyR2 激活物刺激以便测定添加到细胞中的化合物是否可以减弱钙依赖性荧光信号(Brillantes 等,“FK506- 结合蛋白稳定钙释放通道(兰诺定受体)功能”Cell,77 :513-23,1994 ;Gillo 等,“鼠红白血病细胞中诱导的分化过程中的钙进入”,Blood,81 :783-92,1993 ;Jayaraman 等,“酪氨酸磷酸化对肌醇 1,4,5- 三磷酸受体的调节”,Science,272 :1492-94,1996)。可以如上所述使用光电倍增管监测钙依赖性荧光信号并且使用合适的软件分析(Brillantes 等,“FK506- 结合蛋白稳定钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,77 :513-23,1994 ;Gillo 等,“鼠红白血病细胞中诱导的分化过程中的钙进入”,Blood,81 :783-92,1993 ;Jayaraman 等,“酪氨酸磷酸化对肌醇 1,4,5- 三磷酸受体的调节”-Science,272 :1492-94,1996)。该试验易于自动化以便使用多孔皿筛选大量化合物。

[0177] 为了鉴定抑制 RyR2- 介导的胞内钙释放的 PKA- 依赖性活化的化合物,试验可以包括在异源表达系统,诸如 Sf9、HEK293 或 CHO 细胞中表达重组 RyR2 通道(Brillantes 等,“FK506- 结合蛋白稳定钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,77 :513-23,1994)。还可以与 β - 肾上腺素能受体一起共表达 RyR2。这允许评价化合物对 RyR2 活化的作用作为对添加 β - 肾上腺素能受体激动剂的反应。

[0178] 还可以检测与心力衰竭程度关联的 RyR2 PKA 磷酸化的水平且然后用于测定为阻断 RyR2 通道 PKA 磷酸化而设计的化合物的功效。这类试验可以基于对 RyR2 蛋白质具有特异性的抗体的应用。例如, RyR2- 通道蛋白质可以被免疫共沉淀且然后使用 PKA 和 [γ ^{32} P]-ATP 反向 - 磷酸化。然后可以使用感光成像仪测定转至 RyR2 蛋白质的放射性 [^{32} P] 标记的量(Marx 等,“PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道(兰诺定受体)中解离 :缺陷心脏中的缺陷调节”,Cell,101 :365-76,2000)。

[0179] 本发明的另一种试验包括检测 Ser 2809 上的 PKA 磷酸化的 RyR2 的磷酸化表位 - 特异性抗体的应用。使用这类抗体进行免疫印迹可以用于评价疗法在心力衰竭和心律失常中的功效。另外, RyR2 S2809A 和 RyR2 S2809D 敲除小鼠可以用于评价疗法在心力衰竭和心律失常中的功效。这类小鼠通过表现出 RyR2 S2809A 突变抑制心力衰竭和心律失常以及 RyR2 S2809D 突变恶化了心力衰竭和心律失常而进一步提供了 RyR2 的 PKA 超磷酸化为心力衰竭和心律失常的贡献因素的证据。

[0180] 新 1,4- 苯并硫氮~~革~~类衍生物及其合成方法

[0181] 1,4- 苯并硫氮杂**草**类衍生物,特别是 2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类衍生物为制备生物活性分子、包括 JTV-519 的重要结造单元。本发明人研发了用于制备 1,4- 苯并硫氮杂**草**类中间体化合物、诸如 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类的新方法。本发明人的方法使用了用于获得并且是低廉的原料并且提供了高产率的关键 1,4- 苯并硫氮杂**草**类中间体。

[0182] 在上世纪 90 年代早期, Kaneko 等 (美国专利 US 5,416,066 ;W092/12148 ; JP4230681) 披露了可以通过使 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类 (1,4- 苯并硫氮杂**草**类中间体) 与丙烯酰氯反应且然后使所得产物与 4- 苄基哌啶反应制备 JTV-519。

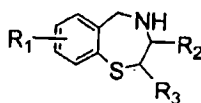
[0183] 文献中已经在先报导了用于制备 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类和类似化合物的两种方法。Kaneko 等披露的第一种方法 (美国专利 US 5,416,066) 涉及使用 2,5- 二羟基苯甲酸作为原料的 6 步骤合成途径。在该方法中,使用硫酸二甲酯选择性使 2,5- 二羟基苯甲酸甲基化。然后使所得化合物与二甲基硫代氨基甲酰基氯反应 20 小时,且然后经历高温 (270°C) 9 小时。将该步骤的产物与在甲醇中的甲醇钠一起回流 20 小时。然后使回流步骤的产物与 2- 氯乙胺在碱性条件下反应并且在高温下反应而得到环化酰胺。用 LiAlH_4 还原环化的酰胺而得到 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类 (1,4- 苯并硫氮杂**草**类中间体)。

[0184] Hitoshi 在日本专利 (JP 10045706) 中披露了制备 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类的第二种方法。该方法以 2- 溴 -5- 甲氧基苯甲醛为原料。用 NaSMe 取代溴化物并且用氯化物所得产物,随后在水中回流而得到二硫化物二醛。用 2- 氯乙胺处理该二醛并且用还原剂、诸如 NaBH_4 还原所得产物。环化所得化合物而得到 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类。

[0185] 最初,本发明人尝试使用上述方法制备 1,4- 苯并硫氮杂**草**类中间体 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类。然而,他们发现 Kaneko 等 (美国专利 US 5,416,066) 所述的第一种方法包括高温和长反应时间的合成步骤。另外,本发明人发现在第三种硫醇化中间体中的硫代基团易于被空气氧化成二硫化物化合物,使得合成随后的环化产物成为不可能。本发明人还取代 Hitoshi (JP 10045706) 所述的方法包括 Cl_2 并且不得不使用另一种制备第一种中间体的有专利权的方法以避免使用 NaSMe 取代溴化物。

[0186] 为了克服上述问题,本发明人开发了用于由易于获得并且为低廉的原料制备 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类的新方法。本发明人的方法简化了分离和纯化步骤并且可以用于制备各种 1,4- 苯并硫氮杂**草**类中间体、包括 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂**草**类和其它具有如下通式中所示一般结构的化合物:

[0187]



[0188] $\text{R1} = \text{n-MeO}, \text{n-MeS}, \text{正-烷基}, \text{n} = 6, 7, 8, 9$

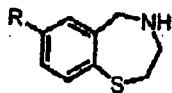
[0189] R2 = 烷基

[0190] R3 = 烷基

[0191] 该方法还可以用于制备 JTV-519。

[0192] 因此,根据上述内容,本发明提供了用于合成具有如下通式的化合物的方法:

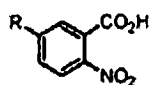
[0193]



[0194] 其中 R = OR'、SR'、NR'、烷基或卤化物且 R' = 烷基、芳基或 H,且其中 R 可以位于 2、3、4 或 5 位上,该方法包括下列步骤:

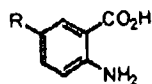
[0195] (a) 在有可选的催化剂存在下,用还原剂处理具有如下通式的化合物:

[0196]



[0197] 其中 R 如上述所定义,从而生成具有如下通式的化合物:

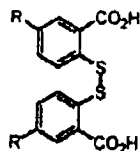
[0198]



[0199] 其中 R 如上述所定义;

[0200] (b) 用重氮化试剂和二硫化物处理步骤 (a) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物:

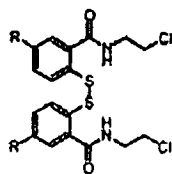
[0201]



[0202] 其中 R 如上述所定义;

[0203] (c) 用活化剂和氯乙胺处理步骤 (b) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物:

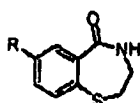
[0204]



[0205] 其中 R 如上述所定义;

[0206] (d) 用还原剂和碱处理步骤 (c) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物:

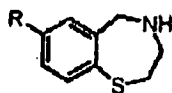
[0207]



[0208] 其中 R 如上述所定义;和

[0209] (e) 用还原剂处理步骤 (d) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物:

[0210]

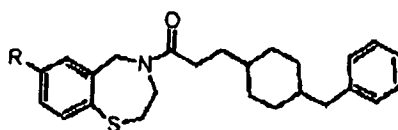


[0211] 其中 R 如上述所定义。

[0212] 按照本发明的方法,步骤 (a) 中的还原剂可以为 H_2 。另外,步骤 (b) 中的重氮化试剂可以为 $NaNO_2$, 并且步骤 (b) 中的二硫化物可以为 Na_2S_2 。此外,步骤 (c) 中的氯化物可以为 $SOCl_2$ 。步骤 (d) 中的还原剂可以为三甲膦 (Pme_3), 而步骤 (d) 中的碱为三乙胺。在另一个实施方案中,步骤 (e) 中的还原剂为 $LiAlH_4$ 。

[0213] 本发明进一步提供了用于合成具有如下通式的化合物的方法:

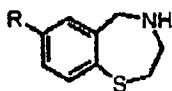
[0214]



[0215] 其中 $R = OR'$ 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物且 $R' =$ 烷基、芳基或 H, 且其中 R 可以位于 2、3、4 或 5 位上, 该方法包括下列步骤:

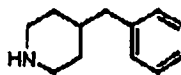
[0216] (a) 用 3-溴丙酰氯处理和一种化合物处理具有如下通式的化合物:

[0217]



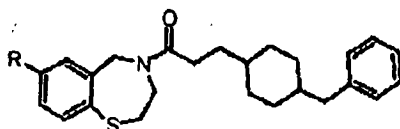
[0218] 其中 R 如上述所定义,所述的一种化合物具有如下通式:

[0219]



[0220] 从而形成具有如下通式的化合物:

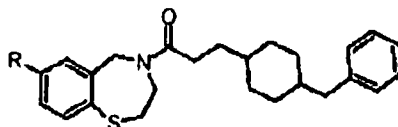
[0221]



[0222] 其中 R 如上述所定义其中。

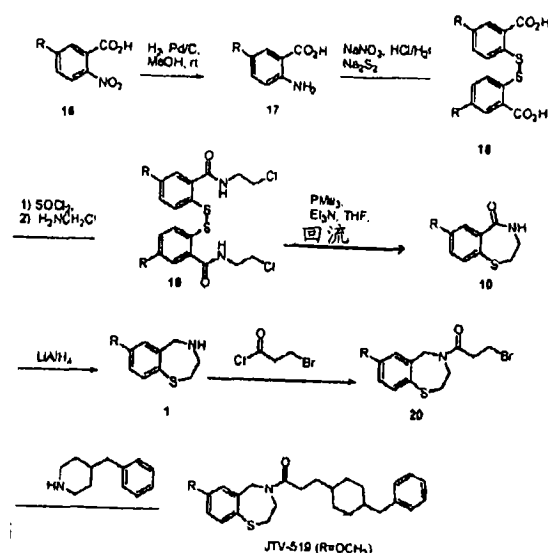
[0223] 作为实例,可以如下合成具有如下通式的化合物:

[0224]



[0225] 其中 $R = OR'$ 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物和 $R' =$ 烷基、芳基或 H, 且其中 R 可以位于 2、3、4 或 5 位上:

[0226]



[0227] R = OR', SR', NR', 烷基, 卤化物; R' = 烷基, 芳基, HR 可以位于 2、3、4 或 5 位上

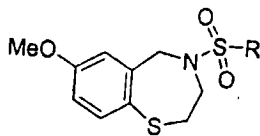
[0228] 作为实例和如下文实施例 9 和方案 1 中所示, 可以如下由 2-硝基-5-甲氧基苯甲酸制备 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂^草类。使用 H₂ 和作为催化剂的 Pd/C 还原 2-硝基-5-甲氧基苯甲酸的硝基而得到 2-氨基-5-甲氧基苯甲酸。可以使用 NaNO₂ 重氮化 2-氨基-5-甲氧基苯甲酸, 然后用 Na₂S₂ 处理而得到稳定的二硫化物化合物。不进行进一步纯化, 可以用 SOCl₂ 处理稳定的二硫化物化合物且然后使其与 2-氯乙胺在有 Et₃N 存在下反应而得到酰胺。然后可以通过如下的单罐操作步骤将该酰胺化合物转化成环化的化合物。可以将还原试剂(诸如三甲膦或三苯膦)和碱(诸如三乙胺)加入到酰胺化合物在 THF(四氢呋喃)中的溶液中。然后将所得反应混合物回流 3 小时。还原剂(三甲膦或三苯膦)将二硫化物(S-S)裂解成其一硫化物(-S), 在原位使用氯化物进行分子内环化而得到环化的酰胺。然后可以用 LiAlH₄ 还原环化的酰胺而得到 1,4-苯并硫氮杂^草类中间体 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂^草类。然后可以通过使 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂^草类与 3-溴丙酰氯反应, 然后使所得化合物与 N-苄基哌啶反应由 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂^草类制备 JTV-519。

[0229] 本发明进一步提供了包括放射性标记的 JTV-519 的组合物。可以使用本领域公知的各种不同放射性标记对 JTV-519 进行标记。例如, 本发明的放射性标记可以为放射性同位素。放射性同位素可以为发射可检测辐射的任意同位素, 包括但不限于 ³⁵S、¹²⁵I、³H 或 ¹⁴C。可以通过本领域众所周知的技术检测放射性同位素发射的放射性。例如, 可以使用 γ 成像技术, 特别是闪烁照相成像检测来自放射性同位素的 γ 发射。

[0230] 作为实例和如下文实施例 10 和方案 2 中所示, 可以如下制备放射性标记的 JTV-519。可以使用 BBr₃ 使 JTV-519 在苯环上脱甲基化。然后使用放射性标记的甲基化试剂(诸如 ³H-硫酸二甲酯)在有碱(诸如 NaH)存在下使所得苯酚化合物再甲基化而得到 ³H-标记的 JTV-519。

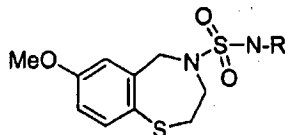
[0231] 本发明进一步提供了新的 1,4-苯并硫氮杂^草类中间体和衍生物, 包括与 JTV-519 类似的 2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂^草类。作为实例, 本发明提供了具有如下通式的化合物:

[0232]



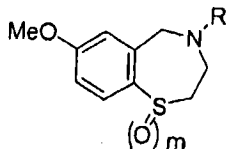
[0233] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基；

[0234]



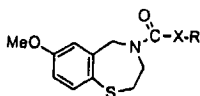
[0235] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基；

[0236]



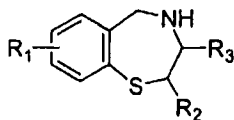
[0237] 其中 R = $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 、 $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 或 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ ，且 $\text{X} = \text{N}$ 或 S ，且 $n = 1, 2$ 或 3 ，且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基；且其中 $m = 1$ 或 2 ；和

[0238]



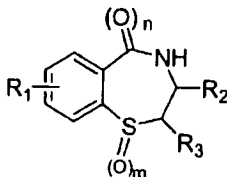
[0239] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基；且其中 $\text{X} = \text{NH}$ 或 O 。还提供了具有如下通式的另外的 2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂萘类：

[0240]



[0241] 其中 $\text{R}_1 =$ 在苯环上 2,3,4 或 5 位的 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $\text{R}' =$ 烷基、芳基或 H ；其中 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、烷基或芳基；且其中 $\text{R}_3 = \text{H}$ 、烷基或芳基；

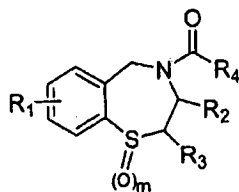
[0242]



[0243] 其中 $\text{R}_1 =$ 在苯环上 2,3,4 或 5 位的 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $\text{R}' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基；

[0244] 其中 $\text{R}_3 = \text{H}$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；且其中 $n = 0$ 或 1 ；和

[0245]



[0246] 其中 R_1 = 在苯环上 2、3、4 或 5 位的 H、OR'、SR'、NR'、烷基或卤化物, 且 R' = 烷基、芳基或酰基; 其中 R_2 = H、烷基、链烯基或芳基;

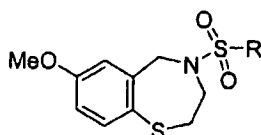
[0247] 其中 R_3 = H、烷基、链烯基或芳基; 其中 R_4 = H、卤化物、链烯基、羧酸或含有 O、S 或 N 的烷基; 且其中 $m = 0、1$ 或 2 。

[0248] 本发明人的新 1,4- 苯并硫氮杂~~革~~类化合物的实例包括但不限于 S7、S-20、S-25、S-27 和 S36。优选该化合物为 S36。

[0249] 可以在本申请的附图 15 中找到 S7、S-20、S-25、S-27 和 S36 的结构。可以如上所述将本发明的这些和任意其它新化合物与药物上可接受的载体混合成药物组合物。

[0250] 本发明进一步提供了合成本文披露的新 1,4- 苯并硫氮杂~~革~~类化合物的方法。例如, 发明提供了用于合成具有如下通式的化合物的方法:

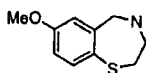
[0251]



[0252] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'$ 或 $-(CH_2)_nSR'$, 且 $n = 0、1、2$ 或 3 , 且 R' = 烷基或环烷基, 该方法包括下列步骤:

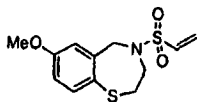
[0253] (a) 用磺酰氯化合物 (包括任何磺酰氯衍生物) 和碱处理具有如下通式的化合物:

[0254]



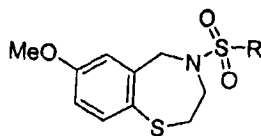
[0255] 从而生成具有如下通式的化合物:

[0256]



[0257] (b) 任选地, 用伯或仲胺处理步骤 (a) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物:

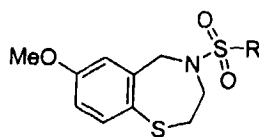
[0258]



[0259] 其中 R 如上述所定义。在一个实施方案中, 步骤 (a) 中的磺酰氯化合物选自烷基磺酰氯和芳基磺酰氯。在另一个实施方案中, 步骤 (a) 中的碱为 Et_3N 。在另一个实施方案中, 步骤 (b) 中的伯或仲胺为 4- 苄基哌啶。

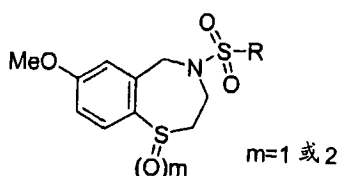
[0260] 本发明的方法可以进一步包括用氧化剂氧化具有如下通式的化合物的步骤：

[0261]



[0262] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基，从而生成具有如下通式的化合物：

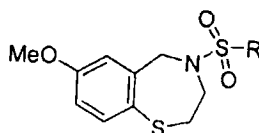
[0263]



[0264] 其中 R 如上述所定义，且其中 $m = 1$ 或 2 。在本发明的一个实施方案中，氧化剂为过氧化氢。

[0265] 作为实例以及实施例 11 和方案 3 中所示，本发明人开发了可合成具有如下结构的化合物的方法：

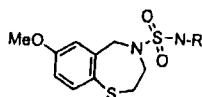
[0266]



[0267] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基。可以通过使 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂~~草~~类与烷基磺酰氯或芳基磺酰氯在有碱诸如 Et_3N 存在下反应，制备这种通式结构的新化合物。随后可以进行额外的反应（例如添加 4-苄基哌啶）以便根据需要延长侧链。正如方案 3 中显示的，可以在 $0^\circ C$ 下将 2-氯乙磺酰氯（例如 180mg ; 1.1mM）和 Et_3N （例如 140mg ; 1.1mM）加入到 CH_2Cl_2 （例如 20ml）中的 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂~~草~~类 (1)（例如 194mg ; 1mM）中。然后搅拌混合物（例如在 $0^\circ C$ 下 2 小时）并且洗涤（例如用 H_2O 和饱和 $NaHCO_3$ 溶液）。除去溶剂而得到粗产物，可以将其通过硅胶色谱法纯化。通过 NMR 证实结构。方案 3 进一步显示了可以通过使该化合物（例如 28mg ; 0.1mM）与在 CH_2Cl_2 中的 4-苄基哌啶（例如 21mg ; 0.13mM）反应延长所得化合物的侧链。在反应进行完成后，可以用碱清除剂（例如 3-(2-琥珀酸酐)丙基官能化硅胶, 0.5g) 除去过量的胺。

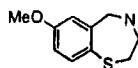
[0268] 本发明还提供了用于合成具有如下通式的化合物的方法：

[0269]



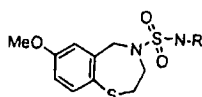
[0270] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基，该方法包括用磺酰氯和伯或仲胺在有碱存在下处理具有如下通式的化合物：

[0271]



[0272] 从而生成具有如下通式的化合物

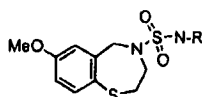
[0273]



[0274] 其中 R 如上述所定义。在本发明的一个实施方案中,所述的碱为 Et_3N 。在另一个实施方案中,所述的伯或仲胺为 1-胡椒基哌啶。

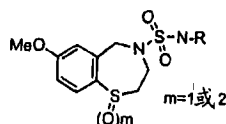
[0275] 本发明的方法可以进一步包括氧化具有如下通式的化合物的步骤:

[0276]



[0277] 其中 $\text{R} = \text{芳基}$ 、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, 且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 , 且 $\text{R}' = \text{烷基}$ 或环烷基, 从而生成具有如下通式的化合物:

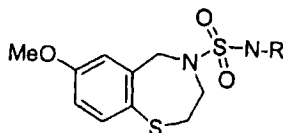
[0278]



[0279] 其中 R 如上述所定义, 且其中 $m = 1$ 或 2 。在一个实施方案中, 所述的氧化剂为过氧化氢。

[0280] 作为实例以及如实施例 11 和方案 4 中所示, 本发明人开发了合成具有如下一般结构的化合物的方法:

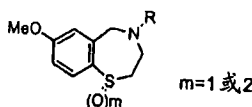
[0281]



[0282] 其中 $\text{R} = \text{芳基}$ 、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, 且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 , 且 $\text{R}' = \text{烷基}$ 或环烷基。可以通过在有碱 (例如 Et_3N) 存在下的 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂^草类与磺酰氯、随后与伯或仲胺的单罐反应制备这种通式结构的新化合物。正如方案 4 中显示的, 可以在 0°C 下将磺酰氯 (例如 15.0mg ; 0.111mM) 和 Et_3N (例如 28.0mg ; 0.22mM) 加入到在 CH_2Cl_2 (例如 20ml) 中的 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂^草类 (例如 19.4mg ; 0.1mM) 中。在搅拌该混合物 (例如在 0°C 下 2 小时) 后, 可以加入 1-胡椒基哌啶 (例如 27mg ; 0.12mM)。将该化合物再搅拌 2 小时, 且然后洗涤 (例如用 H_2O 和饱和 NaHCO_3 溶液)。可以通过添加碱清除剂 (例如 3-(2-琥珀酸酐) 丙基官能化硅胶, 0.2g) 除去过量的胺。

[0283] 本发明进一步提供了用于合成具有如下通式的化合物的方法:

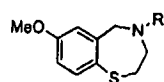
[0284]



[0285] 其中 $\text{R} = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 、 $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 或 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$, 且 $\text{X} = \text{N}$ 或 S , 且 $n = 1, 2$ 或 3 , 且 $\text{R}' = \text{烷基}$ 或环烷基; 且其中 $m = 1$ 或 2 , 该方法包括用氧化剂处理具有如下

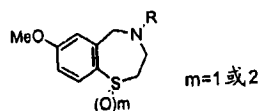
通式的化合物的步骤：

[0286]



[0287] 其中 R 如上述所定义，从而生成具有如下通式的化合物：

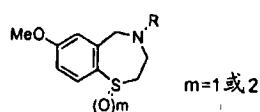
[0288]



[0289] 其中 R 和 m 如上述所定义。在一个实施方案中，所述的氧化剂为过氧化氢。该方法还可以用于氧化 JTV-519。

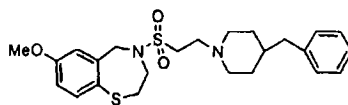
[0290] 本发明进一步提供了用于合成具有如下通式的化合物的方法：

[0291]



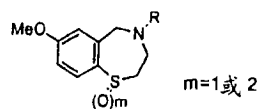
[0292] 其中 $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 、 $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 或 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ ，且 $X = \text{N}$ 或 S ，且 $n = 1, 2$ 或 3 ，且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基；且其中 $m = 1$ 或 2 ，该方法包括用氧化剂处理具有如下通式的化合物的步骤：

[0293]



[0294] 从而生成具有如下通式的化合物：

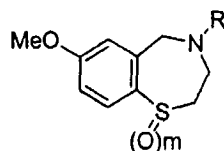
[0295]



[0296] 其中 R 和 m 如上述所定义。在一个实施方案中，所述的氧化剂为过氧化氢。该方法还可以用于氧化 JTV-519。

[0297] 作为实例以及如实施例 11 和方案 5 中所示，本发明人开发了合成具有如下通式结构的化合物的方法：

[0298]

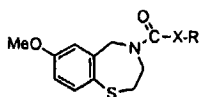


[0299] 其中 $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 、 $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ 或 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'_2$ ，且 $X = \text{N}$ 或 S ，且 $n = 1, 2$ 或 3 ，且 $\text{R}' =$ 烷基或环烷基；且其中 $m = 1$ 或 2 。可以通过用过氧化氢氧化 JTV-519 或本文披露的新 1,4- 苯并硫氮杂^革类衍生物之一制备这种通式结构的新化合物。正如方案 5 中所示，可以将在 MeOH（例如 5ml）中的所关注的 1,4- 苯并硫氮杂^革类化合物（例如 21mg ; 0.05mM）加入到 H_2O_2 （例如 0.1ml，过量）中。可以搅拌该混合物（例如 2 天）并且通

过硅胶色谱法（例如 CH_2Cl_2 : $\text{OH} = 10 : 1$ ）纯化所得产物。

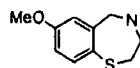
[0300] 另外,本发明提供了用于合成具有如下通式的化合物的方法:

[0301]



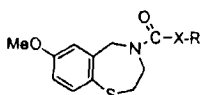
[0302] 其中 $R = \text{芳基}$ 、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, 且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 , 且 $R' = \text{烷基}$ 或环烷基; 且其中 $X = \text{NH}$ 或 O , 该方法包括用羰基氯化物在有碱和伯或仲胺或醇存在下处理具有如下通式的化合物的步骤:

[0303]



[0304] 从而生成具有如下通式的化合物:

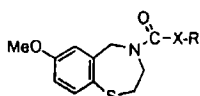
[0305]



[0306] 其中 R 和 X 如上述所定义。在一个实施方案中,羰基氯化物为三光气。在另一个实施方案中,所述的碱为 Et_3N 。在另一个实施方案中,所述的伯或仲胺为 4-苄基哌啶。

[0307] 作为实例以及实施例 11 和方案 6 中所示,本发明人开发了合成具有如下一般结构的化合物的方法:

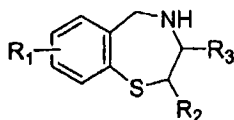
[0308]



[0309] 其中 $R = \text{芳基}$ 、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, 且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 , 且 $R' = \text{烷基}$ 或环烷基; 且其中 $X = \text{NH}$ 或 O 。可以通过使 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂草类与三光气在有碱（例如 Et_3N ）存在下反应,随后添加伯或仲胺或醇制备这种通式结构的新化合物。

[0310] 本发明进一步提供了用于合成具有如下通式的 2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂草类化合物的方法:

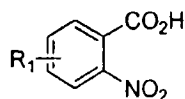
[0311]



[0312] 其中 $R_1 = \text{苯环上 } 2, 3, 4 \text{ 或 } 5 \text{ 位上的 } \text{OR}'$ 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物, 且 $R' = \text{烷基}$ 、芳基或 H ; 其中 $R_2 = \text{H}$ 、烷基或芳基; 且其中 $R_3 = \text{H}$ 、烷基或芳基, 该方法包括下列步骤:

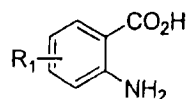
[0313] (a) 用还原剂在有可选的催化剂存在下处理具有如下通式的化合物:

[0314]



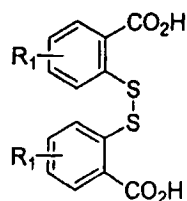
[0315] 其中 R_1 如上述所定义, 从而生成具有如下通式的化合物:

[0316]

[0317] 其中 R_1 如上述所定义；

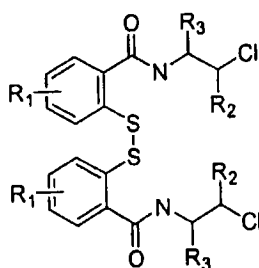
[0318] (b) 用重氮化试剂和二硫化物处理步骤 (a) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物：

[0319]

[0320] 其中 R_1 如上述所定义；

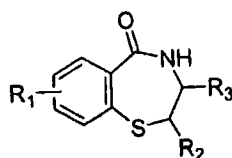
[0321] (c) 用活化剂和氯乙胺处理步骤 (b) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物：

[0322]

[0323] 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 如上述所定义；

[0324] (d) 用还原剂和碱理步骤 (c) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物：

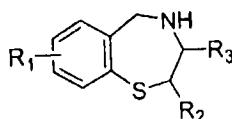
[0325]

[0326] 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 如上述所定义；

[0327] 和

[0328] (e) 用还原剂理步骤 (d) 中形成的化合物而生成具有如下通式的化合物：

[0329]

[0330] 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 如上述所定义。[0331] 使用新的 1,4- 苯并硫氮杂^草类衍生物的治疗和预防方法[0332] 本发明人的新 1,4- 苯并硫氮杂^草类化合物与 JTV-519 共有功能特征。例如，如 JTV-519 (mwt = 423)，化合物 S36 (mwt = 267) 调节钙通道。实际上，S36 (一种羧酸) 在调节钙通道方面的功效约高于 JTV-519 10 倍于 (数据未显示)。然而，不同于 JTV-519，本发

明人的新化合物表现出弱的 hERGs 阻断活性。

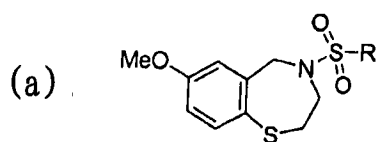
[0333] 快速延迟整流 (rectifier) (I(Kr)) 通道-钾通道-对心脏动作电位的复极化而言是重要的。HERG 为 I(Kr) 通道的成孔亚单位。I(Kr) 功能抑制-作为不良药物作用和/或 hERG 中遗传缺陷的结果-可以产生长期-QT (LQT) 综合征,它携带致命性心律不齐的危险增加。HERGs 随后是钾通道亚单位,在被阻断时,它可以导致心律失常和心源性猝死。

[0334] 本发明人的化合物在与 JTV-519 相比时对 hERG (I(Kr)) 通道的阻断作用显著下降。例如,正如附图 4-7 中所示,本发明人的化合物之一 S36 具有的 hERG 阻断活性约低于 JTV-519 的 hERG 阻断活性 5 至 10 倍。由于本发明人的化合物具有弱的 hERG 阻断活性,所以预计它们的毒性低于 JTV-519。

[0335] 基于上述内容,本发明人的新 1,4-苯并硫氮杂~~草~~类化合物的功效高于 JTV-519 并且具有降低的毒性。因此,认为本发明人的新化合物特别用于任意上述限制或预防受试者体内 RyR2-结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法中,所述的受试者包括患有至少一种心脏病或为至少一种心脏病的候补者的受试者,所述的心脏病包括但不限于心律失常(例如心动过速;房性心律失常,包括房性快速性心律失常和心房纤颤(持续性和非持续性);室性心律失常,包括心室纤颤;和运动诱发的心律失常)、心力衰竭和运动诱发的心源性猝死。还认为本发明人的化合物特别用于治疗或预防受试者的这类心脏病的方法中。

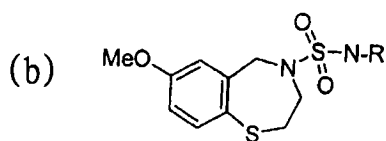
[0336] 因此,本发明进一步提供了用于受试者体内 RyR2-结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法,通过给予该受试者有效限制或预防受试者体内 RyR2-结合的 FKBP12.6 的水平下降的用量的活性剂来进行。本发明的活性剂可以为任意的 1,4-苯并硫氮杂~~草~~类衍生物,包括下列化合物:

[0337]



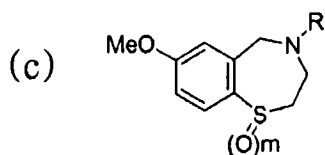
[0338] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$, 且 n = 0、1、2 或 3, 且 R' = 烷基或环烷基;

[0339]



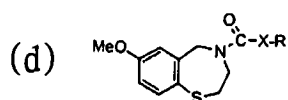
[0340] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$, 且 n = 0、1、2 或 3, 且 R' = 烷基或环烷基;

[0341]



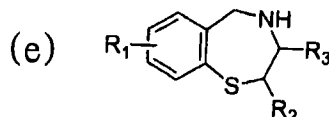
[0342] 其中 R = $CO(CH_2)_nXR'_2$ 、 $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ 或 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$, 且 X = N 或 S, 且 n = 1、2 或 3, 且 R' = 烷基或环烷基;且其中 m = 1 或 2;

[0343]



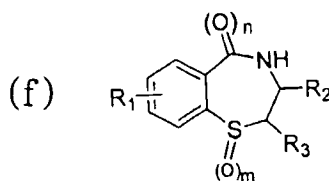
[0344] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'$ 、 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；且其中 $X = NH$ 或 O ；

[0345]



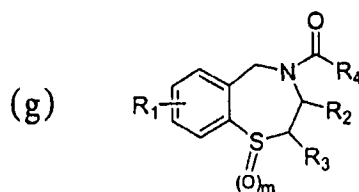
[0346] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或 H；其中 $R_2 = H$ 、烷基或芳基；且其中 $R_3 = H$ 、烷基或芳基；

[0347]



[0348] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基、或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和其中 $n = 0$ 或 1 ；

[0349]



[0350] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_4 = H$ 、卤化物、链烯基、羧酸或含有 O 、 S 或 N 的烷基；且其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和

[0351] (h) 上述 (a)-(g) 中任意的氧化形式。还提供了这些活性剂在限制或预防受试者体内 $RyR2$ - 结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法中的应用。在本发明的一个实施方案中，所述的活性剂选自 S4、S7、S-20、S-24、S-25、S-26、S-27 和 S36。这些活性剂的结构可以在附图 15 中找到。优选该活性剂为 S36。

[0352] 如上所述，受试者可以为任意的动物，但优选人。在一个实施方案中，受试者患有儿茶酚胺多形态性室性心动过速 (CPVT)。在另一个实施方案中，受试者患有至少一种心脏病或为至少一种心脏病的候补者，所述的心脏病包括但不限于心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性室性心律失常），室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）、心力衰竭和运动诱发的心源性猝死。

[0353] 在本发明的方法中，如上所述可以将 1,4- 苯并硫氮杂革类衍生物作为包括该衍生物和药物上可接受的载体的治疗组合物的组成部分给予受试者。可以通过本领域中公知和 / 或本文披露的任意技术将该衍生物或药物组合物给予受试者。

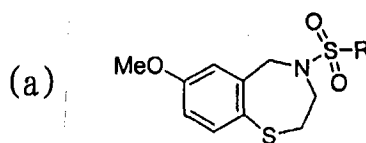
[0354] 按照本发明的方法,可以将 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物以有效限制或预防受试者体内、特别是受试者细胞中 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的用量给予受试者(并且可以使 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物与受试者细胞接触)。该用量易于由本领域技术人员基于公知操作步骤确定,包括建立的体内滴定曲线分析和本文披露的方法和试验。有效限制或预防受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的合适的量可以在约 5mg/kg/ 天 - 约 20mg/kg/ 天的范围,和 / 或可以为足以达到约 300ng/ml - 约 1000ng/ml 血浆水平的用量。优选 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的用量约为 10mg/kg/ 天 - 约 20mg/kg/ 天。

[0355] 按照本发明的方法,可以通过降低受试者体内磷酸化 RyR2 的水平限制或预防受试者体内的 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降。在本发明的一个实施方案中,受试者尚未发生心脏病 (cardiaccondition), 诸如心律失常 (例如心动过速 ; 房性心律失常, 包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性); 室性心律失常, 包括心室纤颤 ; 和运动诱发的心律失常)、心力衰竭, 或运动诱发的心源性猝死。在这种情况下, 有效限制或预防受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的量可以为有效预防受试者的心脏病 (例如心律失常、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死) 的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的用量。在一个实施方案中, 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物预防受试者的至少一种心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速 ; 房性心律失常, 包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性); 室性心律失常, 包括心室纤颤 ; 和运动诱发的心律失常)、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死)。

[0356] 在本发明的另一个实施方案中, 受试者已经发生了心脏病。在这种情况下, 有效限制或预防受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的量可以为有效治疗受试者的心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速 ; 房性心律失常, 包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性); 室性心律失常, 包括心室纤颤 ; 和运动诱发的心律失常) 或心力衰竭) 的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的量。在优选的实施方案中, JTV-519 治疗受试者体内的至少一种心脏病。

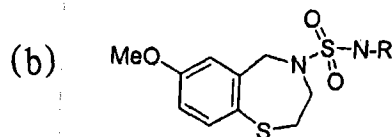
[0357] 本发明进一步提供了用于治疗或预防受试者的心脏病 (例如心律失常 (例如心动过速 ; 房性心律失常, 包括房性快速性心律失常和心房纤颤 (持续性和非持续性); 室性心律失常, 包括心室纤颤 ; 和运动诱发的心律失常), 心力衰竭, 或运动诱发的心源性猝死) 的方法, 包括给予该受试者有效限制或预防受试者体内 RyR2- 结合的 FKBP12.6 的水平下降的用量的活性剂。本发明的活性剂可以为任意的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物, 包括下列化合物:

[0358]



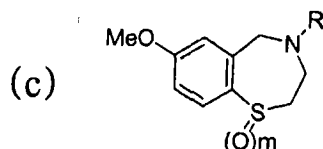
[0359] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$, 且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 , 且 $R' =$ 烷基或环烷基;

[0360]



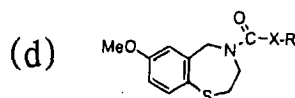
[0361] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'_2$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；

[0362]



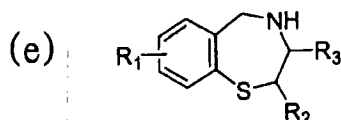
[0363] 其中 $R = CO(CH_2)_nXR'_2$ 、 $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ 或 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ ，且 $X = N$ 或 S ，且 $n = 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；且其中 $m = 1$ 或 2 ；

[0364]



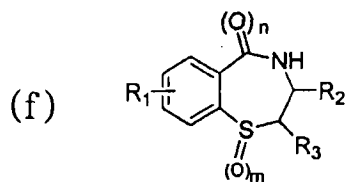
[0365] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 、 $-(CH_2)_nSR'_2$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；且其中 $X = NH$ 或 O ；

[0366]



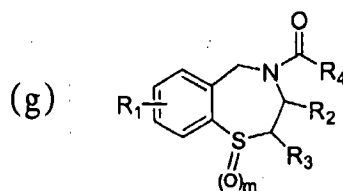
[0367] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或 H；其中 $R_2 = H$ 、烷基或芳基；且其中 $R_3 = H$ 、烷基或芳基；

[0368]



[0369] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基，或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和其中 $n = 0$ 或 1 ；

[0370]



[0371] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_4 = H$ 、卤化物、链烯基、羧酸或含有 O 、 S 或 N 的烷基；且其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和

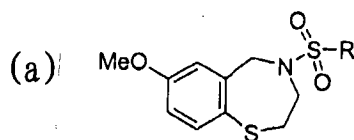
[0372] (h) 上述 (a)-(g) 中任意的氧化形式。

[0373] 本发明进一步提供了治疗受试者的至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）或心力衰竭）的方法。该方法包括给予该受试者有效治疗受试者体内至少一种心脏病的用量的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物。有效治疗受试者体内的心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）或心力衰竭）的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的合适的量可以在约 5mg/kg/ 天 - 约 20mg/kg/ 天的范围，和 / 或可以为足以达到约 300ng/ml - 约 1000ng/ml 范围血浆水平的用量。

[0374] 本发明还提供了用于预防受试者的至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死）的方法。该方法包括对该受试者给予有效预防受试者体内至少一种心脏病的用量的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物。有效预防受试者的至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）或心力衰竭）的 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的合适的量可以在约 5mg/kg/ 天 - 约 20mg/kg/ 天的范围，和 / 或可以为足以达到约 300ng/ml - 约 1000ng/ml 范围血浆水平的用量。

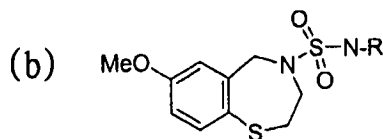
[0375] 按照上述方法，1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物的实例包括但不限于：

[0376]



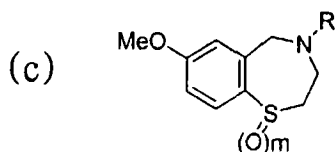
[0377] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 n = 0、1、2 或 3，且 R' = 烷基或环烷基；

[0378]



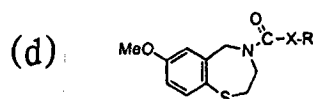
[0379] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'_2$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 n = 0、1、2 或 3，且 R' = 烷基或环烷基；

[0380]



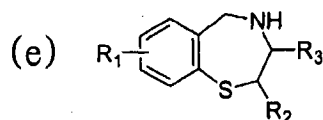
[0381] 其中 R = $CO(CH_2)_nXR'_2$ 、 $SO_2(CH_2)_nXR'_2$ 或 $SO_2NH(CH_2)_nXR'_2$ ，且 X = N 或 S，且 n = 1、2 或 3，且 R' = 烷基或环烷基；且其中 m = 1 或 2；

[0382]



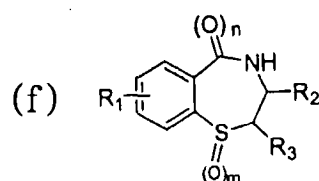
[0383] 其中 R = 芳基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'$ 、 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' =$ 烷基或环烷基；且其中 $X = NH$ 或 O ；

[0384]



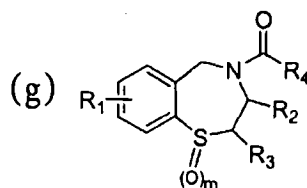
[0385] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或 H；其中 $R_2 = H$ 、烷基或芳基；且其中 $R_3 = H$ 、烷基或芳基；

[0386]



[0387] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上的 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基、或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和其中 $n = 0$ 或 1 ；

[0388]



[0389] 其中 $R_1 =$ 在苯环上 2、3、4、或 5 位上 H 、 OR' 、 SR' 、 NR' 、烷基或卤化物，且 $R' =$ 烷基、芳基或酰基；其中 $R_2 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_3 = H$ 、烷基、链烯基或芳基；其中 $R_4 = H$ 、卤化物、链烯基、羧酸或含有 O 、 S 或 N 的烷基；且其中 $m = 0, 1$ 或 2 ；和

[0390] (h) 上述 (a)-(g) 中任意的氧化形式。在本发明的一个实施方案中，1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物选自 S4、S7、S-20、S-24、S-25、S-26、S-27 和 S36。优选 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物为 S36。本发明还提供了这些 1,4- 苯并硫氮杂~~草~~类衍生物在治疗或预防受试者至少一种心脏病（例如心律失常（例如心动过速；房性心律失常，包括房性快速性心律失常和心房纤颤（持续性和非持续性）；室性心律失常，包括心室纤颤；和运动诱发的心律失常）、心力衰竭或运动诱发的心源性猝死）的方法中的应用。

[0391] 本发明还提供了用于促进 FKBP12.6 与 RyR2 结合的其它生物活性小分子的有序或高通量筛选的新试验。特别地，本发明提供了用于鉴定促进 RyR2 与 FKBP12.6 结合的活性剂的方法，包括下列步骤：(a) 获得或产生 FKBP12.6 的来源；(b) 在有候选活性剂存在下使 RyR2 接触 KBP12.6；和 (c) 确定该活性剂是否可以促进 RyR2 与 FKBP12.6 结合。在一个实施方案中，RyR2 为 PKA- 磷酸化的。在另一个实施方案中，RyR2 为 PKA- 超磷酸化的。在另一个实施方案中，RyR2 未磷酸化。

[0392] 在本发明的方法中,使 RyR2 固定在固相上,诸如平板或珠。为了有利于检测 RyR2-FKBP12.6 结合,FKBP12.6 可以为放射性标记的(例如用 ^{32}S)。此外,可以使用 FKBP12.6-结合剂检测 RyR2 与 FKBP12.6 结合的提高。在一个实施方案中,FKBP12.6-结合剂为抗 -FKBP12.6 抗体。本发明还提供了用该方法鉴定的活性剂以及该活性剂在用于限制或预防受试者体内 RyR2-结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法中的应用;在用于治疗或预防受试者体内心力衰竭、心房纤颤或运动诱发的心律失常的方法中的应用;和在用于预防受试者的运动诱发的心源性猝死的方法中的应用。

[0393] 另外,本发明提供了鉴定用于促进 RyR2 与 FKBP12.6 结合的活性剂的方法,包括下列步骤:(a) 获得或产生 FKBP12.6 的来源;(b) 在候选活性剂存在下使 FKBP12.6 接触 RyR2;和(c) 确定该活性剂是否可以促进 RyR2 与 FKBP12.6 结合。在一个实施方案中,RyR2 为 PKA-磷酸化的。在另一个实施方案中,RyR2 为 PKA-超磷酸化的。在另一个实施方案中,RyR2 未磷酸化。

[0394] 在本发明的方法中,使 FKBP12.6 固定在固相上,诸如平板或珠。为了有利于检测 RyR2-FKBP12.6 结合,RyR2 可以为放射性标记的(例如用 ^{32}P)。此外,可以使用 RyR2-结合剂检测 RyR2 与 FKBP12.6 结合的提高。在一个实施方案中,RyR2-结合剂为抗 -RyR2 抗体。本发明还提供了用该方法鉴定的活性剂以及该活性剂在用于限制或预防受试者体内 RyR2-结合的 FKBP12.6 的水平下降的方法中的应用;在用于治疗或预防受试者体内心力衰竭、心房纤颤或运动诱发的心律失常的方法中的应用;和在用于预防受试者的运动诱发的心源性猝死的方法中的应用。

[0395] 作为实例以及下文实施例 12 中所示,可以通过使用标准操作步骤将 FKBP12.6(例如野生型 FKBP12.6 或融合蛋白,诸如 GST-FKBP12.6) 固定在包被了谷胱甘肽的 96-孔平板上研发用于小分子高通量筛选的高效试验。可以将 PKA-磷酸化兰诺定(ryanodine)受体 2 型(RyR2) 加载到 FKBP12.6-包被的平板,并且与不同浓度(10-100nM) 的 JTV-519 类似物和其它 1,4-苯并硫氮杂~~草~~类衍生物一起保温 30 分钟。此后,洗涤该平板以便除去未结合的 RyR2,然后与抗 -RyR2 抗体一起保温(例如 30 分钟)。再次洗涤平板以便除去未结合的抗 -RyR2 抗体,然后用荧光标记的二次抗体处理。通过自动荧光平板读出器读取平板中的结合活性。

[0396] 或者,可以在有 ^{32}P -ATP 存在下使 RyR2 PKA-磷酸化。可以将放射性 PKA-磷酸化 RyR2 加载到 KBP12.6-包被的有以不同浓度(10-100nM) 的 JTV-519 类似物和其它 1,4-苯并硫氮杂~~草~~类衍生物存在下的 96-孔平板中 30 分钟。可以洗涤该平板以便除去未结合的放射性标记的 RyR2 且然后用自动平板读出器读取。还用 PKA-磷酸化的 RyR2 包被平板并且在有所述类似物和衍生物存在下与 ^{32}S -标记的 FKBP12.6 一起保温。

[0397] 下列实施例描述本发明,列出它们是为了有助于理解本发明,但不应以任何方式来限定如下文的权利要求中定义的本发明范围。

实施例

[0398] 实施例 1-FKBP12.6-缺陷型小鼠

[0399] 如上所述生成 FKBP12.6-缺陷型小鼠(Wehrens 等,“与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,113:829-40,

2003)。简单的说,使用全长鼠 cDNA 探针从 DBA/11acJ 文库中分离用于人 FK506 结合蛋白 12.6(FKBP12.6) 的鼠直向同源物(orthologue)的小鼠基因组 λ -噬菌体克隆。通过用 PGK-neo 可选标记取代 3.5kb 鼠基因组 DNA 设计靶向载体以便缺失含有鼠 FKBP12.6 的全编码序列的外显子 3 和 4(Bennett 等,“鼠 FK506 结合蛋白(FKBP)12.6 基因的鉴定和表征”,Mamm. Genome,9:1069-71,1998)。将 5.0-kb 5' 片段和 1.9-kb 3' 片段克隆入 pJNS2,即含有 PGK-neo 和 PGK-TK 弹夹的骨架载体。使用建立的方案使 DBA/11acJ 胚胎干(ES)细胞生长并且转染它们。首先通过 DNA 印迹分析筛选靶向的 ES 细胞并且通过 PCR 分析 5 种阳性 ES 细胞系以便证实同源重组。使雄性嵌合体与 DBA/11acJ 雌性交配,并且根据棕色皮毛颜色鉴定种系子代。使用 5' DNA 印迹分析产生种系子代基因型。使阳性 FKBP12.6^{+/-}雄性和雌性杂交并且得到约 25%频率的 BP12.6^{-/-}小鼠。FKBP12.6^{-/-}小鼠为能育的。

[0400] 使用 FKBP12.6^{-/-}小鼠进行的所有研究均使用年龄和性别相配的 FKBP12.6^{+/+}小鼠作为对照组。在对下列背景下产生的 FKBP12.6^{-/-}小鼠之间没有观察到差异:DBA/C57BL6 混合的;纯 DBA;和纯 C57BL6。

[0401] 实施例 2-小鼠中的遥测术记录和运动测试

[0402] 按照 Institutional Animal Care 和 Use Committee of Columbia University 批准的方案维护和研究 FKBP12.6^{+/+}和 FKBP12.6^{-/-}小鼠。使用 2.5%异氟烷吸入麻醉使小鼠麻醉。在腹膜内植入后获得的步行动物 ECG 无线电遥测术记录 > 7 天(Data Sciences International, St. Paul, MN)(Wehrens 等,“与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,113:829-40,2003)。为了进行应激试验,使小鼠在倾斜跑台上运动至衰竭且然后通过腹膜内注射肾上腺素(0.5-2.0mg/kg)(Wehrens 等,“与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,113:829-40,2003)。在 4 小时内取步行动物的静息心率的平均值。

[0403] 实施例 3-野生型和 RyR2-S2809D 突变体的表达

[0404] 如上所述对 RyR2(RyR2-S2809D)进行 PKA 靶位点的诱变(Wehrens 等,“与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,113:829-40,2003)。使用 Ca²⁺磷酸盐沉淀用 20 μ g RyR2 野生型(WT)或突变体 cDNA 和 5 μ g FKBP12.6cDNA 共转染 HEK293 细胞。如上所述制备含有 RyR2 通道的囊泡(Wehrens 等,“与运动诱发的心源性猝死相关的 FKBP12.6 缺陷和缺陷性钙释放通道(兰诺定受体)功能”,Cell,113:829-40,2003)。

[0405] 实施例 4-RyR2 PKA 磷酸化和 FKBP12.6 结合

[0406] 如上所述制备心脏 SR 膜(Marx 等,“PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道(兰诺定受体)中解离:缺陷心脏中的缺陷调节”-Cell,101:365-76,2000;Kaftan 等,“雷帕霉素对来自心机的兰诺定受体/Ca²⁺-释放通道的作用”,Circ. Res.,78:990-97,1996)。使用来自 Promega(Madison, WI)的 TNTTM Quick 偶联转录/翻译系统产生 ³⁵S-标记的 FKBP12.6。 [³H]兰诺定结合用于对 RyR2 水平定量。在 100ul 10-mM 咪唑缓冲液(pH 6.8)中稀释 100 μ g 微粒体,在 37°C 下与 250-nM(终浓度) [³⁵S]-FKBP12.6 一起保温 60 分钟,然后用 500 μ l 冰冷咪唑缓冲液猝灭。将样品以 100,000g 离心 10 分钟并且在咪唑缓冲液中洗涤 3 次。通过对沉淀进行液体闪烁计数测定结合的 [³⁵S]-FKBP12.6 的量。

[0407] 实施例 5-免疫印迹

[0408] 如所述的在室温下使用抗 -FKBP12/12.6 (1 : 1,000)、抗 -RyR-5029 (1 : 3,000) (Jayaraman 等,“与钙释放通道(兰诺定受体)结合的 FK506 结合蛋白”, J. Biol. Chem., 267 :9474-77,1992) 或抗 -磷酸 RyR2-P2809 (1 : 5,000) 对微粒体 (50 μ g) 进行免疫印迹 1 小时 (Reiken 等,“ β -受体阻断剂恢复人心力衰竭中的钙释放通道功能并且改善心肌性能”-Circulation,107 :2459-66,2003)。P²⁸⁰⁹-磷酸化表位-特异性抗 -RyR2 抗体为 Zymed Laboratories (San Francisco, CA) 使用相当于 Ser²⁸⁰⁹ 上 RyR2 PKA-磷酸化的肽 CRTRRI-(pS)-QTSQ 定制的亲和纯化的多克隆家兔抗体。在与 HRP-标记的抗 -家兔 IgG (1 : 5,000 稀释; Transduction Laboratories, Lexington, KY) 一起保温后,使用 ECL (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) 展开印迹。这些抗体还可以以下列比例使用: 1 : 4,000 (抗 -家兔 IgG); 和 1 : 5,000 (抗 -RyR2-5029 和抗 -FKBP12.6)。

[0409] 实施例 6-单通道记录

[0410] 如上所述,在 0mV 和电位钳条件下获得来自啮齿动物(小鼠或大鼠)心脏的天然 RyR2 或重组 RyR2 的单通道记录 (Marx 等,“PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道(兰诺定受体)中解离:缺陷心脏中的缺陷调节”Cell,101 :365-76,2000)。用于通道记录的均匀溶液为:反式隔室 -HEPES,250mmol/L;Ba(OH)₂,53mmol/L(在某些实验中,用 Ca(OH)₂ 替代 Ba(OH)₂);pH 7.35;和顺式隔室 -HEPES,250mmol/L;Tris-碱,125mmol/L;EGTA,1.0mmol/L;和 CaCl₂,0.5mmol/L;pH 7.35。除非另有说明,在顺式隔室中和有 150-nM[Ca²⁺] 和 1.0-mM[Mg²⁺] 存在下记录单通道。将兰诺定 (5mM) 施加在顺式隔室中以便证实所有通道的同一性。使用 Fetchan 软件 (Axon Instruments, Union City, CA) 根据数字化电流记录分析数据。将所有数据表示为平均值 $\pm$ SE。将未配对斯氏 t-检验用于对实验之间的平均值进行统计学比较。将 $p < 0.05$ 的值看作具有统计学显著性。

[0411] JTV-519 对 RyR2 通道的作用如附图 1-3 和表 1(下文)中所示。正如附图 3 中所示的,单通道研究证实,与在有特异性 PKA 抑制剂 PKI₅₋₂₄(C) 存在下的 PKA 磷酸化相比,PKA 磷酸化 (D) 后 RyR2 开放几率增加。在有 JTV-519 (E) 存在下将单通道功能在与 FKBP12.6 一起保温的 PKA-磷酸化 RyR2 中校准。幅度直方图(右)揭示出 PKA-磷酸化 RyR2 中活性和再分电导开放增加,但在使用 JTV-519 和 FKBP12.6 治疗后不会。附图 3F 表示在有 JTV-519 存在下将 PKA-磷酸化 RyR2 与 FKBP12.6 一起保温使 RyR2 活化的 Ca²⁺-依赖性向右移动,使得它与未磷酸化通道的 Ca²⁺-依赖性相似。

[0412] 表 1. 在运动前、运动过程中和运动后并且注射了肾上腺素的步行 ECG 数据

[0413]

	SCL (ms)	HR (bpm)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)
基线						
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
最大运动						
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
运动后肾上腺素						
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

[0414] 在使用 JTV-519 治疗的 FKBP12.6^{+/-} 小鼠 (n = 8) 或对照组 (n = 6) 和使用 JTV-519 治疗的 FKBP12.6^{-/-} 小鼠 (n = 5) 中的步行 ECG 数据汇总。SCL = 窦性周期长度; HR = 心率; ms = 毫秒; bpm = 每分钟心跳次数; FKBP12.6^{+/-} = FKBP12.6 杂合型小鼠; FKBP12.6^{-/-} = FKBP12.6 缺陷型小鼠

[0415] 实施例 7- 心力衰竭大鼠模型

[0416] 如上所述,通过左侧胸廓切开术对 25 只 Sprague-Dawley (300-400g) 进行左侧冠状动脉结扎以便产生心肌梗死 (Alvarez 等,“晚期心肌梗死后诱导大鼠心肌细胞中河豚毒素-抗性 Na⁺ 电流”-J.Mol.CellCardiol., 32:1169-79,2000)。简单的说,使用 150mg/kg 腹膜内氯胺酮和 15mg/kg 氯丙嗪混合物麻醉大鼠。使用通风辅助装置和气管内插管 (3ml 空气 /60 次击打 / 分钟) 维持呼吸。在中偏左 (median-left) 开胸术和心包开放后,使用 7-0 号缝合丝线在左心房附件下面最近点封闭冠状动脉左总干。按照相同方式处理模拟手术操作的大鼠 (n = 5),但不进行冠状动脉结扎。

[0417] 心肌梗死后 6 周,使用超声波心动描记术证实心力衰竭。通过可植入渗透输注泵 (Alzet 微型渗透泵;Durect Corporation,Cupertino,CA) 连续输注 JTV-519 或载体 (DMSO) (0.5mg/kg/h)。4 周连续治疗后,进行超声波心动描记术和血液动力学测定。处死动物并且采集组织样品。

[0418] 按照上述技术,通过结扎冠状动脉左前降支在大鼠中诱发心力衰竭。这导致心肌梗死,它可在 4 周内发展成具有心脏功能下降的扩张性心肌病。研究了 3 组动物,其中每组中均有 25 只动物:模拟手术操作组 (对照组);心力衰竭 + 疗法组 (JTV-519);和不使用疗法的心力衰竭组 (载体)。使用 JTV-519 的 4 周治疗显著减轻了舒张期和收缩期的机能障碍,正如根据超声波心动描记确定的 (附图 4)。因此,使用 JTV-519 的疗法显著改善了局部缺血诱发的心力衰竭大鼠模型的心脏功能并且减缓了心力衰竭的发展。

[0419] 使用模拟组成型 -PKA- 磷酸化 RyR2 通道的突变体 RyR2-S2809D 通道确定了 JTV-519 可增加 FKBP12.6 对 RyR2 通道的亲和性 (附图 5)。特别地,使用 JTV-519 治疗能够使 FKBP12.6 与突变体通道结合,由此揭示出了 JTV-519 预防心力衰竭的机制。使用 JTV-519 治疗还防止了缺陷心脏中 RyR2 通道中的渗漏 (附图 6)。此外,JTV-519 以剂量依赖性方式恢复了 FKBP12.6 与 PKA- 磷酸化 RyR2 和模拟组成型突 -PKA- 磷酸化 RyR2 的突变

体 RyR2-S2809D 的结合（附图 7）。

[0420] 实施例 8- 心房纤颤的犬模型

[0421] a) 动物方案

[0422] 使用上述技术将起搏器植入体重为 24-26kg 的雌性成年杂种狗体内（Dun 等，“慢性心房纤颤不会进一步减少外向电流。可以增加这些外向电流”-Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 285 :H1378-84, 2003）。使用硫喷妥钠（17mg/kg, 静脉内）麻醉动物并且通入异氟烷（1.5-2%）和 O₂（21/ 分钟）。将活性固定前导物（lead）植入右心房附件和右心房游离壁，经皮下通入并且分别与 Itrel 脉冲发生器和 Thera8962 起搏器（Medtronic, Minneapolis, MN）连接。将 40% 甲醛（0.1-0.3ml）注入希氏束以便获得完全 AV 阻断。使心室起搏器以 60bpm 的速率按程序工作并且在整个起搏方案中保持该速率。在恢复后，以 600-900bpm 的速率开始心房起搏并且维持 46±3 天或直到动物处于慢性 AF 为止（定义为在没有持续起搏的情况下 AF > 5 天）。

[0423] 然后用戊巴比妥（30mg/kg）麻醉动物并且摘除其心脏。切开心房组织，即刻快速冷冻在液氮中并且贮存在 -80℃ 下。

[0424] b) 心脏采集

[0425] 在本研究中提供的人体数据来源于 5 个人体心脏，这些心脏来自患有按照 Institutional Review Board of the New York Presbyterian Hospital 批准的方案进行正位心脏移植后处于晚期心力衰竭环境中的心房纤颤的患者。此外，数据还获自不适合于移植的 3 个正常心脏的样品。在移植时，使用冷的（4℃）、低血钙（hypocalcemic）、血钾过度（hyperkalemic）心脏停搏溶液在外植体上对心脏防腐。

[0426] c) RyR2 的免疫沉淀和反向 - 磷酸化

[0427] 将如上所述由左心房（LA）组织制备的心脏膜（100 μg）（Marx 等，“PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道（兰诺定受体）中解离：缺陷心脏中的缺陷调节”-Cell, 101 : 365-376, 2000）悬浮于 0.5ml RIPA 缓冲液（50mM Tris-HCL [pH 7.4], 0.9% NaCl, 0.25% Triton 100x, 5mM NaF 和蛋白酶抑制剂），然后与家兔抗-RyR2 抗体一起在 4℃ 下保温过夜。加入蛋白质 A 琼脂糖珠并且在 4℃ 下保温 1 小时。随后用 1x 激酶缓冲液（50mM Tris-HCL, 50mM 哌嗪-N, N' - 双 [2- 乙磺酸], 8mM MgCl 和 10mM EGTA [pH 6.8]）洗涤蛋白质 A 珠且然后将其重新悬浮于 1.5x 激酶缓冲液中。使用 PKA（5 个单位），100nM MgATP, 和 [γ-³²P] ATP（NEN Life Sciences, Boston）启动该反应；将该体系在室温下保温 8 分钟，然后使用 5 μl 6x 上样缓冲液（4% SDS 和 0.25M DTT）终止。将样品加热至 95℃ 且然后在 6% SDS-PAGE 上进行大小分级分离。使用 Molecular Dynamics Phosphoimager, 和 Imagequant 软件（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）对 RyR2 放射性进行定量。将数值除以免疫沉淀的 RyR2 的量（通过免疫印迹和光密度法测定）并且表示为 [γ-³²P] ATP 信号的倒数。

[0428] d) 再结合 JTV-519 的 Calstabin2 (FKBP12.6)

[0429] 如上所述，从心房 SR（100 μg）中免疫沉淀 RyR2 并且用 1x 激酶缓冲液洗涤。在室温下使用 PKA（5 个单位）和 100 μM MgATP 使免疫沉淀的 RyR2 磷酸化并且在 8 分钟后通过用冰冷 RIPA 缓冲液洗涤终止反应。随后在室温下和有或没有 1,4- 苯并硫氮杂革类衍生物、JTV-519（1 μM）存在下，将重组 calstabin2（FKBP12.6 ; 200nM）与磷酸化 RyR2 一起保

温。在洗涤后,与 RIPA 缓冲液反应,通过 15% SDS PAGE 对蛋白质进行大小分级分离并且对 calstabin2(FKBP12.6) 进行免疫印迹。

[0430] 下文概括的是本发明人结合实施例 8 的实验获得的结果:

[0431] 心房 RyR2 的调节

[0432] 按照上述技术使心房 RyR2 PKA 磷酸化(附图 8A)。心房 RyR2 的 PKA 磷酸化减少了 RyR2 大分子复合物中 calstabin2(FKBP12.6) 的量,正如通过免疫共沉淀测定的(附图 8C)。心房 RyR2 大分子复合物包括 calstabin2(FKBP12.6)、PKA 的催化亚单位、PKA 调节亚单位(RII)、PP2A、PP1 和 mAKAP(附图 8B),正如上述对心室 RyR2 所报导的(Marx 等,“PKA 磷酸化使 FKBP12.6 从钙释放通道(兰诺定受体)中解离:缺陷心脏中的缺陷调节”-Cell, 101:365-76,2000)。

[0433] 心房纤颤中兰诺定受体的 PKA 超磷酸化

[0434] 在来自患有持续性心房纤颤(AF)的狗的心房组织中免疫沉淀的 RyR2 的 PKA 磷酸化比对照组中增加了 130%(AF:n=6;对照组:n=6; $P<0.001$;附图 9A)。在来自患有持续性 AF 的狗的心房组织中与 RyR2 结合的 Calstabin2(FKBP12.6) 与对照组相比减少了 72%(AF:n=6;对照组:n=6; $P<0.0005$;附图 9A)。

[0435] 类似地,在来自患有处于心力衰竭环境中的慢性心房纤颤的人的心房组织中免疫沉淀的 RyR2 的 PKA 磷酸化比对照组中增加了 112%(AF:n=5;对照组:n=3; $P<0.002$;附图 9B)。与 RyR2 结合的 Calstabin2(FKBP12.6) 减少了 70%(AF:n=5;对照组:n=6; $P<0.0001$;附图 9B)。

[0436] 就所有反向-磷酸化和免疫共沉淀实验而言,通过使用抗-RyR2-5029 抗体对免疫沉淀的 RyR 进行平行免疫印迹证实加载的 RyR2 的总量(附图 9A 和 9B)。

[0437] 心脏兰诺定受体通道功能

[0438] 为了确定 AF 狗中观察到的 RyR2 PKA 高度-磷酸化的生理意义,在 0mV 和电位钳条件下使用对称离子条件在平面脂双层上取 RyR2 单通道测定值。在来自 5 只 AF 狗的 17 个通道和来自 5 只对照组狗的 11 个通道中研究心房 RyR2 单通道特性。来自对照组狗的通道中没有显示出活动增加,而来自 AF 狗的 17 个通道中的 15 个(88%)表现出开放机率显著增加(P_o ;AF: 0.412 ± 0.07 ;对照组: 0.008 ± 0.002 ; $P<0.001$)和门控频率(F_o ;AF: 21.9 ± 4.6 ;对照组: $1.6\pm0.6s^{-1}$; $P<0.002$ (附图 10A 和 10B)。

[0439] 在有 JTV-519 存在下 Calstabin2(FKBP 12.6) 的再结合

[0440] 使用 TV-519(1mM) 治疗使得重组 calstabin2(FKBP12.6) 与已经分离自犬心肌的 PKA-磷酸化 RyR2 结合。在这些实验中,在没有 JTV-519 存在下,calstabin2(FKBP12.6) 不能与 PKA-磷酸化 RyR2 结合(附图 11B)。

[0441] 通过在平面脂双层中进行 RyR2 单通道测定来证实在有 JTV-519 存在下 FKBP-12.6 再结合的生理意义。在仅有重组 calstabin2(FKBP12.6) 存在下,分离的通道表现出显著的异常行为,其中开放机率(P_o)和再电导状态存在增加。这些通道功能中的异常在加入特异性 PKA 抑制剂(PKI)时未观察到,表明在通道功能中观察到的异常对 PKA 导致的 RyR2 磷酸化具有特异性。当使用 JTV-519 在有重组 calstabin2(FKBP12.6) 存在下处理 PKA-磷酸化通道时,单通道测定值与在有 PKI 存在下观察到的测定值相似(附图 11A)。

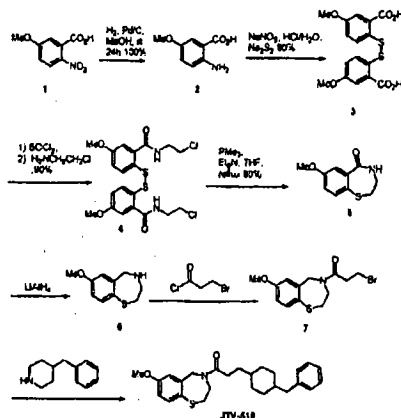
[0442] 实施例 9-1,4-苯并硫氮杂~~革~~类中间体和 JTV-519 的合成

[0443] 为了进行体内实验,本发明人需要以克计的用量的 JTV-519。然而,最初通过报导的 1,4- 苯并硫氮杂^草类中间体 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂^草类(下文方案 1 中的化合物)制备该化合物的尝试是不成功的。该中间体中的硫代基团易于被空气氧化成二硫化物化合物,使得合成环化产物成为不可能。为了克服这一问题,本发明人研发了一种以易于获得并且低廉的 2- 硝基 -5- 甲氧基苯甲酸 (1) 为原料的新方法。该方法描述在下文的方案 1 中。

[0444] 使用 H_2 与作为催化剂的 Pd/C 还原化合物 (1) 的硝基得到定量产率的 2- 氨基 -5- 甲氧基苯甲酸 (2)。使用 $NaNO_2$ 使化合物 (2) 重氮化且然后用 Na_2S_2 处理而得到稳定的二硫化物化合物 (3),产率为 80%。无需进一步纯化,用 $SOCl_2$ 处理该稳定的二硫化物 (3) 且然后在有 Et_3N 存在下与 2- 氯乙胺反应而得到酰胺 (4),产率为 90%。通过单罐操作步骤,经与三甲膦和 Et_3N 在 THF 中一起回流将化合物 (4) 转化成环化的化合物 (5)。然后用 $LiAlH_4$ 将环化的酰胺 (5) 还原成 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂^草类 (6)。

[0445] 方案 1

[0446]



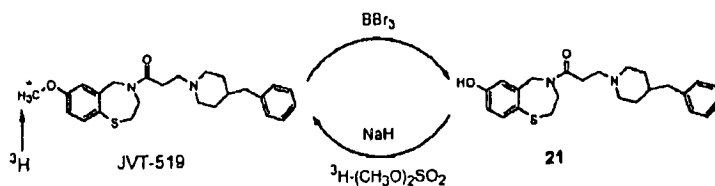
[0447] 通过使化合物 (6) 与 3- 溴丙酰氯反应且然后使所得产物与 4- 苄基哌啶反应制备 JTV-519。根据 ^1H NMR 确立 JTV-519 的结构。

[0448] 实施例 10- 放射性标记的 JTV-519 的合成

[0449] 本发明人用于合成放射性标记的 JTV-51 的新方法描述在下文的方案 2 中。为了制备放射性标记的 JTV-519,使用 BBr_3 使 JTV-519 在苯环上脱甲基化而得到苯酚化合物 (21)。在有碱 (NaH) 存在下使用放射性标记的甲基化试剂 (^3H - 硫酸二甲酯) 使苯酚化合物 (21) 再甲基化而得到 ^3H - 标记的 JTV-519 (方案 2)。

[0450] 方案 2

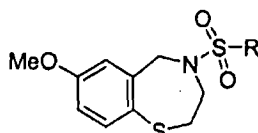
[0451]



[0452] 实施例 11- 新 1,4- 苯并硫氮杂^草类衍生物及其合成方法

[0453] 本发明人还研发了用于治疗 and 预防心律失常的新 1,4- 苯并硫氮杂^草类衍生物。特别地,本发明人制备了具有如下一般结构的化合物:

[0454]



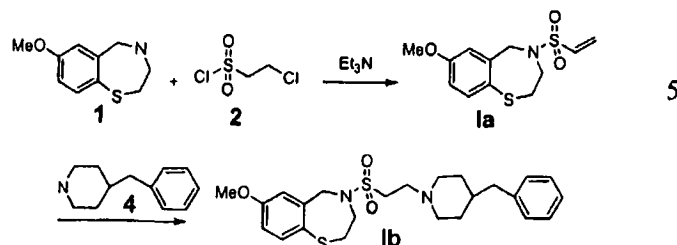
[0455] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ；且其中 $R' =$ 烷基或环烷基。通过使 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂~~草~~类与烷基磺酰氯或芳基磺酰氯在有碱、诸如 Et_3N 存在下反应制备这种一般结构的新化合物。随后可以进行额外的反应（例如添加 4-苄基哌啶）以便根据需要的延长侧链。这种一般方法的有代表性的合成描述在下文的方案 3 中。

[0456] 正如方案 3 中所示的，在 $0^\circ C$ 下将 2-氯乙磺酰氯 (180mg ; 1.1mM) 和 Et_3N (140mg ; 1.1mM) 加入到在 CH_2Cl_2 (20ml) 中的 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂~~草~~类 (1) (194mg ; 1mM)。将该混合物在 $0^\circ C$ 下搅拌 2 小时并且用 H_2O 和饱和 $NaHCO_3$ 溶液洗涤。除去溶剂得到粗产物 (Ia)，将其通过硅胶色谱法纯化（石油醚：乙酸乙酯 = 3 : 1）。来自该合成的产率为 280mg 或 95%。通过 NMR 证实结构。

[0457] 方案 3 进一步表示了通过使化合物 (Ia) (28mg ; 0.1mM) 与 4-苄基哌啶 (21mg ; 0.13mM) 在 CH_2Cl_2 中反应延长化合物 (Ia) 的侧链。在反应进行完成（通过 TLC）后，可以用碱清除剂（例如 3-(2-琥珀酸酐) 丙基官能化硅胶, 0.5g) 除去过量的胺。 ^1H NMR 和 HPLC 显示产物 (Ib) 纯度 > 98%。

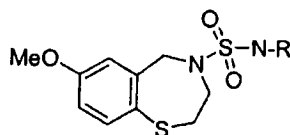
[0458] 方案 3

[0459]



[0460] 另外，本发明人生产了具有如下通式结构的化合物：

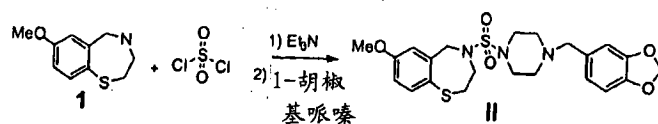
[0461]



[0462] 其中 R = 芳基、链烯基、烷基、 $-(CH_2)_nNR'$ 或 $-(CH_2)_nSR'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ；且其中 $R' =$ 烷基或环烷基。通过使 7-甲氧基-2,3,4,5-四氢-1,4-苯并硫氮杂~~草~~类 (1) 在有碱 (Et_3N) 存在下与磺酰氯的单罐反应，随后添加伯或仲胺制备这种通式结构的新化合物。在 $0^\circ C$ 下将该混合物搅拌 2 小时后，加入 1-胡椒基哌嗪 (27mg ; 0.12mM)。将该混合物再搅拌 2 小时且然后用 H_2O 和饱和 $NaHCO_3$ 溶液洗涤。通过添加碱清除剂（例如 3-(2-琥珀酸酐) 丙基官能化硅胶, 0.2g) 除去过量的胺。来自该合成的产率为 36mg 或 77%。

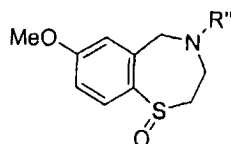
[0463] 方案 4

[0464]



[0465] 本发明人还生产了具有如下通式结构的化合物：

[0466]

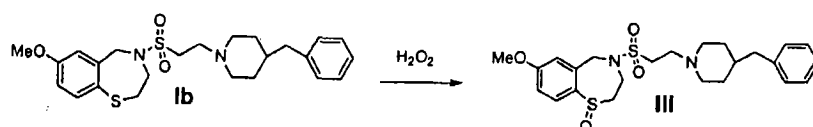


[0467] 其中 $R'' = \text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'$ 、 $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_n\text{XR}'$ 或 $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{XR}'$ ，且 $X = \text{N}$ 或 S ，且 $n = 1, 2$ 或 3 。通过使用过氧化氢氧化 JTV-519 或上述新 1,4- 苯并硫氮杂萘类衍生物之一制备这种通式结构的新化合物。这种通用方法的有代表性的合成描述在下文的方案 5 中。

[0468] 正如方案 5 中所示，将在 MeOH(5ml) 中的化合物 (Ib) (21mg ; 0.05mM) 加入到 H_2O_2 (0.1ml, 过量) 中。将该混合物搅拌 2 天并且通过硅胶色谱法纯化产物 III ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 10 : 1$)。来自该合成的产率为 19mg 或 91%。

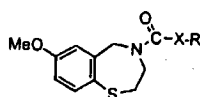
[0469] 方案 5

[0470]



[0471] 最后，本发明人制备了具有如下通式结构的化合物：

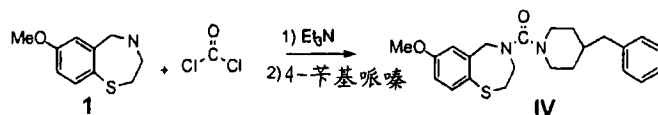
[0472]



[0473] 其中 $R = \text{芳基}$ 、烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$ ，且 $n = 0, 1, 2$ 或 3 ，且 $R' = \text{烷基}$ 、环烷基；且其中 $X = \text{NH}$ 或 O 。通过使 7- 甲氧基 -2,3,4,5- 四氢 -1,4- 苯并硫氮杂萘类 (1) 在有碱 (Et_3N) 存在下与三光气反应，随后添加伯或仲胺或醇制备这种通式结构的新化合物。这种通用方法的有代表性的合成描述在下文的方案 6 中。

[0474] 方案 6

[0475]



[0476] 实施例 12- 高通过量筛选测定

[0477] 本发明人研发了用于筛选生物活性小分子的试验。这些试验基于 FKBP12 蛋白质与 RyR 的再结合。

[0478] 可以通过将 FKBP12.6 (GST- 融合蛋白) 固定在包被了谷胱甘肽的 96- 孔平板上研发用于小分子高通过量筛选的高效试验。可以将 PKA- 磷酸化兰诺定受体 2 型 (RyR2) 加载到 FKBP12.6- 包被的平板并且与不同浓度 (10-100nM) 的 JTV-519 类似物一起保温 30 分钟。

此后,洗涤该平板以便除去未结合的 RyR2,然后与抗 -RyR2 抗体一起保温 30 分钟。再次洗涤平板以便除去未结合的抗 -RyR2 抗体且然后用荧光标记的二次抗体处理。通过自动荧光平板读出器读取平板中的结合活性。

[0479] 在备选的试验中,可以在有 ^{32}P -ATP 存在下使 RyR2 PKA- 磷酸化。可以将放射性 PKA- 磷酸化 RyR2 加载到 KBP12.6- 包被的有以不同浓度 (10-100nM) 的 JTV-519 类似物存在下的 96- 孔平板中 30 分钟。洗涤该平板以便除去未结合的放射性标记的 RyR2 且然后用自动平板读出器读取。

[0480] 实施例 13- 使 FKBP12.6 与 RYR2 再结合的新 1,4- 苯并硫氮杂革类衍生物

[0481] 在室温下用 PKA 使心脏肌质网 (SR) 磷酸化 30 分钟,使得 FKBP12.6 从 RyR2 复合物中完全解离。然后在室温下将 SR(50mg) 与 250nMFKBP12.6 和测试化合物一起保温 30 分钟。将样品以 100,000g 离心 10 分钟,并且用 10mM 咪唑缓冲液将沉淀洗涤 3 次。在洗涤后,通过 15% PAGE 分离蛋白质。使用抗 -FKBP 抗体展开免疫印迹。本研究的结果如附图 12 中所示。

[0482] 实施例 14- 在小鼠中的遥测记录和运动 /EKG 测试

[0483] 使用 FKBP12.6^{+/-} 小鼠 (干预组)、年龄 - 和性别 - 相配的 FKBP12.6^{-/-} 小鼠 (阳性对照) 和野生型 FKBP 12.6^{+/+} 小鼠 (阴性对照) 进行研究。通过在心脏组织中进行免疫印迹证实 FKBP12.6 蛋白质不存在 (FKBP12.6^{-/-}) 或减少 (FKBP12.6^{+/-})。

[0484] 以 1.0 μl / 小时的速率将药物 JTV-519 (血浆靶浓度 1.0 μM) 或衍生物 S36 (血浆靶浓度 1.0 μM 或 0.02 μM) 通过微型渗透泵连续皮下输注入 FKBP12.6^{+/-} 或 FKBP12.6^{-/-} 小鼠 7 天,此后进行运动测试 (AlzetDurect Co., Cupertino, CA)。使用腹膜内注射氯胺酮 (50 $\mu\text{g/kg}$) 和赛拉嗪 (10 $\mu\text{g/kg}$) 麻醉小鼠并且植入放射性 EKG 发送器。在腹膜内植入后 1 周获得步行动物的 ECG 放射性遥测记录 (Data SciencesInternational, St. Paul, MN)。将标准尺度用于测定 ECG 参数。

[0485] 为了进行应激试验,使小鼠在倾斜跑台上以阶梯方式运动至衰竭且然后通过腹膜内注射肾上腺素 (2.0mg/kg) 以便进行最大的交感神经刺激。然后在 4 小时内取步行动物的静息心率的平均值。在运动测试后进行恢复并且监测运动后的情况过夜。测定窦性周期长度 (SCL) 和 PR、QRS 和 QT 间隔并且使用 Mitchell 公式计算速率校准的 QT 间隔 (QTc)。通过 HPLC 证实血浆药物水平。将结果概括在附图 13 中。

[0486] 实施例 15- JTV-519 改善心力衰竭大鼠模型的心脏收缩性

[0487] 通过结扎左冠状动脉使大鼠发生心肌梗死 (MI)。在 MI 后直接开始使用可植入渗透泵 (Alzet, Durect Corporation, Cupertino, CA) 进行的用 JTV-519 (n = x) 或载体 (n = x) 的治疗。MI 后 24 小时和 6 周使用超声波心动描记术在中 - 乳突 (mid-papillary) 水平测定心肌收缩期 (Ds) 和舒张期 (Dd) 直径;然后计算缩短分数 (fractional shortening)。正如附图 14 中所示,使用 JTV-519 治疗显著改善了患有心力衰竭的大鼠体内的的心脏功能。

[0488] 尽管已经为清楚和理解目的在一定程度上详细描述了上述本发明,但是本领域技术人员可以理解,通过阅读本说明书,可以在不脱离待批权利要求中确定的本发明确切范围的情况下进行各种形式和内容上的变型。

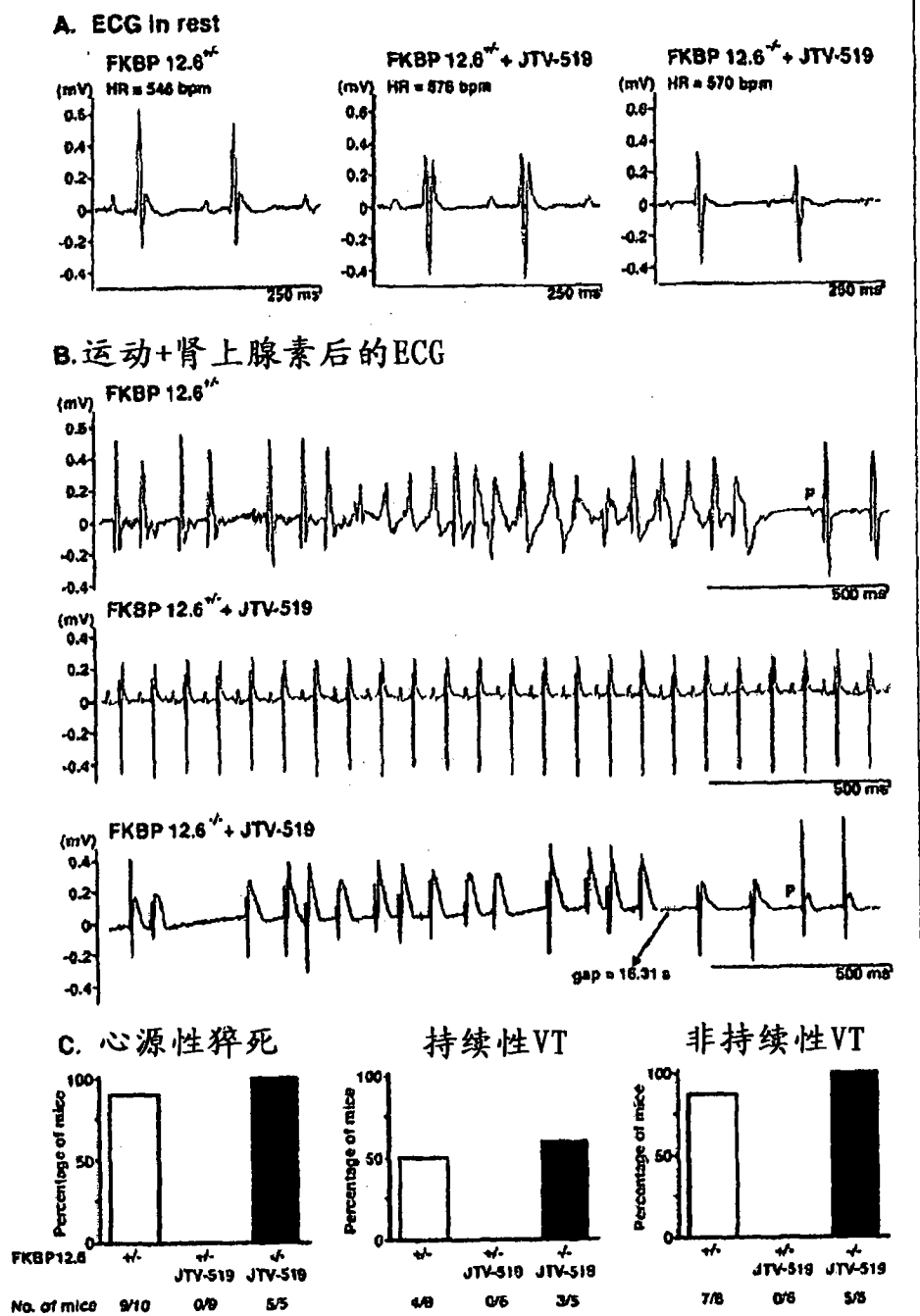


图 1

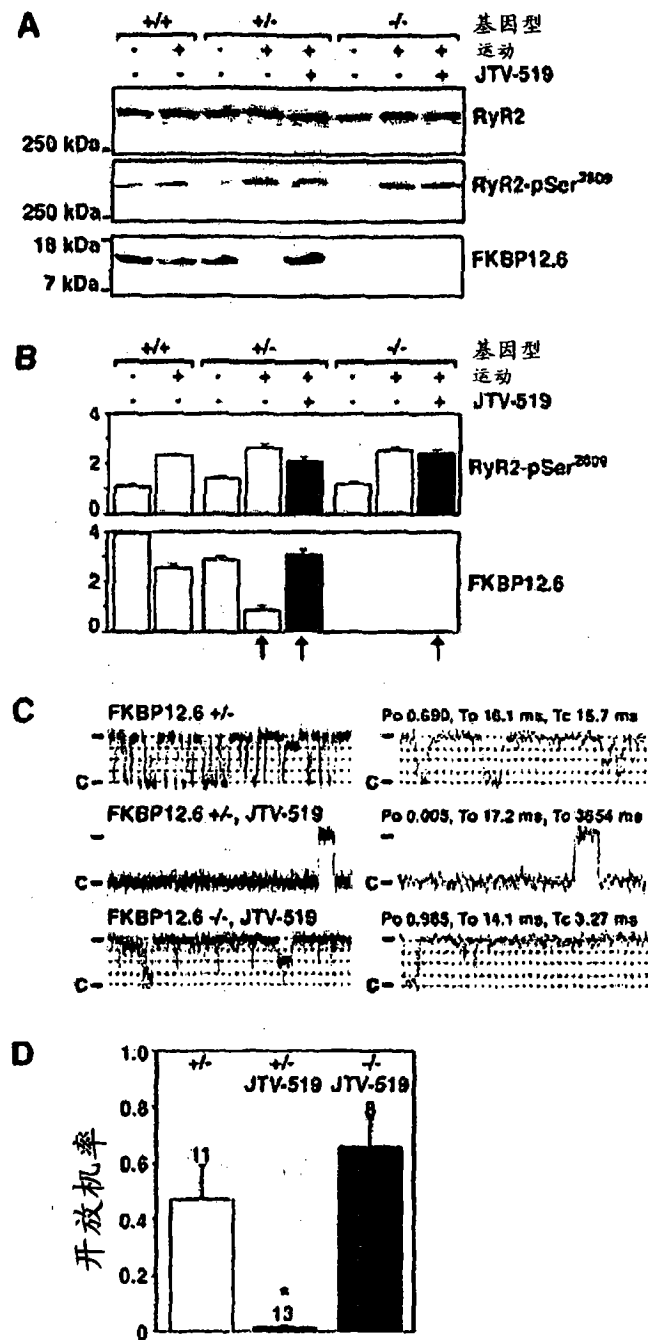


图 2

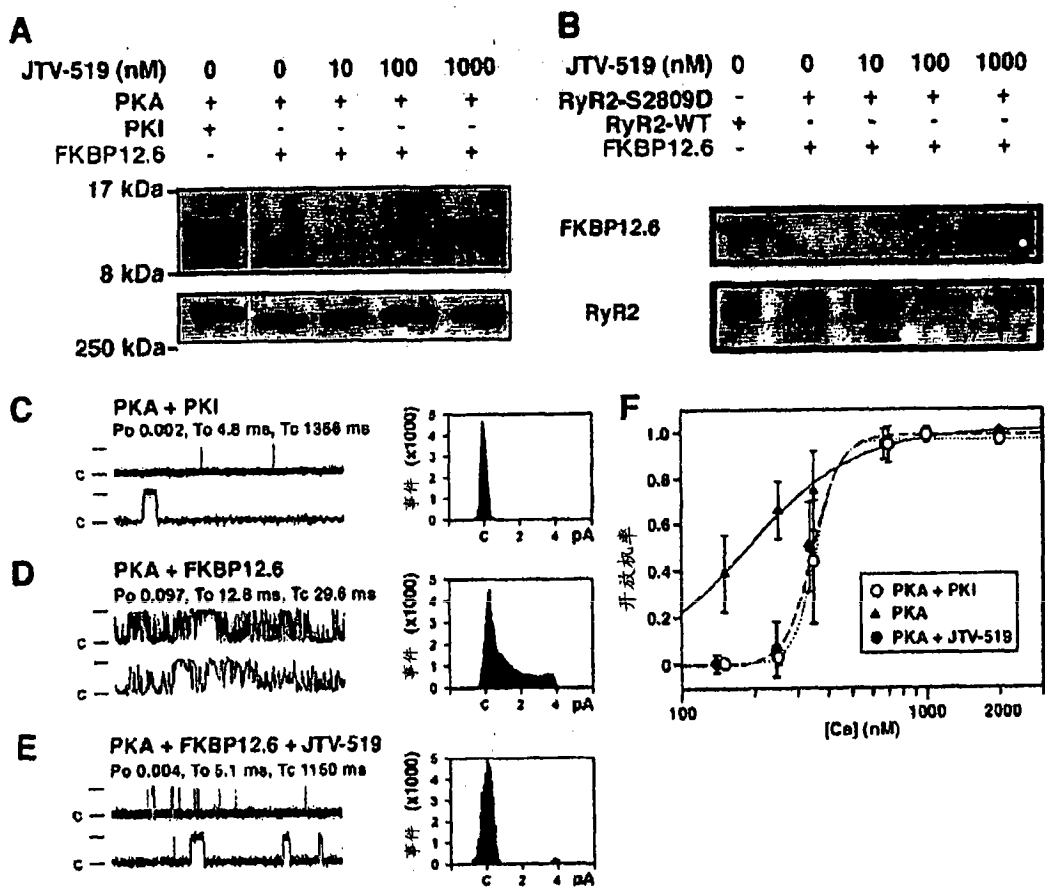


图 3

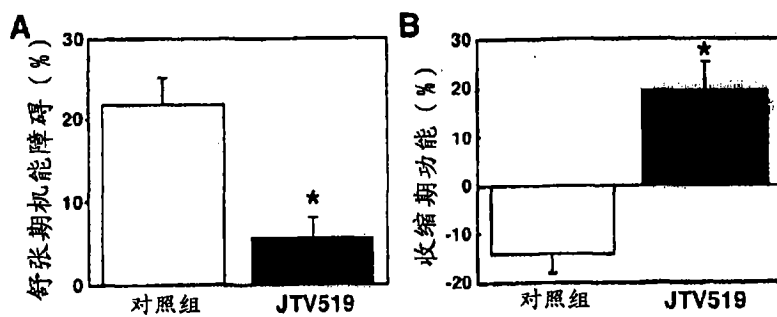


图 4

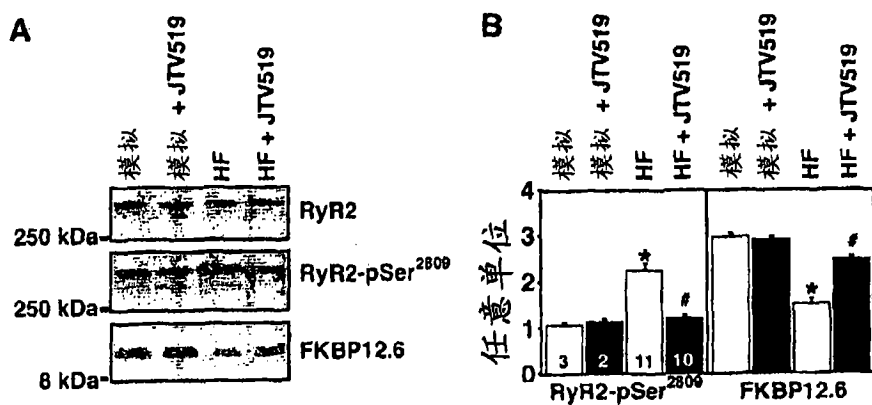


图 5

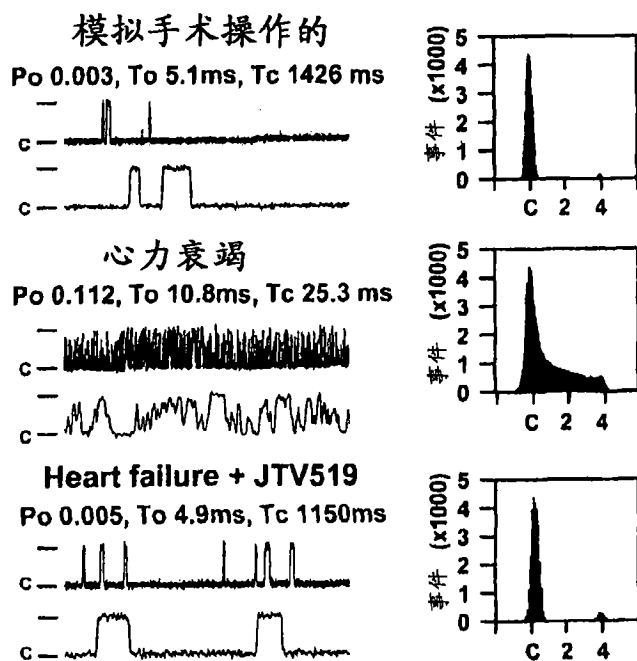


图 6

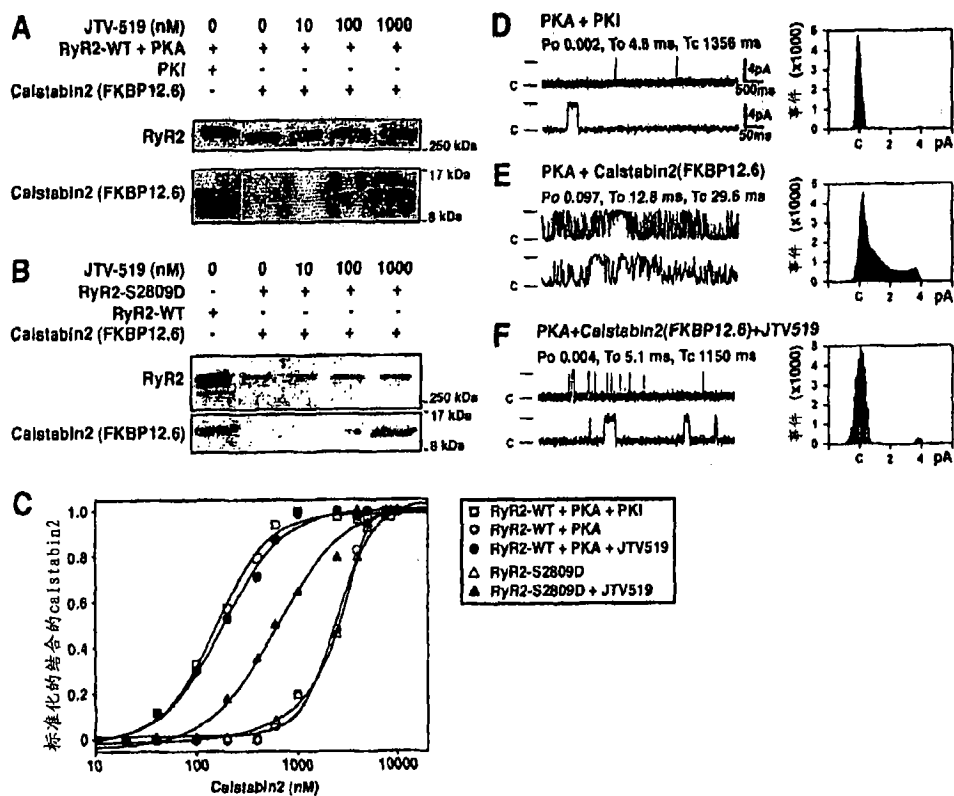


图 7

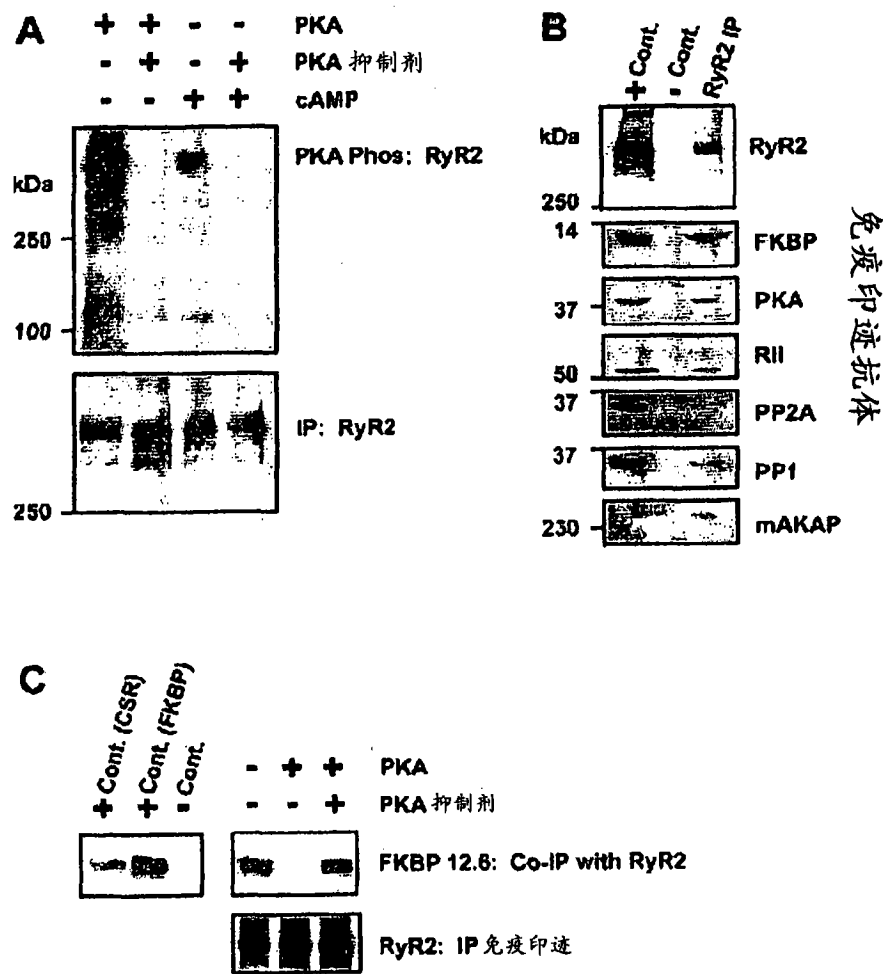


图 8

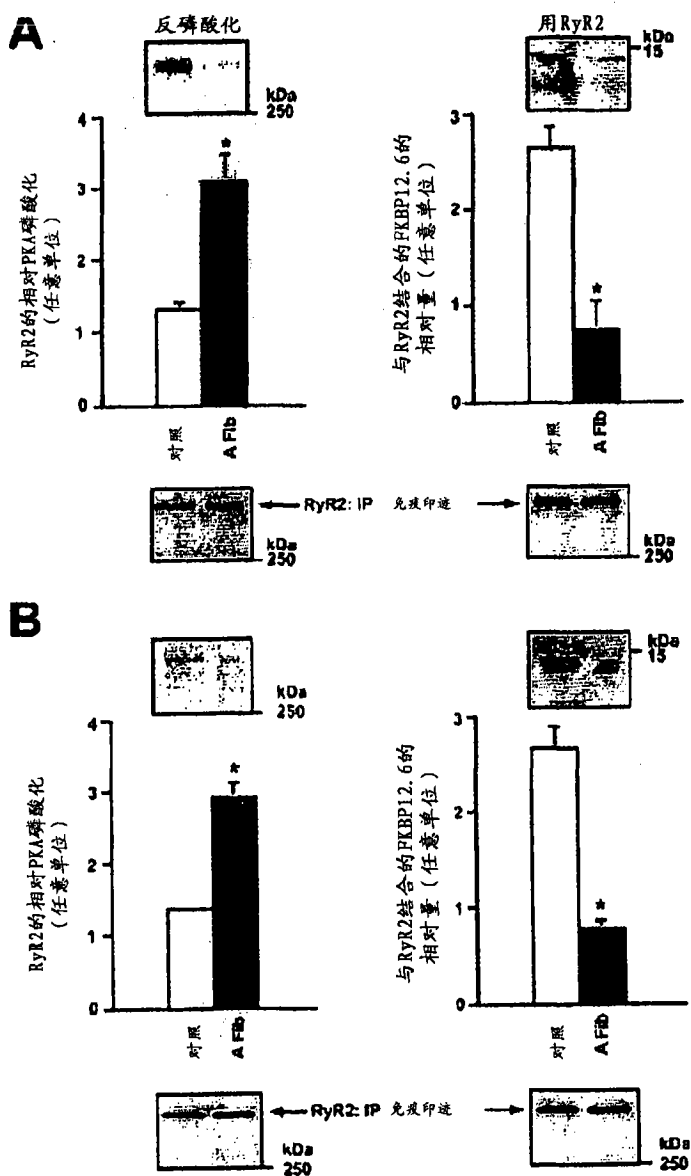


图 9

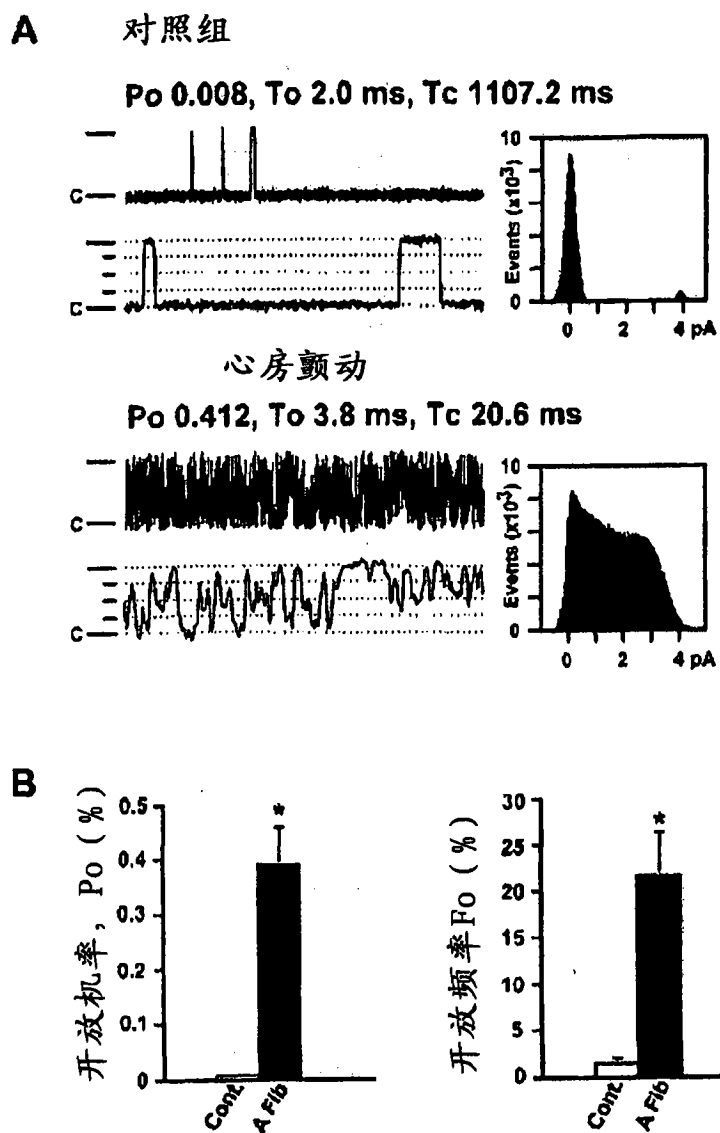


图 10

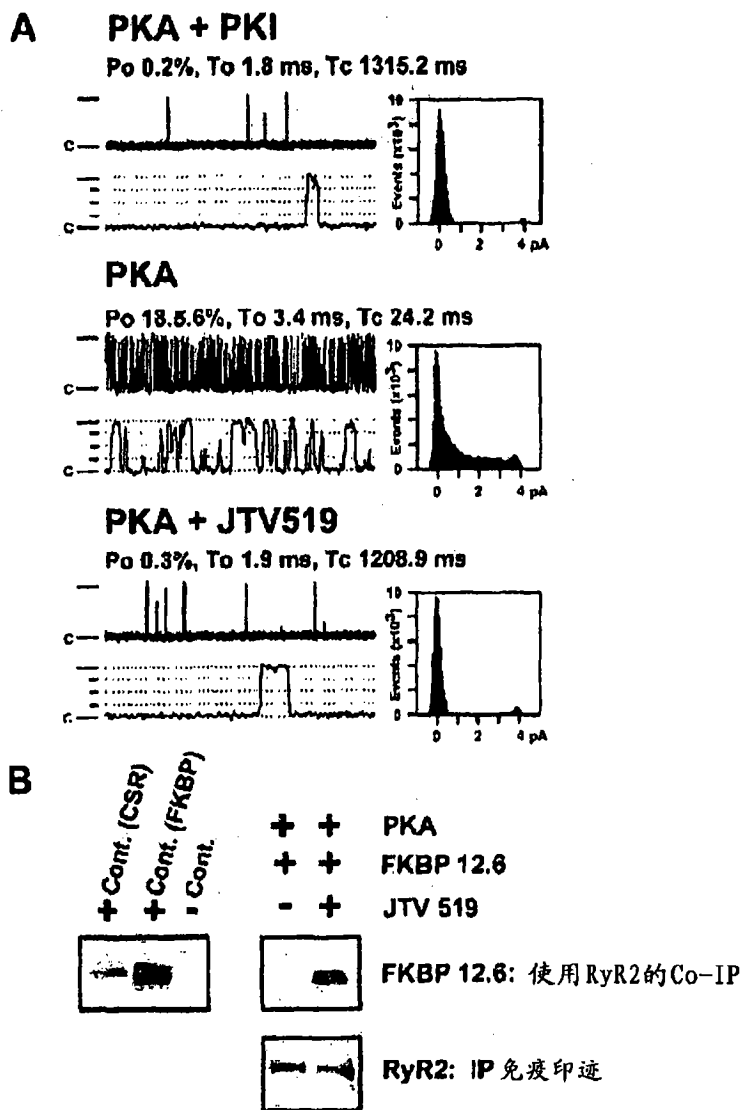


图 11

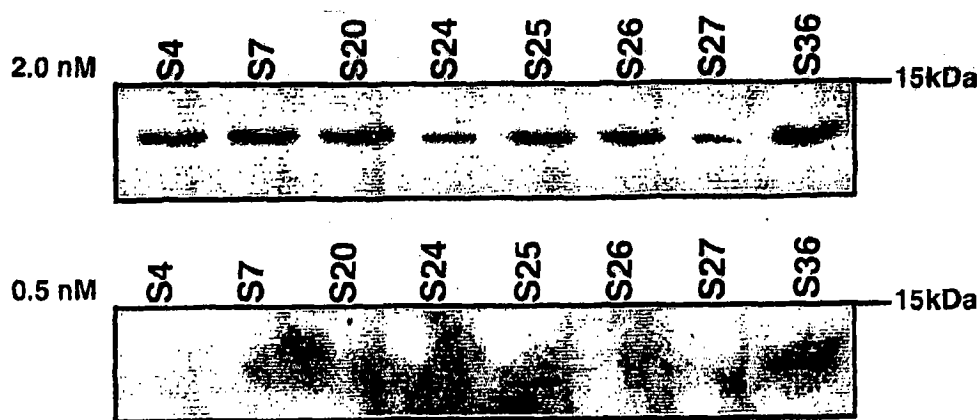


图 12

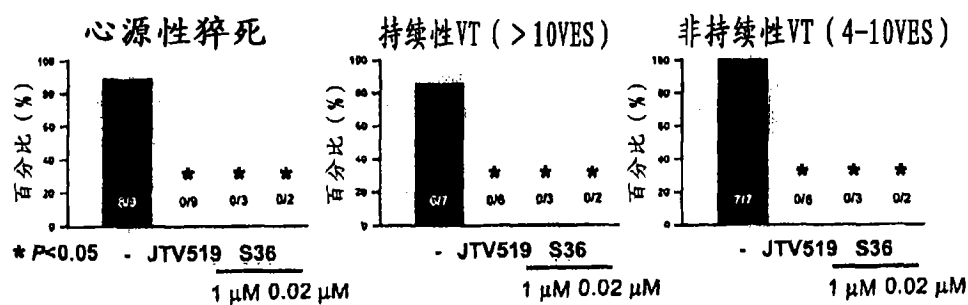


图 13

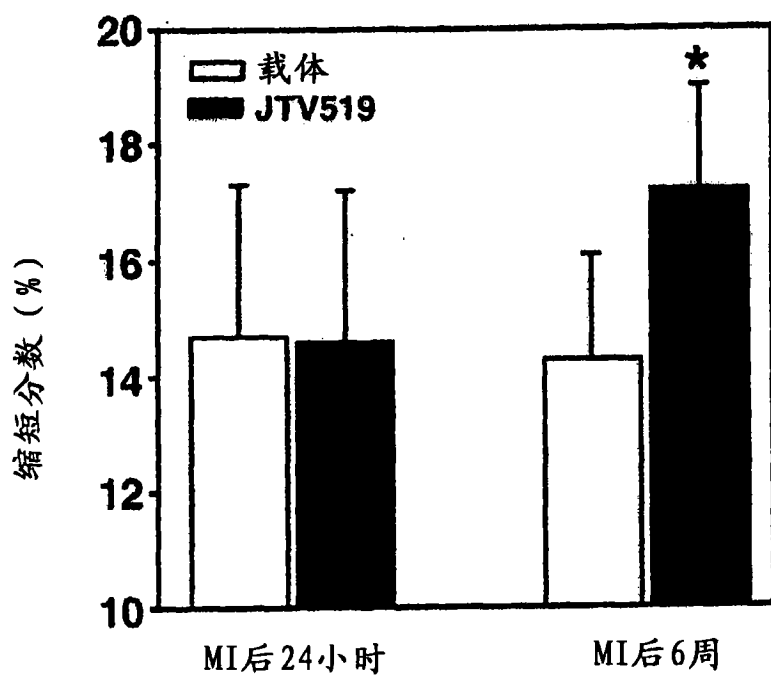


图 14

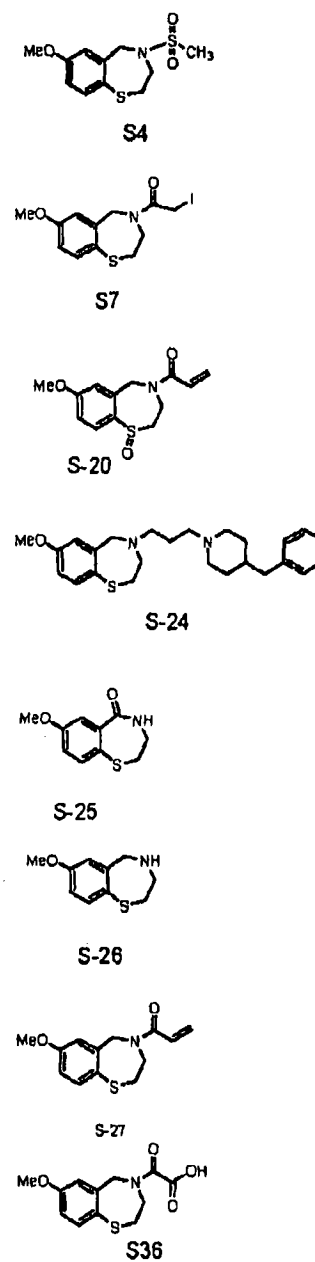


图 15