

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-507536

(P2007-507536A)

(43) 公表日 平成19年3月29日(2007.3.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/554 (2006.01)	A 6 1 K 31/554	4 C 0 3 6
C 0 7 D 281/10 (2006.01)	C 0 7 D 281/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	4 H 0 3 9
C 0 7 B 61/00 (2006.01)	C 0 7 B 61/00 3 0 0	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

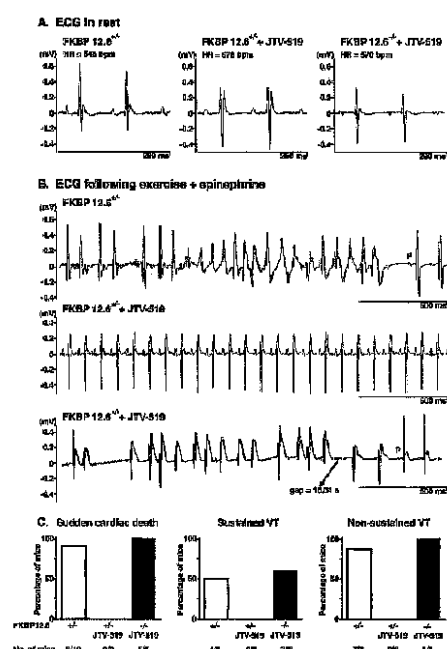
(21) 出願番号	特願2006-534204 (P2006-534204)	(71) 出願人	506118526
(86) (22) 出願日	平成16年10月4日 (2004. 10. 4)		ザ トラスティーズ オブ コロンビア
(85) 翻訳文提出日	平成18年6月7日 (2006. 6. 7)		ユニヴァーシティ イン ザ シティ オブ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/032550		ニューヨーク
(87) 国際公開番号	W02005/037195		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0
(87) 国際公開日	平成17年4月28日 (2005. 4. 28)		2 7 ニューヨーク ウェスト ワンハン
(31) 優先権主張番号	10/680, 988		ドレッドアンドシックスティーンズ スト
(32) 優先日	平成15年10月7日 (2003. 10. 7)		リート 5 3 5 ロー ライブラリー 4
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1 2 メール コード 4 3 0 8
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 稲田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 運動誘発性心不整脈の治療及び予防のための化合物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止する方法、対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防する方法、及び対象者の運動誘発性突然心臓死を予防する方法を提供する。また、これらの方法におけるJTV-519の使用も提供する。更に、本発明は、運動誘発性突然心臓死の予防において使用する薬剤の同定方法、並びにそのような方法により同定した薬剤も提供する。また、これらの薬剤を投与することによる運動誘発性突然心臓死の予防方法も提供する。更に、本発明は、JTV-519、放射能標識JTV-519、並びに1,4-ベンゾチアゼピン中間体及び誘導体の合成方法も提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

運動誘発性心不整脈の候補である対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止する方法であって、該対象者に、該対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止するのに有効な量のJTV-519を投与することを特徴とする方法。

【請求項 2】

RyR2結合FKBP12.6レベルの低下を、前記対象者において、前記対象者のリン酸化RyR2レベルを低下させることによって抑制又は防止する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記対象者が、ヒトである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 4】

前記対象者が、カテコールアミン作用性多源性心室頻拍(CPVT)を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止するのに有効なJTV-519の量が、前記対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防するのに有効なJTV-519の量である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

JTV-519により、前記対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防する、請求項 5 記載の方法。

20

【請求項 7】

前記対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止するのに有効なJTV-519の量が、前記対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効なJTV-519の量である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

JTV-519により、前記対象者の運動誘発性突然心臓死を予防する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止するのに有効なJTV-519の量が、約5 mg/kg/日～約20 mg/kg/日である、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 10】

運動誘発性心不整脈の候補である対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止する方法におけるJTV-519の使用。

【請求項 11】

JTV-519を、対象者に、該対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防するのに有効な量で投与することを特徴とする、対象者の運動誘発性心不整脈の治療又は予防方法。

【請求項 12】

前記心不整脈が、カテコールアミン作用性多源性心室頻拍(CPVT)に関連する、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

40

前記対象者が、運動誘発性突然心臓死の候補である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 14】

前記対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は防止するのに有効なJTV-519の量が、約5 mg/kg/日～約20 mg/kg/日である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

対象者の運動誘発性心不整脈の治療又は予防方法におけるJTV-519の使用。

【請求項 16】

JTV-519を、対象者に、対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することを特徴とする、対象者の運動誘発性突然心臓死の予防方法。

【請求項 17】

50

前記運動誘発性突然心臓死が、カテコールアミン作用性多源性心室頻拍(CPVT)に関連する、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効なJTV-519の量が、約5 mg/kg/日～約20 mg/kg/日である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

運動誘発性突然心臓死を予防するのに使用する薬剤の同定方法であって、下記の工程、

(a) RyR2を含有する細胞の培養物を取得する又は生成させる工程、

(b) 前記細胞を候補薬剤と接触させる工程、

(c) 前記細胞を細胞内のRyR2リン酸化を増大させることが知られている1以上の条件に暴露させる工程、及び、

(d) 前記薬剤が前記細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止しているかどうかを判定する工程、
を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 20】

(e) 前記薬剤が前記細胞内のRyR2関連生物学的事象に対する作用を有するかどうかを判定する工程を更に含む、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

請求項 19 記載の方法によって同定した薬剤。

20

【請求項 22】

請求項 21 記載の薬剤を、対象者に、対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することを特徴とする、対象者の運動誘発性突然心臓死の予防方法。

【請求項 23】

運動誘発性突然心臓死を予防するのに使用する薬剤の同定方法であって、下記の工程、

(a) RyR2を含有する動物を取得する又は産生させる工程、

(b) 候補薬剤を前期動物に投与する工程、

(c) 前記動物を細胞内のRyR2リン酸化を増大させることが知られている1以上の条件に暴露させる工程、及び、

(d) 前記薬剤が前記動物内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止しているかどうかを判定する工程、
を含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 24】

(e) 前記薬剤が前記動物内のRyR2関連生物学的事象に対する作用を有するかどうかを判定する工程を更に含む、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

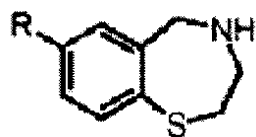
請求項 23 記載の方法によって同定した薬剤。

【請求項 26】

下記の式、

40

【化 1】

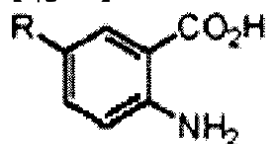


(式中、R = OR'、SR'、NR'、アルキル又はハライドであり；R' = アルキル、アリール又はHであり、Rは、位置2、3、4又は5にあり得る)

を有する化合物の合成方法であって、下記の工程、

(a) 下記の式、

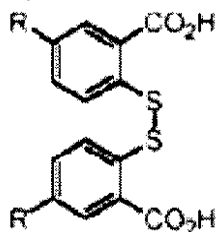
【化 2】



(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物をジアゾ化剤及びジスルフィドで処理して、下記の式、

【化 3】



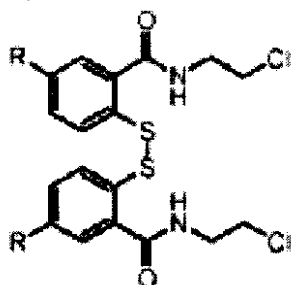
10

(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

(b) 工程(a)で調製した化合物をクロライド及びクロロエチルアミンで処理して、下記の式、

【化 4】



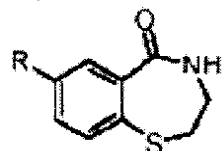
20

(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

(c) 工程(b)で調製した化合物を、テトラヒドロレートの存在下に、還元剤及び塩基で処理して、下記の式、

【化 5】



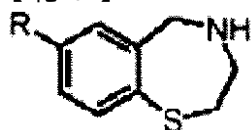
30

(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

(d) 工程(c)で調製した化合物を還元剤で処理して、下記の式、

【化 6】



40

(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

50

工程(a)におけるジアゾ化剤が NaNO_2 である、請求項26記載の方法。

【請求項28】

工程(a)におけるジスルフィドが Na_2S_2 である、請求項26記載の方法。

【請求項29】

工程(b)におけるクロライドが SOCl_2 である、請求項26記載の方法。

【請求項30】

工程(c)における還元剤が、トリメチルホスフィン(PMe_3)である、請求項26記載の方法。

【請求項31】

工程(c)における塩基が、トリエチルアミンである、請求項26記載の方法。

10

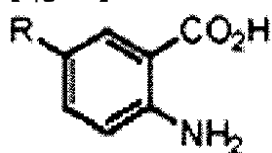
【請求項32】

工程(d)における還元剤が、 LiAlH_4 である、請求項26記載の方法。

【請求項33】

下記の式、

【化7】



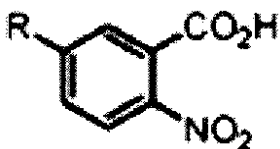
20

(式中、 $\text{R} = \text{OR}'$ 、 SR' 、 NR' 、アルキル又はハライドであり； $\text{R}' = \text{アルキル}$ 、 アリール 又は H であり、 R は、位置2、3、4又は5にあり得る)

を有する工程(a)における化合物を、下記の工程、

(e) 下記の式、

【化8】

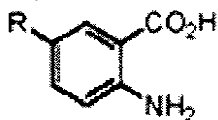


30

(R は、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を、任意成分としての触媒の存在下に、還元剤で処理して、下記の式、

【化9】



(R は、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

を含む方法によって合成する、請求項26記載の方法。

40

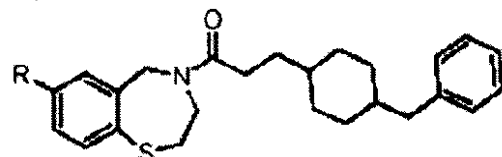
【請求項34】

工程(e)における還元剤が H_2 である、請求項33記載の方法。

【請求項35】

下記の式、

【化10】



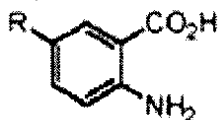
50

(式中、 $R = OR', SR', NR'$ 、アルキル又はハライドであり、 $R' =$ アルキル、アリール又はHであり、 R は、位置2、3、4又は5に有り得る)

を有する化合物の合成方法であって、下記の工程、

(a) 下記の式、

【化11】

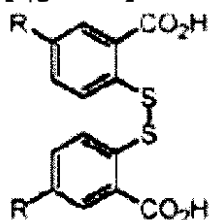


(R は、上記で定義したとおりである)

10

を有する化合物をジアゾ化剤及びジスルフィドで処理して、下記の式、

【化12】



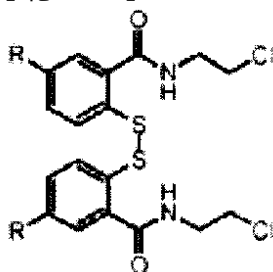
(R は、上記で定義したとおりである)

20

を有する化合物を調製する工程、

(b) 工程(a)で調製した化合物をクロライド及びクロロエチルアミンで処理して、下記の式、

【化13】



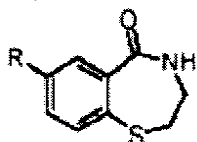
30

(R は、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

(c) 工程(b)で調製した化合物を、テトラヒドロレート存在下に、還元剤及び塩基で処理して、下記の式、

【化14】



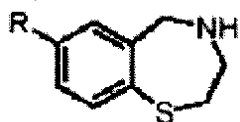
40

(R は、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

(d) 工程(c)で調製した化合物を還元剤で処理して、下記の式、

【化15】



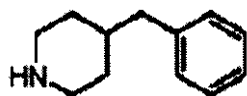
(R は、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程、

50

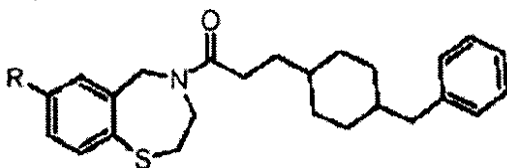
(e) 工程(d)で調製した化合物を、3-ブロモプロピオン酸クロライド及び下記の式、

【化16】



を有する化合物で処理して、下記の式、

【化17】



10

(Rは、上記で定義したとおりである)

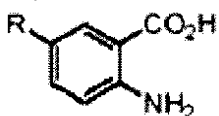
を有する化合物を調製する工程、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項36】

下記の式、

【化18】



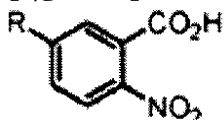
20

(式中、R = OR', SR', NR', アルキル又はハライドであり ; R' = アルキル、アリール又はHであり、Rは、位置2、3、4又は5にあり得る)

を有する工程(a)における化合物を、下記の工程、

(f) 下記の式、

【化19】

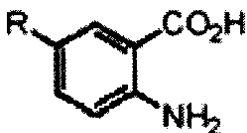


30

(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を、任意成分としての触媒の存在下に、還元剤で処理して、下記の式、

【化20】



(Rは、上記で定義したとおりである)

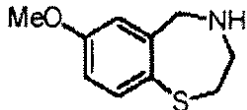
を有する化合物を調製する工程、

を含む方法によって合成する、請求項35記載の方法。

【請求項37】

下記の式、

【化21】



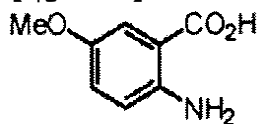
40

を有する化合物の合成方法であって、下記の工程、

(a) 下記の式、

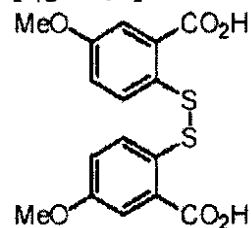
50

【化 2 2】



を有する化合物をジアゾ化剤及びジスルフィドで処理して、下記の式、

【化 2 3】

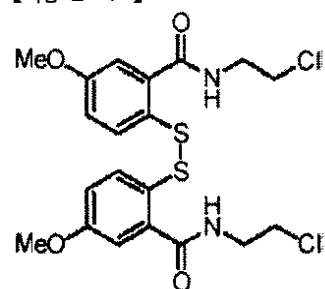


10

を有する化合物を調製する工程、

(b) 工程(a)で調製した化合物をクロライド及びクロロエチルアミンで処理して、下記の式、

【化 2 4】

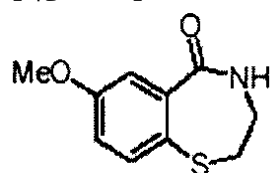


20

を有する化合物を調製する工程、

(c) 工程(b)で調製した化合物を、テトラヒドロレートの存在下に、還元剤及び塩基で処理して、下記の式、

【化 2 5】

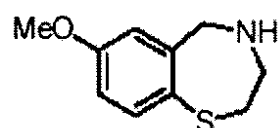


30

を有する化合物を調製する工程、

(d) 工程(c)で調製した化合物を還元剤で処理して、下記の式、

【化 2 6】



40

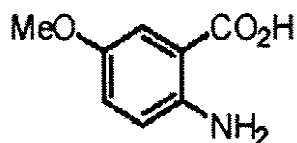
を有する化合物を調製する工程、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 3 8】

下記の式、

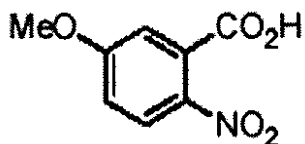
【化 2 7】



を有する工程 (a) における化合物を、下記の工程、

(e) 下記の式、

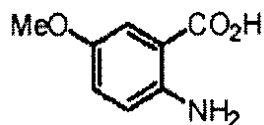
【化 2 8】



10

を有する化合物を、任意成分としての触媒の存在下に、還元剤で処理して、下記の式、

【化 2 9】



20

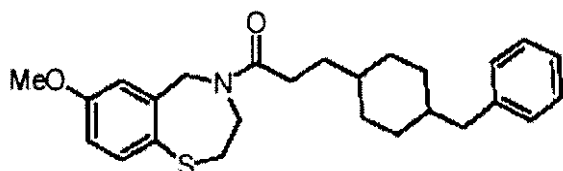
を有する化合物を調製する工程、

を含む方法によって合成する、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

下記の式：

【化 30】

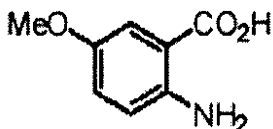


30

を有する化合物の合成方法であって、下記の工程、

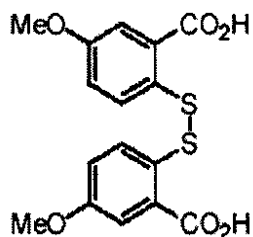
(a) 下記の式、

【化 3 1】



を有する化合物をジアゾ化剤及びジスルフィドで処理して、下記の式、

【化 3 2】

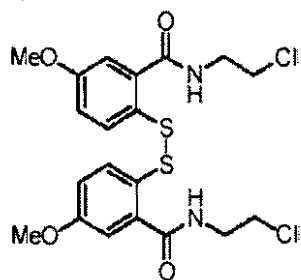


40

を有する化合物を調製する工程、

(b) 工程 (a) で調製した化合物をクロライド及びクロロエチルアミンで処理して、下記の式、

【化 3 3】

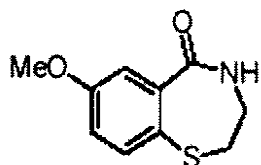


を有する化合物を調製する工程、

10

(c) 工程(b)で調製した化合物を、テトラヒドロレートの存在下に、還元剤及び塩基で処理して、下記の式、

【化 3 4】

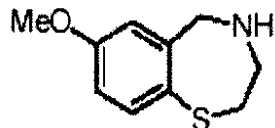


を有する化合物を調製する工程、

20

(d) 工程(c)で調製した化合物を還元剤で処理して、下記の式、

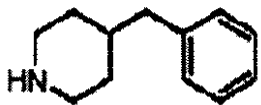
【化 3 5】



を有する化合物を調製する工程、

(e) 工程(d)で調製した化合物を、3-ブロモプロピオン酸クロライド及び下記の式、

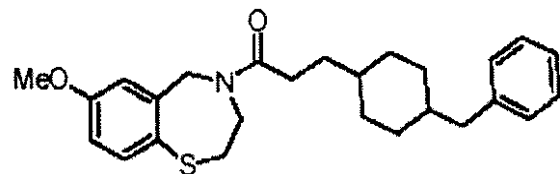
【化 3 6】



30

を有する化合物で処理して、下記の式、

【化 3 7】



を有する化合物を調製する工程、

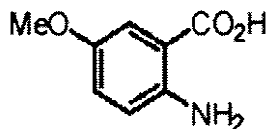
40

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 4 0】

下記の式、

【化 3 8】

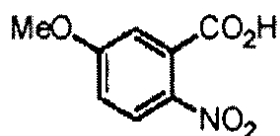


を有する工程(a)における化合物を、下記の工程、

(f) 下記の式、

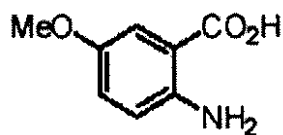
50

【化 3 9】



を有する化合物を、任意成分としての触媒の存在下に、還元剤で処理して、下記の式、

【化 4 0】



10

を有する化合物を調製する工程、

を含む方法によって合成する、請求項 3 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(関連出願)

本出願は、2002年12月3日に発行された現在の米国特許第6,489,125 B1号である2000年5月10日に出願された米国特許出願第09/568,474号の継続出願である2002年11月5日に出願された米国特許出願第10/288,606号の1部継続出願である2003年6月26日に出願された米国特許第10/608,723号の1部継続出願である。これら出願の内容は、参考として本明細書に合体させる。

20

(政府権利についての声明)

本発明は、NIH Grant No. P01 HL 67849-01の下に、政府助成によりなされた。従って、米国政府は、本発明においてある種の権利を有する。

【0 0 0 2】

(背景技術)

心不全は、世界的に死亡及び疾病の主要原因である。心不全のより重篤な症例(New York Heart Association クラスIV)においては、2年間死亡率は、50%を上回っている(Braunwald, E.B., Heart Disease, 4th ed. (Philadelphia:W.B. Saunders Co., 1992))。心不全の一般的特徴である心不整脈は、該疾患に関連した多くの死亡をもたらしている。詳細には、心疾患を有する全患者数のおよそ50%が致死性心不整脈により死亡している。心臓内のある種の心室性不整脈は、速やかに死に至る(“突然心臓死”(SCD)と称される現象)。しかしながら、致死性心室性不整脈は、構造的な心疾患を有することに気付いていない若年の本来であれば健常な個々人においても生じ得る。事実、心室性不整脈は、本来であれば健常な個々人における突然死の最も一般的な原因である。

30

カテコールアミン作用性多源性心室頻拍(CPVT)は、構造的に正常な心臓を有する個々人における遺伝性疾患である。CPVTは、ストレス誘発性心室頻拍(突然心臓死を起し得る致死性不整脈)に特徴を有する。CPVTを有する対象者においては、身体運動及び/又はストレスにより、検出し得る構造的な心疾患の不存在においてSCDに至る双方向性及び/又は多形性心室頻拍が誘発される(Laitinen et al., Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103: 485-90, 2001; Leenhardt et al., Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children: a 7-year follow-up of 21 patients. Circulation, 91:1512-19, 1995; Priori et al., Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 106:69-74, 2002; Priori et al., Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103:196-200, 2001; Swan et al., Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. J. A

40

50

m. Coll. Cardiol., 34:2035-42, 1999)。CPVTは、常染色体優性型の優性遺伝である。CPVTを有する個々人は、運動をしなければならないときに心室性不整脈を有するが、安静時には不整脈を発症しない。関連研究及び直接のシーケンシングにより、CPVTを有する個々人の染色体1q42-q43においてヒトRyR2遺伝子の突然変異が同定されている(Laitinen et al., Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103:485-90, 2001; Priori et al., Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Circulation, 103:196-200, 2001; Swan et al., Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. J. Am. Coll. Cardiol., 34:2035-42, 1999)。

【0003】

心不全は、危険臓器の灌流低下に至る心筋の収縮機能の進行性疾患に特徴を有する。心筋及び他の横紋筋の収縮は、カルシウム(Ca^{2+})が筋小胞体(SR)から周辺細胞質に放出されたときに開始される。リアノジンレセプター(RyR)類のような、SR上のカルシウム放出チャンネルは、興奮収縮(EC)連関(即ち、活動電位と筋細胞収縮との連関)において必要とする。3つのタイプのリアノジンレセプターが存在し、これらの全てが高関連性の Ca^{2+} チャンネルである：RyR1、RyR2、及びRyR3。RyR1は骨格筋において見出され、RyR2は心臓において見出され、RyR3は脳内に位置する。タイプ2のリアノジンレセプター(RyR2)は、EC連関及び心臓横紋筋の筋収縮において必要とする主要 Ca^{2+} 放出チャンネルである。

RyR2チャンネルは、 Ca^{2+} の細胞内貯蔵を放出するSRの特定領域内の濃密アレー中に包み込まれており、それによって筋収縮を誘発させる(Marx et al., Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). Science, 281:818-21, 1998)。EC連関中、心筋細胞膜の脱分極が、活動電位のゼロ段階において、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを活性化する。引続き、これらのチャンネルを通る Ca^{2+} 流入は、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出として知られる過程において、SRからRyR2を介して Ca^{2+} 放出を開始させる(Fabiato, A., Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol., 245:C1-C14, 1983; Nabauer et al., Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. Science, 244:800-03, 1989)。その後、RyR2介在、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出は、心筋収縮に關与する収縮タンパク質を活性化する。

【0004】

RyR2は、4個の565,000ダルトンRyR2ポリペプチドを4個の12,000ダルトンFK506結合性タンパク質(FKBP)、とりわけFKBP12.6タンパク質と一緒に含むタンパク質複合体である。FKBP類は、広範囲に発現して種々の細胞機能を奏するシス-トランスペプチジル-プロリルイソメラーゼ類である(Marks, A.R., Cellular functions of immunophilins. Physiol. Rev., 76:631-49, 1996)。FKBP12タンパク質類は、骨格リアノジンレセプター、RyR1 (Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77:513-23, 1994; Jayaraman et al., FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). J. Biol. Chem., 267:9474-77, 1992); 心臓リアノジンレセプター、RyR2 (Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels from cardiac muscle. Circ. Res., 78:990-97, 1996); タイプ1イノシトール1,4,5-トリホスフェートレセプター(IP3R1)として知られる関連細胞内 Ca^{2+} -放出チャンネル(Cameron et al., FKBP12 binds the inositol 1,4,5-triphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. J. Biol. Chem., 272:27582-88, 1997); 及びタイプI形質転換成長因子(TGF β)レセプター(TRI)(Chen et al., Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. EMBO J, 16:3866-76, 1997)の機能に密接に関連して、該機能を調節する。FKBP12.6は、RyR2チャンネルに結合し(RyR2サブユニット当り1分子)、RyR2チャンネル機能を安定化させ(Brillantes et al., Stab

ilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77:513-23, 1994)、近隣RyR2チャンネル間の連関門通を容易にし (Marx et al., Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281:818-21, 1998)、それによって心臓サイクルの静止期におけるチャンネルの異常活性化を阻止する。

【 0 0 0 5 】

心不全(例えば、心不全を有する患者及び心不全の動物モデルにおける)は、慢性アドレナリン亢進刺激を含む不適応応答に特徴を有する (Bristow et al., Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N.Eng.J Med*, 307: 205-11, 1982)。心不全におけるこの刺激の病源的意義は、 β -アドレナリン刺激及び左心室心筋壁ストレスを低下させて心室リモデリングを強力に逆転させる治療方法によって裏付けされている (Barbone et al., Comparison of right and left ventricular responses to left ventricular assist device support in patients with severe heart failure: a primary role of mechanical unloading underlying reverse remodeling. *Circulation*, 104: 670-75, 2001; Eichhorn and Bristow, Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure. *Circulation*, 94: 2285-96, 1996)。心不全においては、慢性 β -アドレナリン刺激は心臓内の β -アドレナリンレセプターの活性化に関連し、該レセプターは、G-タンパク質との連関により、アデニルシクラーゼを活性化し、それによって細胞内cAMP濃度を増大させる。cAMPは、RyR2の過剰リン酸化を誘発させることが証明されているcAMP依存性タンパク質キナーゼ(PKA)を活性化させる。

RyR2の過剰リン酸化は、心不全における収縮機能低下及び不整脈原性に寄与する要因として提案されている (Marks et al., Progression of heart failure: is protein kinase a hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation*, 105: 272-75, 2002; Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76, 2000)。この仮説と一致して、心不全におけるRyR2のPKA過剰リン酸化は、動物モデル及び心臓移植を受けた心不全患者の双方において、生体内で実証されている (Antos et al., Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A. *Circ.Res.*, 89: 997-1004, 2001; Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76, 2000; Ono et al., Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal $\text{Ca}^{(2+)}$ release in heart failure. *Cardiovasc. Res.*, 48: 323-31, 2000; Reiken et al., Beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure. *Circulation*, 104: 2843-48, 2001; Semsarian et al., The L-type calcium channel inhibitor diltiazem prevents cardiomyopathy in a mouse model. *J. Clin. Invest.*, 109:1013-20, 2002; Yano et al., Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal $\text{Ca}^{(2+)}$ leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation*, 102: 2131-36, 2000)。

【 0 0 0 6 】

心不全においては、PKAによるRyR2の過剰リン酸化は、RyR2チャンネルからの調節FKBP12.6サブユニットの解離を誘発させる (Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76, 2000)。このことは、RyR2チャンネルの生理学的特性に顕著な変化をもたらす。そのような変化は、 Ca^{2+} 依存性活性化に対する感受性増大に基づく開確率(P_o)の増大 (Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77: 513-23, 1994; Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{(2+)}$ -releas

e channels from cardiac muscle. *Circ. Res.*, 78: 990-97, 1996); 伝導性低下(subconductance)状態をもたらす上記チャンネルの不安定化; 及びEC連関欠陥及び心機能異常をもたらす上記チャンネルの連関門通欠損(Marx et al., Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*, 281: 818-21, 1998)によって証明されている。即ち、PKA過剰リン酸化RyR2は低レベルの Ca^{2+} 刺激に対して極めて感受性であり、このこと自体が過剰リン酸化チャンネルによる SRCa^{2+} 漏出を明示している。

構造的に正常な心臓においては、同様な現象が活動中に生じ得る。とりわけ、運動及びストレスが、心臓内で β -アドレナリンレセプターを活性化させるカテコールアミンの放出を誘発させることは知られている。 β -アドレナリンレセプターの活性化は、RyR2チャンネルの過剰リン酸化をもたらす。更にまた、証拠により、 β -アドレナリンレセプター活性化に由来するRyR2の過剰リン酸化は変異RyR2チャンネルを心臓サイクルの弛緩期において更に一層開放せしめ、不整脈の可能性を増大させることが示唆されている。

10

【0007】

心不整脈は、構造的に正常な心臓における SRCa^{2+} 漏出と関連することが知られている。これらの場合、心室性頻拍の誘発及び持続の最も一般的なメカニズムは、異常自動性である。誘発性不整脈として知られる1つの形の異常自動性は、遅延後脱分極(DAD)を開始させる SRCa^{2+} の異常放出と関連している(Fozzard, H.A., Afterdepolarizations and triggered activity. *Basic Res. Cardiol.*, 87: 105-13, 1992; Wit and Rosen, Pathophysiologic mechanisms of cardiac arrhythmias. *Am. Heart J.*, 106: 798-811, 1983)。DADは、致死性心室性不整脈を誘発し得、心臓活動電位の再分極後に生じる心筋細胞内の異常脱分極である。DADをもたらす異常SR Ca^{2+} 放出についての分子的根拠は、完全には解明されていない。しかしながら、DADは、リアノジンにより阻止されることが知られており、RyR2がこの異常 Ca^{2+} 放出の病因において主要な役割を果たし得る証拠を示している(Marban et al., Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle. *J. Clin. Invest.*, 78: 1185-92, 1986; Song and Belardinelli, ATP promotes development of afterdepolarizations and triggered activity in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, 267: H2005-11, 1994)。

20

上記に照らして、RyR2チャンネルにおける漏出が多くの病理状態(疾患性心臓及び構造的に正常な心臓の双方における)に関連していることは明白である。従って、RyR2における漏出を修復させる方法は、何百万もの患者における致死性不整脈を予防し得る。

30

1,4-ベンゾチアゼピンの誘導体であるJTV-519 (4-[3-(4-ベンジルピペリジン-1-イル)プロピオニル]-7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンモノヒドロクロライド; k201としても知られている)は、カルシウムイオンチャンネルの新たなモジュレーターである。心筋細胞中の Ca^{2+} レベルの調節以外に、JTV-519は、モルモット心室細胞内の Na^+ 電流及び内向き整流 K^+ 電流も調節し、モルモット心房細胞内の整流 K^+ 電流遅延を抑制する。研究により、JTV-519がカテコールアミン誘発性心筋損傷、心筋損傷誘発性筋細線維過収縮、及び虚血/再灌流損傷に対する強力な心臓保護作用を有することが証明されている。実験筋細線維過収縮モデルにおいては、JTV-519は、プロプラノロール、ベラパミル及びジルチアゼムよりも大きい心臓保護作用を示していた。また、実験データは、JTV-519が、動物モデルにおいて細胞内 Ca^{2+} 過負荷レベルを低下させることによって心室虚血/再灌流を有効に予防することを示唆している。

40

【0008】

(発明の開示)

本発明は、RyR2が運動誘発性突然心臓死(SCD)を引き起こす心不整脈を予防するためのターゲットであるという驚くべき発見に基づく。本明細書において説明するように、本発明者等は、7種のCPVT変異による変異体RyR2チャンネルを調製し、それらの機能を試験した。7種の変異体全てが、運動中に刺激したとき、漏出性(SRカルシウム漏出)となるチャンネル内に生じた機能欠陥を有していた。本発明者等の研究は、先ず第1に、SRカルシウム漏出がDADを引き起こすメカニズムを特定することである。注目すべきことに、変異体CPVTチャ

50

ンネルにおける欠陥は、該チャンネルを末期心不全(致死性心不整脈の高発生率に特徴を有する障害)を有する患者の心臓内の漏出性チャンネルであるかのようにしていた。従って、本発明者等は、本明細書において、CPVTにおけるVTについてのメカニズムが心不全におけるVTについてのメカニズムと同じであることを実証する。

また、本発明者等は、本明細書において、1,4-ベンゾチアゼピン化合物群の1員である薬物JTV-519 (k201)がRyR2チャンネル内の漏出を修復することを開示する。本発明者等が本明細書において証明するように、JTV-519は、FKBP12.6のPKAリン酸化RyR2に対する結合性及び他方でFKBP12.6に対して低減した親和性を有するか又は結合しない変異体RyR2に対する結合性を増強する。JTV-519のこの作用は、致死性心不整脈(心臓死)を誘発し且つ心不全における心筋機能障害に寄与するRyR2内の漏出を固定する。更に、本発明者等は、JTV-519の新規な合成法、並びに該薬物の放射能標識形も開発している。 10

従って、1つの局面においては、本発明は、運動誘発性心不整脈の候補である対象者に該対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を防止するのに有効な量のJTV-519を投与することによる、上記対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止する方法を提供する。また、運動誘発性心不整脈の候補である対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は防止する方法におけるJTV-519の使用も提供する。

【0009】

もう1つの局面においては、本発明は、対象者にJTV-519を対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防するのに有効な量で投与することによる、対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防する方法を提供する。また、対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防する方法におけるJTV-519の使用も提供する。 20

更にもう1つの局面においては、本発明は、対象者にJTV-519を対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することによる、対象者の運動誘発性突然心臓死を予防する方法を提供する。また、対象者の運動誘発性突然心臓死を予防する方法におけるJTV-519の使用も提供する。

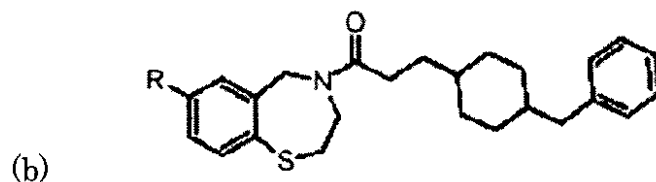
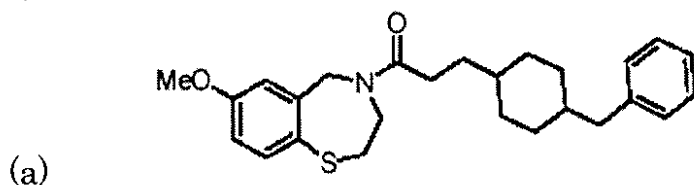
更にもう1つの局面においては、本発明は、(a) RyR2を含有する細胞の培養物を取得し又は生成させ；(b) 上記細胞を候補薬剤と接触させ；(c) 上記細胞を細胞内のRyR2リン酸化を増大させることが知られている1以上の条件に暴露させ；そして、(d) 上記薬剤が前記細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を阻止しているかどうかを判定することによる、運動誘発性突然心臓死を予防するのに使用する薬剤の同定方法を提供する。該方法は、(e) 前記薬剤が前記細胞内のRyR2関連生物学的事象に対する作用を有するかどうかを判定する工程を更に含み得る。また、上記方法によって同定した薬剤、並びに該薬剤を対象者に対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することによる、対象者の運動誘発性突然心臓死を予防する方法も提供する。 30

さらなる局面においては、本発明は、(a) RyR2を含有する動物を取得し又は産生させ；(b) 候補薬剤を上記動物に投与し；(c) 上記動物を細胞内のRyR2リン酸化を増大させることが知られている1以上の条件に暴露させ；そして、(d) 上記薬剤が前記動物内のRyR2とFKBP12.6間の結合を増大させているかどうかを判定することによる、運動誘発性突然心臓死を予防するのに使用する薬剤の同定方法を提供する。該方法は、(e) 前記薬剤が前記動物内のRyR2関連生物学的事象に対する作用を有するかどうかを判定する工程を更に含み得る。また、上記方法によって同定した薬剤、並びに該薬剤を対象者に対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することによる、対象者の運動誘発性突然心臓死を予防する方法も提供する。 40

【0010】

更にもう1つの局面においては、本発明は、下記のようなJTV-519並びの1,4-ベンゾチアゼピン中間体及び誘導体の合成方法を提供する：

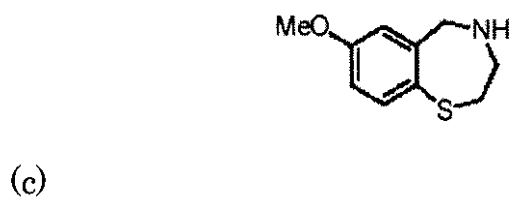
【化 1】



10

(式中、 $R = OR'$ 、 SR' 、 NR' 、アルキル又はハライドであり； $R' =$ アルキル、アリール又はHであり；Rは、位置2、3、4又は5にあり得る)；

【化 2】



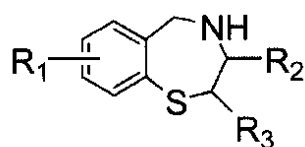
20



(式中、 $R = OR'$ 、 SR' 、 NR' 、アルキル又はハライドであり； $R' =$ アルキル、アリール又はHであり；Rは、位置2、3、4又は5にあり得る)；

30

【化 3】



(式中、 $R_1 = n\text{-MeO}$ 、 $n\text{-MeS}$ 又は $n\text{-アルキル}$ であり、 $n = 6$ 、 7 、 8 又は 9 であり； $R_2 =$ アルキルであり； $R_3 =$ アルキルである)。

40

さらなる局面においては、本発明は、放射能標識JTV-519の合成方法も提供する。

本発明のさらなる局面は、以下の説明に照らして明らかとなるであろう。

【0011】

(発明を実施するための最良の形態)

上述したように、カテコールアミン作用性多源性心室頻拍(CPVT)は、構造的に正常な心臓を有する個々人における遺伝子性疾患である。CPVTは、ストレス誘発性心室頻拍、即ち、突然心臓死(SCD)を起し得る致死性不整脈に特徴を有する。筋小胞体上に位置するRyR2チャンネルの変異は、CPVTに関連している。CPVTにおける致死性心不整脈の基礎をなす分子メカニズムを判定するために、本発明者等は、CPVT関連変異体RyR2チャンネル(例え

50

ば、S2246L、R2474S、N4104K、R4497C)を試験した。

CPVTを有する個々人は、全て運動誘発性心不整脈を有する。本発明者等は、以前に、運動誘発性不整脈及び突然死(CPVTを有する患者における)がRyR2に対するFKBP12.6の親和性低下に由来することを証明した。本明細書において、本発明者等は、運動が、アデノシン3',5'-モノホスフェート(cAMP)依存性タンパク質キナーゼ(PKA)によるリン酸化の結果としてRyR2を活性化することを実証している。変異体RyR2チャンネルは、基本条件下において平面脂質二分子層においては正常機能を有し、PKAリン酸化による活性化に対してより感受性であった(野生タイプチャンネルと比較したとき、増大した活性(開確率)及び長期の開放状態を示した)。更に、PKAリン酸化変異体RyR2チャンネルは、 Mg^{2+} 、即ち、該チャンネルの生理学的インヒビターに対しては抵抗性であり、FKBP12.6(閉鎖状態において該チャンネルを安定化させる)に対して低下した結合性を示していた。これらの知見は、運動中、RyR2がPKAリン酸化されたとき、変異体CPVTチャンネルが心臓サイクルの弛緩期(拡張期)において更に開放するようであり、SR Ca^{2+} 漏出により誘発される不整脈の可能性を増大させることを示唆している。心不全は世界的に主要な死亡原因であるので、RyR2中の漏出を修復する方法は、世界的に何百万もの患者における致死性不整脈を予防し得る。

10

更に、本発明者等は、本明細書において、ベンゾチアゼピン誘導体であるJTV-519が、FKBP12.6遺伝子に対して異型接合性のマウスにおいて、致死性心室性不整脈を予防することを実証している。JTV-519は、PKAリン酸化RyR2に対するFKBP12.6の親和性を増大させることにより、運動後に死亡させたFKBP12.6^{+/+}マウスから分離したRyR2の開確率を低下させていた。更にまた、JTV-519は、FKBP12.6結合親和性を増大させることにより、CPVT関連変異体RyR2チャンネルの門通を正常化させていた。これらのデータは、JTV-519が、FKBP12.6-RyR2結合親和性を増大させることにより、致死性心室不整脈を予防し得ることを示唆している。

20

【0012】

新規な治療及び予防方法

上記に従い、本発明は、対象者の細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止する方法を提供する。本明細書において使用するとき、“FKBP12.6”は、“FKBP12.6タンパク質”及び“FKBP12.6アナログ”の双方を包含する。本明細書において特に断らない限り、“タンパク質”は、タンパク質、タンパク質ドメイン、ポリペプチド又はペプチド、及びこれらの任意のフラグメントを包含する。“FKBP12.6アナログ”は、FKBP12.6タンパク質と60%以上(好ましくは、70%以上)のアミノ酸配列相同性を有する、FKBP12.6生物学的活性を有するFKBP12.6タンパク質の機能性変異体である。更に本明細書において使用するとき、用語“FKBP12.6生物学的活性”とは、本明細書において説明するアッセイ条件下に、未リン酸化又は非リン酸化RyR2と物理的に会合する又は結合する能力(即ち、陰性対照の背景結合性よりもおよそ2倍、より好ましくはおよそ5倍高い結合性)を示すタンパク質又はペプチドの活性を称するが、親和性はFKBP12.6の親和性とは異なり得る。

30

更に、本明細書において使用するとき、“RyR2”は、“RyR2タンパク質”及び“RyR2アナログ”の双方を包含する。“RyR2アナログ”は、RyR2タンパク質と60%以上(好ましくは、70%以上)のアミノ酸配列相同性を有する、RyR2生物学的活性を有するRyR2タンパク質の機能性変異体である。本発明のRyR2は、未リン酸化、リン酸化又は過剰リン酸化し得る。更に本明細書において使用するとき、用語“RyR2生物学的活性”とは、本明細書において説明するアッセイ条件下に、FKBP12.6と物理的に会合する又は結合する能力(即ち、陰性対照の背景結合性よりもおよそ2倍、より好ましくはおよそ5倍高い結合性)を示すタンパク質又はペプチドの活性を称するが、親和性はRyR2の親和性とは異なり得る。

40

【0013】

前述したように、心臓リアノジンレセプター、RyR2は、4個の565,000ダルトンRyR2タンパク質を4個の12,000ダルトンFKBP12.6タンパク質と一緒に含むタンパク質複合体である。FK506結合性タンパク質(FKBP)類は、広範囲に発現して種々の細胞機能を奏するシトランスペプチジル-プロリルイソメラーゼ類である。FKBP12.6タンパク質は、RyR2の機能に密接に関連して、該機能を調節する。FKBP12.6は、RyR2チャンネルに結合し(RyR2サ

50

ブユニット当り1分子)、RyR2チャンネル機能を安定化させ、近隣RyR2チャンネル間の連関門通を容易にし、それによって心臓サイクルの静止期におけるチャンネルの異常活性化を阻止する。従って、本明細書において使用するとき、“RyR2結合FKBP12.6”は、RyR2タンパク質サブユニットに結合させた1分子のFKBP12.6タンパク質又はRyR2のテトラマーと結合しているFKBP12.6のテトラマーを含む。

本発明の方法によれば、対象者の細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの“低下”とは、対象者の細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの検出可能な低下、消失又は減少を称する。そのような低下は、その低下がJTV-519の投与により何らかの形で阻止され、隠蔽され、抑制され、妨害され又は緩和されて(以下で説明するように)、対象者の細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルがそうでないJTV-519が存在しないであろう場合よりも高いような場合に、対象者の細胞内で抑制又は阻止される。 10

対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルは、公知の技術から容易に決定する方法のような標準のアッセイ及び方法(例えば、免疫学的方法、ハイブリッド化分析、免疫沈降法、ウェスタンブロット分析、蛍光画像法、及び/又は放射線検出法等)、並びに本明細書において開示する任意のアッセイ法及び検出法によって検出し得る。例えば、タンパク質は、対象者の細胞から、限定するものではないが、必要に応じての細胞からの抽出(例えば、そのタンパク質を可溶化する清浄剤による)、その後のカラム上でのアフィニティー精製、クロマトグラフィー(例えば、FTLC及びHPLC)、免疫沈降(抗体による)、及び沈降(例えば、イソプロパノール及びTrizolのような試薬による)のような当該技術において公知の標準方法を使用して分離し精製し得る。タンパク質の分離及び精製の後、電気泳動(例えば、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で)を行い得る。対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下、又はその抑制又は阻止は、JTV-519の投与前に検出したRyR2結合FKBP12.6の量(以下で説明する方法に従っての)をJTV-519投与後の適切な時間で検出した量と比較することによって判定し得る。 20

【0014】

本発明の方法においては、対象者の細胞内でのRyR2結合FKBP12.6レベルの低下は、例えば、対象者の細胞内のFKBP12.6とRyR2の解離を抑制することにより、対象者の細胞内のFKBP12.6とRyR2間の結合性を増大させることにより、又は対象者の細胞内のRyR2-FKBP12.6複合体を安定化させることにより抑制又は阻止し得る。本明細書において使用するとき、用語“解離を抑制する”は、対象者の細胞内でのRyR2分子からFKBP12.6サブユニットの物理的解離又は分離を阻害し、減少させ、抑制し、制限し又は阻止すること、或いは対象者の細胞内でのFKBP12.6サブユニットからRyR2分子の物理的解離又は分離を阻害し、減少させ、抑制し、制限し又は阻止することを含む。更に本明細書において使用するとき、用語“結合性を増大させる”は、対象者の細胞内でリン酸化RyR2がFKBP12.6と物理的に結合する能力(例えば、陰性対照の背景結合性よりもおよそ2倍、より好ましくはおよそ5倍高い結合性)を増強し、増大させ又は改善すること、並びに対象者の細胞内でFKBP12.6がリン酸化RyR2と物理的に結合する能力(例えば、陰性対照の背景結合性よりもおよそ2倍、より好ましくはおよそ5倍高い結合性)を増強し、増大させ又は改善することを含む。更に、本発明の方法においては、対象者の細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下は、対象者の細胞内のリン酸化RyR2レベルを直接低下させることにより、又は上記細胞内のリン酸化RyR2レベルを間接的に低下させることにより(例えば、上記細胞内のリン酸化RyR2の機能又はレベルを規制又は調節する酵素(PKAのような)又は他の内生分子をターゲティングすることにより)、抑制又は阻止し得る。好ましくは、細胞内のリン酸化RyR2レベルは、本発明の方法においては、少なくとも10%低下させる。より好ましくは、リン酸化RyR2レベルは、少なくとも20%低下させる。 30 40

【0015】

本発明の方法によれば、RyR2結合FKBP12.6レベルの低下は、対象者、とりわけ対象者の細胞において抑制又は阻止される。本発明の対象者は、両性類、鳥類、魚類、哺乳類及び有袋類のような任意の動物であり得るが、好ましくは哺乳類(例えば、ヒト；ネコ、イヌ、サル、マウス又はラットのような家畜；又は、ウシ又はブタのような経済動物)である 50

。更に、本発明の対象者は、運動誘発性心不整脈の候補である。運動誘発性心不整脈は、対象者が身体運動を経験する間/後に発症する心臓症状(例えば、突然心臓死に至るどれかのような心室細動又は心室頻拍)である。運動誘発性心不整脈の“候補”は、身体運動中/後に心不整脈を発症するリスクにあることが知られている、又はリスクにあると信じられる、又はリスクにある疑いのある対象者である。運動誘発性心不整脈の候補の例としては、限定するものではないが、カテコールアミン作用性多源性心室頻拍(CPVT)を有することが分っている動物/ヒト；CPVTを有する疑いのある動物/ヒト；及び、身体運動中/後に心不整脈を発症するリスクにあることが知られている、又はリスクにあると信じられる、又はリスクにある疑いがあり、且つ運動をしようとしている、今運動している又は丁度運動を終えた動物/ヒトがある。前述したように、CPVTは、構造的に正常な心臓を有する個々人における遺伝性疾患である。CPVTは、ストレス誘発性心室頻拍(突然心臓死を起し得る致死性不整脈)に特徴を有する。CPVTを有する対象者においては、身体活動/ストレスが、検出し得る構造的な心臓疾患なしで突然心臓死(SCD)に至る双方向性及び/又は多形性心室頻拍を誘発する。CPVTを有する個々人は、運動を経験するときに心室不整脈を有するが、安静時には不整脈を発症しない。

10

【0016】

本発明の方法においては、対象者の細胞は、好ましくは、横紋筋細胞である。横紋筋は、収縮性筋原繊維の繰返し単位(サルコメア)が細胞全体に亘って登記的に配列され、光学顕微鏡レベルで観察し得る横又は斜めの筋条痕を生じている筋肉である。横紋筋細胞の例としては、限定するものではないが、随意(骨格)筋細胞及び心筋細胞がある。好ましい実施態様においては、本発明の方法において使用する細胞は、ヒト心筋細胞である。本明細書において使用するとき、用語“心筋細胞”は、心臓の心筋において見出されるもののよう

20

な心筋繊維を含む。心筋繊維は、介在板において末端-末端接合した連続の心筋細胞、即ち、カージオミオサイトの連鎖からなる。これらの介在板は、2種類の細胞接合部を有する：その横部分に沿って延びている膨張デスモソーム、及び間隙接合部(その最大物は介在板の縦部分に沿って存在する)。

本発明の方法においては、RyR2結合FKBP12.6レベルの低下を、対象者にJTV-519を投与することにより、対象者の細胞内で抑制又は阻止する；このことは、対象者の細胞とJTV-519間の接触を可能にもする。JTV-519 (4-[3-(4-ベンジルピペリジン-1-イル)プロピオニル]-7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンモノヒドロクロライド)は、k201としても知られており、1,4-ベンゾチアゼピンの誘導体であり、カルシウムイオンチャンネルのモジュレーターである、心筋細胞中の Ca^{2+} レベルの調節以外に、JTV-519は、モルモット心室細胞内の Na^+ 電流及び内向き整流 K^+ 電流も調節し、モルモット心房細胞内の整流 K^+ 電流遅延を抑制する。FK506及びラパマイシンは、運動誘発性心不整脈の候補である対象者の細胞内でRyR2-FKBP12.6結合性を安定化させる他の化合物を設計するのに使用し得る薬物である。FK506及びラパマイシンは、双方ともFKBP12.6をRyR2から解離させる。これらの薬物と構造的には関連するが反対の作用を有する化合物を設計しスクリーニングすることは可能である。

30

【0017】

本発明の方法においては、JTV-519は、対象者に、JTV-519と製薬上許容し得る担体を含む治療用組成物の形で投与し得る。製薬上許容し得る担体は、組成物の他の成分と適合性である意味において“許容し得”なければならない、その受容者に対し有害であってはならない。本発明において使用する製薬上許容し得る担体は、調合製剤用の物質として使用し、且つ鎮痛剤、緩衝剤、結合剤、崩壊剤、希釈剤、乳化剤、賦形剤、増量剤、流動促進剤、可溶化剤、安定剤、懸濁剤、等張化剤、ビヒクル及び増粘剤として混入させ得る種々の有機又は無機物質から選択する。必要ならば、酸化防止剤、芳香剤、着色剤、風味改良剤、防腐剤及び甘味化剤のような製薬添加剤も添加し得る。許容し得る製薬担体の例としては、なかんずく、カルボキシメチルセルロース、結晶性セルロース、グリセリン、アラビアゴム、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、粉末類、生理食塩水、アルギン酸ナトリウム、スクロース、澱粉、タルク及び水がある。

40

50

本発明の調合製剤は、製薬技術において周知の方法によって調製し得る。例えば、JTV-519は、懸濁液又は溶液として、担体又は希釈剤と一緒にし得る。必要に応じて、1種以上の補助成分(例えば、緩衝剤、風味料、界面活性剤等)も添加し得る。担体の選択は、投与経路による。

JTV-519は、対象者の生体内ターゲット細胞(例えば、心筋細胞)をJTV-519と接触させることにより、対象者に投与し得る。JTV-519は、タンパク質、核酸及び他の薬物の導入及び投与において使用する公知の方法を使用して、対象者の細胞と接触(例えば、細胞に導入)し得る。細胞をJTV-519と接触させる(即ち、細胞をJTV-519により治療する)方法の例としては、限定するものではないが、吸収、エレクトロポレーション、浸漬、注入、導入、リボソーム伝達、移入、輸血、ベクター、並びに他の薬物伝達ビヒクル及び方法がある。ターゲット細胞が対象者の特定部分に局在化されている場合、JTV-519を、注入により又は幾つかの他の方法により(例えば、JTV-519を血液又は他の体液に導入することにより)、直接細胞に導入するのが望ましくあり得る。ターゲット細胞は、対象者の心臓組織中に含有され得、対象者の心臓組織内で、公知の技術から容易に特定される標準検出方法によって検出し得、それら検出方法の例としては、限定するものではないが、免疫学的方法(例えば、免疫組織化学染色法)、蛍光画像法及び顕微鏡法がある。

10

【0018】

更に、本発明のJTV-519は、ヒト又は動物対象者に、限定するものではないが、経口投与、非経口投与及び経皮投与のような公知の手法によって投与し得る。好ましくは、JTV-519は、筋膜上、嚢内、頭蓋内、皮内、鞘内、筋肉内、眼窩内、腹腔内、髄腔内、胸骨内、血管内、静脈内、柔組織内、皮下又は舌下注入により、或いはカテーテルにより、非経口投与する。1つの実施態様においては、該薬剤は、対象者に、対象者の心臓に装入したカテーテルによる心筋細胞へのターゲッティング伝達により投与する。

20

経口投与においては、JTV-519製剤は、カプセル剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤として、又は懸濁液として提供し得る。製剤は、ラクトース、マンニトール、コーンスターチ又はポテトスターチのような通常の添加剤を含み得る。また、製剤は、結晶性セルロース、セルロース誘導体、アカシア、コーンスターチ又はゼラチンのような結合剤によっても提供し得る。更に、製剤は、コーンスターチ、ポテトスターチ又はナトリウムカルボキシメチルセルロースのような崩壊剤によっても提供し得る。また、製剤は、二塩基性リン酸カルシウム無水物又は澱粉グリコール酸ナトリウムによっても提供し得る。最後に、製剤は、タルク又はステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤によっても提供し得る。

30

非経口投与(即ち、消化管以外の経路を介しての注入による投与)においては、JTV-519は、対象者の血液と好ましくは等張性である滅菌水溶液と混合し得る。そのような製剤は、固形活性成分を、塩化ナトリウム、グリシン等のような生理学的に適合し得る物質を含有し且つ生理条件と適合し得る緩衝pHを有する水中に溶解させて水溶液を調製し、その後、該溶液を滅菌性とすることによって調製し得る。製剤は、密封したアンプル又はバイアルのような単位又は多数回投与量容器内で提供し得る。製剤は、限定するものではないが、筋膜上、嚢内、頭蓋内、皮内、鞘内、筋肉内、眼窩内、腹腔内、髄腔内、胸骨内、血管内、静脈内、柔組織内、皮下又は舌下のような任意の注入方式により、或いは対象者の心臓へのカテーテルにより、伝達し得る。

40

【0019】

経皮投与においては、JTV-519は、JTV-519に対する皮膚の浸透性を増大させ且つJTV-519が皮膚を介して血流中に浸透するのを可能にするプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、イソプロパノール、エタノール、オレイン酸、N-メチルピロリドン等のような皮膚浸透エンハンサーと混合し得る。また、JTV-519/エンハンサー組成物は、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、エチレン/酢酸ビニル、ポリビニルピロリドン等のような高分子物質と更に混合してゲル状の組成物を調製し得、この組成物は、塩化メチレンのような溶媒に溶解し、所望粘度まで蒸発させ、その後、裏当て材に塗布してパッチを調製することもできる。

本発明の方法によれば、JTV-519は、対象者中の、とりわけ対象者の細胞中のRyR2結合F

50

KBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止するのに有効な量で、対象者に投与し得る(そして、JTV-519を対象者の細胞と接触させ得る)。この量は、当業者であれば、生体内で確立した滴定曲線の分析のような既知の手順、及び本明細書において説明する方法及びアッセイ法に基づき容易に決定し得ることである。対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止するのに有効なJTV-519の適切な量は、約5 mg/kg/日～約20 mg/kg/日の範囲であり得、及び/又は、約300 ng/ml～約1000 ng/mlの範囲の血漿レベルを達成するのに十分な量であり得る。好ましくは、JTV-519の量は、約10 mg/kg/日～約20 mg/kg/日の範囲である。

。本発明の1つの実施態様においては、対象者は、まだ運動誘発性心不整脈を発症していない。この場合、対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止するのに有効なJTV-519の量は、対象者の運動誘発性心不整脈を予防するのに有効なJTV-519の量である。心不整脈は、心拍又は心臓鼓動の異常として現れる心臓の電氣的活動の障害である。本明細書において使用するとき、“運動誘発性心不整脈を予防するのに有効な”JTV-519の量は、臨床的な障害又は運動誘発性心不整脈の症状(例えば、動悸、失神、心室細動、心室頻拍及び突然心臓死)の発症を予防するのに有効なJTV-519の量を含む。対象者の運動誘発性心不整脈を予防するのに有効なJTV-519の量は、運動誘発性心不整脈のタイプ、対象者の体重、対象者症状の重篤度及びJTV-519の投与方式のような各々の症例の特定の要因によって変動する。この量は、当業者であれば、臨床試験のような既知の手順及び本明細書において説明する方法に基づき容易に決定し得ることである。好ましい実施態様においては、運動誘発性心不整脈を予防するのに有効なJTV-519の量は、対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効なJTV-519の量である。もう1つの好ましい実施態様においては、JTV-519は、対象者の運動誘発性心不整脈及び運動誘発性突然心臓死を予防する。

【0020】

RyR2結合FKBP12.6を安定化し、且つRyR2の動的PKAリン酸化及び脱リン酸化に関するの均衡を維持し再生させるその能力故に、JTV-519は、運動誘発性心不整脈の臨床症状を既に示し始めた対象者の治療においても有効である。不整脈の徴候を対象者において十分に早期に観察した場合、JTV-519は、対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルのさらなる低下を抑制又は阻止するのに有効であり得る。

従って、本発明の更にもう1つの実施態様においては、対象者は、運動していた、今運動中である、そして、運動誘発性心不整脈を発症した。この場合、対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止するのに有効なJTV-519の量は、対象者の運動誘発性心不整脈を治療するのに有効なJTV-519の量である。本明細書において使用するとき、“運動誘発性心不整脈を治療するのに有効な”JTV-519の量は、臨床的な障害又は運動誘発性心不整脈の症状(例えば、動悸、失神、心室細動、心室頻拍及び突然心臓死)を軽減又は改善するのに有効なJTV-519の量を含む。対象者の運動誘発性心不整脈を治療するのに有効なJTV-519の量は、運動誘発性心不整脈のタイプ、対象者の体重、対象者症状の重篤度及びJTV-519の投与方式のような各々の症例の特定の要因によって変動する。この量は、当業者であれば、臨床試験のような既知の手順及び本明細書において説明する方法に基づき容易に決定し得ることである。好ましい実施態様においては、JTV-519により、対象者の運動誘発性心不整脈を治療する。

【0021】

更に、本発明は、対象者の運動誘発性心不整脈の治療方法を提供する。該方法は、対象者に、JTV-519を対象者の運動誘発性心不整脈を治療するのに有効なJ量で投与することを含む。対象者の運動誘発性心不整脈を治療するのに有効なJTV-519の適切な量は、約5 mg/kg/日～約20 mg/kg/日の範囲であり得、及び/又は、約300 ng/ml～約1000 ng/mlの範囲の血漿レベルを達成するのに十分な量であり得る。また、本発明は、対象者の運動誘発性心不整脈の予防方法も提供する。該方法は、対象者に、JTV-519を対象者の運動誘発性心不整脈を予防するのに有効な量で投与することを含む。対象者の運動誘発性心不整脈を予防するのに有効なJTV-519の適切な量は、約5 mg/kg/日～約20 mg/kg/日の範囲であり得、及び/又は、約300 ng/ml～約1000 ng/mlの範囲の血漿レベルを達成するのに十分な量であり

得る。更に、本発明は、対象者の運動誘発性突然心臓死の予防方法を提供する。該方法は、対象者に、JTV-519を対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することを含む。対象者の運動誘発性心突然心臓死を予防するのに有効なJTV-519の適切な量は、約5 mg/kg/日～約20 mg/kg/日の範囲であり得、及び/又は、約300 ng/ml～約1000 ng/mlの範囲の血漿レベルを達成するのに十分な量であり得る。

上述した方法の各実施態様においては、対象者の運動誘発性心不整脈は、VTに関連する。好ましい実施態様においては、VTは、CPVTである。これらの方法の他の実施態様においては、対象者は、運動誘発性突然心臓死の候補を含む運動誘発性心不整脈の候補である。

上述の各方法に照らして、本発明は、運動誘発性心不整脈の候補である対象者のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止する方法におけるJTV-519の使用も提供する。また、本発明は、対象者の運動誘発性心不整脈を治療又は予防する方法におけるJTV-519の使用も提供する。更にまた、本発明は、対象者の運動誘発性突然心臓死の予防方法におけるJTV-519の使用も提供する。

10

【0022】

上述し、本明細書において提示するように、本発明者等のデータは、心臓リアノジンレセプター、RyR2のセリン2809上でのタンパク質キナーゼA (PKA)リン酸化が、FK506結合性タンパク質、FKBP12.6を放出することにより、チャンネルを活性化させることを示している。心不全(心不全のヒト心臓及び動物モデルを含む)においては、RyR2は、PKA過剰リン酸化されて、減少量の結合FKBP12.6を含み且つカルシウム誘発性活性化に対して増大した感受性を有する欠陥チャンネルを生じる。これらの変化の正味の結果は、RyR2チャンネルが“漏出性”であることである。これらのチャンネル漏出は、筋収縮のための強い刺激を与えるには筋小胞体(SR)中のカルシウムがもはや十分でないような程度にまでのカルシウムの細胞内貯蔵不足を生じる。このことは、心筋の弱い収縮をもたらす。上記チャンネル漏出の2番目の結果として、RyR2チャンネルは、“拡張期”として知られる心臓サイクルの静止期中にカルシウムを放出する。拡張期中のこのカルシウム放出は、突然心臓死(SCD)を起す心臓の致死性不整脈(例えば、心室頻拍及び心室細動)を誘発し得る。

20

また、本発明者等は、心臓を休止状態に置き、正常化機能を再生させる左心補助循環装置(LVAD)と称される機械的ポンピング装置による心不全の治療がRyR2のPKA過剰リン酸化の低下及びチャンネル機能の正常化に関連していることを証明している。更にまた、本発明者等は、イヌ(ペースング誘発性心不全を有する)のベータ-アドレナリン遮断薬(ベータ遮断薬)による治療がRyR2のPKA過剰リン酸化を逆転させることも証明している。ベータ遮断薬は、PKAを活性化させる経路を抑制する。本発明者等の研究結果から導き出し得る結論は、RyR2のPKAリン酸化がチャンネルの活性を増大させ、チャンネルの所定の誘発剤(活性化剤)のための細胞中へのさらなるカルシウムの放出をもたらすということである。

30

本明細書において更に開示するように、本発明者等は、運動誘発性突然心臓死がRyR2タンパク質(とりわけ、CPVT関連RyR2変異体タンパク質)のリン酸化の増大及びRyR2結合FKBP12.6レベルの低下に関連していることを確立している。このメカニズムを使用して運動誘発性突然心臓死の予防のために有効な薬物を設計することが可能である。RyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止する能力を有する候補薬剤は、この抑制又は予防活性の結果として、RyR2関連生物学的現象に対する作用を有し、それによって運動誘発性突然心臓死を予防し得る。

40

【0023】

従って、本発明は、更に、運動誘発性突然心臓死の予防に使用する薬剤の同定方法を提供する。該方法は、以下の工程を含む：(a) RyR2を含有する細胞の培養物を取得し又は生成させる工程；(b) 上記細胞を候補薬剤と接触させる工程；(c) 上記細胞を細胞内のRyR2リン酸化を増大させることが知られている1以上の条件に暴露させる工程；及び、(d) 上記薬剤が上記細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止しているかどうかを判定する工程。本明細書において使用するとき、“薬剤”としては、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸(DNA又はRNA)、抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、分子、化合物、抗生物質、薬物、及びこれらの任意の組合せがあるであろう。RyR2結合FK

50

BP12.6レベルの低下を抑制又は阻止する薬剤は、天然又は合成物のいずれかであり、RyR2及び/又はFKBP12.6と反応性の薬剤(即ち、RyR2及び/又はFKBP12.6に対する親和性を有し、RyR2及び/又はFKBP12.6に結合し、或いはRyR2及び/又はFKBP12.6に対し特異性である薬剤)であり得る。更に本明細書において使用するとき、“RyR2を含有する”細胞は、RyR2又はその誘導体もしくは相同物が自然に発現し又は自然に産生している細胞(好ましくは、心筋細胞)である。細胞内のRyR2リン酸化を増大させることが知られている条件は、限定するものではないが、PKAを含む。

本発明の方法においては、細胞は、本明細書において説明する任意の導入及び投与方法のような薬物/薬物と細胞間の接触を実施する任意の標準方法により、候補薬剤と接触させ得る。細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルは、当業者にとって公知の又は本明細書において説明する方法、分子手法及びアッセイ法のいずれかのような公知の手法により測定又は検出し得る。本発明の1つの実施態様においては、上記薬剤は、細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止する。

10

【0024】

本発明において開示するように、RyR2は、横紋筋細胞内の多くの生物学的事象に關与している。例えば、RyR2チャンネルは、心筋細胞内のEC連関及び収縮に重要な役割を果たすことが証明されている。従って、細胞、とりわけ心筋細胞内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止するように設計した予防薬が、EC連関及び収縮のような多くのRyR2関連生物学的事象の調節において有用であることは明白である。即ち、本発明の候補薬剤をスクリーニングし、RyR2結合FKBP12.6レベルの低下に対する適切な抑制又は予防効果を有することを判定した時点で、該候補薬剤は、細胞、とりわけ心筋細胞内のEC連関及び収縮に対するその効果について評価し得る。本発明の予防剤は、運動誘発性突然心臓死を予防するのに有用であることが期待される。

20

従って、本発明の方法は、以下の工程を更に含む：(e) 候補薬剤をRyR2を含有する細胞の培養物と接触させる工程；及び、(f) 上記薬剤が上記細胞内のRyR2関連生物学的事象に対する作用を有するかどうかを判定する工程。本明細書において使用するとき、“RyR2関連生物学的事象”は、RyR2レベル又は活性が關与する生化学又は生理学的過程を含む。本明細書において開示するように、RyR2関連生物学的事象の例としては、限定するものではないが、心筋細胞のEC連関及び収縮がある。本発明のこの方法によれば、候補薬剤は、1種以上の細胞(好ましくは、心筋細胞)と生体外で接触させ得る。例えば、細胞培養物を、候補薬剤を含有する製剤と一緒にインキュベートし得る。その後、RyR2関連生物学的事象に対する候補薬剤の作用を、イムノプロットティング法、単チャンネル記録法のような当該技術において公知の任意の生物学的アッセイ法又は方法及び本明細書において開示する任意の他の方法により評価し得る。

30

更に、本発明は、上述の同定方法により同定した薬剤、並びに該薬剤と製薬上許容し得る担体を含む製薬組成物に關する。該薬剤は、対象者の運動誘発性突然心臓死の予防において、更に他のRyR2関連症状の治療又は予防において有用であり得る。本明細書において使用するとき、“RyR2関連症状”は、RyR2レベル又は活性が關与する症状、疾患又は障害であり、RyR2関連生物学的事象を含む。RyR2関連症状は、対象者に対象者のRyR2関連症状を治療又は予防するのに有効な量の上記薬剤を投与することにより、対象者において治療又は予防し得る。この量は、当業者であれば、容易に決定し得ることである。1つの実施態様においては、本発明は、上記薬剤を対象者に対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することによる、対象者の運動誘発性突然心臓死の予防方法を提供する。

40

【0025】

また、本発明は、運動誘発性突然心臓死を予防するのに使用する薬剤の生体内同定方法も提供する。該方法は、以下の工程を含む：(a) RyR2を含有する動物を取得し又は産生させる工程；(b) 候補薬剤を上記動物に投与する工程；(c) 上記動物を細胞内のRyR2リン酸化を増大させることが知られている1以上の条件に暴露させる工程；及び、(d) 上記薬剤が上記動物内のRyR2結合FKBP12.6レベルの低下を抑制又は阻止しているかどうかを判定す

50

る工程。該方法は、以下の工程を更に含む：(e) RyR2を含有する動物に上記薬剤を投与する工程；及び、(f) 上記薬剤が上記動物内のRyR2関連生物学的現象に対する作用を有するかどうかを判定する工程。また、この方法によって同定した薬剤；この薬剤を含む製薬組成物；及び、この薬剤を対象者に対象者の運動誘発性突然心臓死を予防するのに有効な量で投与することによる、対象者の運動誘発性突然心臓死の予防方法も提供する。

本発明者等の研究は、PKA活性を遮断する化合物がRyR2チャンネルの活性を低下させて細胞中への少なめのカルシウム放出をもたらすことが期待されるであろうことを実証している。RyR2チャンネルにFKBP12.6結合部位で結合するが、該チャンネルがPKAによってリン酸化されるときには該チャンネルから離脱しない化合物も、PKA活性化又はRyR2チャンネルを活性化する他の誘発剤に応答してチャンネル活性を低下させることが期待される。そのような化合物も、細胞中への少なめのカルシウム放出をもたらすであろう。これらの知見に鑑み、本発明は、更に、運動誘発性突然心臓死を予防するのに有用であり得る薬剤(これらの薬剤がRyR2活性を遮断又は抑制する点で)を同定するさらなるアッセイ法も提供する。

10

【0026】

例えば、本発明の診断アッセイ法は、カルシウム感受性蛍光染料(例えば、Fluo-3、Fura-2等)を使用して、RyR2チャンネルを介しての細胞中へのカルシウム放出についてスクリーニングし得る。細胞に選択した蛍光染料を負荷させ、その後、RyR2活性化剤により刺激して、細胞に加えた化合物がカルシウム依存性蛍光シグナルを低下させたか又はさせなかったかどうかを判定する(Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994; Gillo et al., Calcium entry during induced differentiation in murine erythroleukemia cells. Blood, 81: 783-92, 1993; Jayaraman et al., Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. Science, 272: 1492-94, 1996)。カルシウム依存性蛍光シグナルは、光電子倍增管によりモニターして、以前に開示されたような適切なソフトウェアにより分析し得る(Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994; Gillo et al., Calcium entry during induced differentiation in murine erythroleukemia cells. Blood, 81: 783-92, 1993; Jayaraman et al., Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. Science, 272: 1492-94, 1996)。このアッセイは、マルチウェル板を使用して、容易に自動化して多量の化合物をスクリーニングし得る。

20

30

RyR2介在細胞内カルシウム放出のPKA依存活性化を抑制する化合物を同定するには、アッセイ法は、Sf9、HEK293又はCHO細胞のような異種発現系中での組換えRyR2チャンネルの発現を含み得る(Brillantes et al., Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77: 513-23, 1994)。また、RyR2は、ベータアドレナリンレセプターと共発現させることも可能である。この共発現は、ベータアドレナリンレセプター作用薬の添加に応答してのRyR2活性化に対する化合物の作用の評価を可能にするであろう。

【0027】

40

また、心不全の程度に相関するRyR2のPKAリン酸化レベルも、アッセイし、その後、RyR2チャンネルのPKAリン酸化を遮断するように設計した化合物の有効性を判定するのに使用し得る。そのようなアッセイは、RyR2タンパク質に対して特異性である抗体の使用に基づく。例えば、RyR2チャンネルタンパク質を免疫沈降させ、その後、PKA及び[³²P]-ATPにより逆リン酸化させ得る。その後、RyR2タンパク質に移行した放射性[³²P]標識量を、ホスホリイメージャー(phosphorimager)を使用して測定する(Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell, 101: 365-76, 2000)。

本発明のもう1つのアッセイ法は、Ser 2809上でPKAリン酸化されるRyR2を検出するリンエピトープ特異性抗体の使用を含む。そのような抗体によるイムノブロッティングは、

50

心不全及び心不整脈の治療有効性を評価するのに使用し得る。更に、RyR2 S2809A及びRyR2S 2809D組込み(knock-in)マウスを使用しても心不全及び心不整脈の治療有効性を評価し得る。そのようなマウスは、RyR2のPKA過剰リン酸化が心不全及び心不整脈の寄与因子である証拠を、RyR2 S2809A変異が心不全及び不整脈を抑制すること及びRyR2 S2809D変異が心不全及び不整脈を悪化させることを示すことによって更に提供する。

【0028】

新規な化学合成経路

1,4-ベンゾチアゼピン誘導体は、JTV-519のような生物学的活性分子の調製における重要な構築用基材である。本発明者等は、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンのような1,4-ベンゾチアゼピン中間化合物の新規な調製方法を開発した。本発明者等の方法は、容易に入手でき且つ安価な出発物質を使用して、高収率の主要1,4-ベンゾチアゼピン中間体を調製する。

10

1990年代の早期に、Kaneko等(米国特許第5,416,066号; WO 92/12148号; JP第4230681号)は、JTV-519を、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピン(1,4-ベンゾチアゼピン中間体)を塩化アクリロイルと反応させ、その後、得られた生成物を4-ベンジルピペリジンと反応させることによって調製し得ることを開示した。

7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピン及び同様な化合物の2つの調製方法が以前に文献において報告されている。Kaneko等(米国特許第5,416,066号)が開示した第1の方法は、2,5-ジヒドロキシ安息香酸により出発した6工程の合成経路を含んでいた。この方法においては、2,5-ジヒドロキシ安息香酸を硫酸ジメチルにより選択的にメチル化する。その後、得られた化合物をジメチルチオカルバモイルクロライドと20時間反応させ、次いで、高温(270 °C)に9時間供する。この工程の生成物をメタノール中のナトリウムメトキシドと一緒に20時間還流させる。その後、該還流工程の生成物を塩基性条件下に高温で2-クロロエチルアミンと反応させて環状化アミドを調製する。この環状化アミドを LiAlH_4 によって還元して、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピン(1,4-ベンゾチアゼピン中間体)を得ている。

20

7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンの第2の調製方法は、Hitoshiによって日本特許(JP第10045706号)において開示された。この方法は、2-ブromo-5-メトキシベンズアルデヒドにより出発する。臭化物を NaSMe で置換し、得られた生成物を塩素で酸化し、その後、水中で還流させて、ジスルフィドジアルデヒドを得る。該ジアルデヒドを2-クロロエチルアミンで処理し、得られた生成物を NaBH_4 のような還元剤と反応させる。得られた化合物を環状化して7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンを得ている。

30

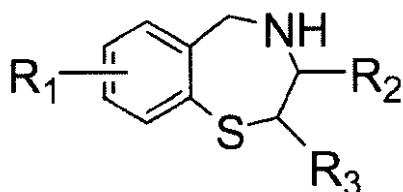
【0029】

最初、本発明者等は、上述の方法を使用して、1,4-ベンゾチアゼピン中間体、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンを調製することを試みた。しかしながら、本発明者等は、Kaneko等(米国特許第5,416,066号)が開示した第1の方法は、高温及び長反応時間の合成工程を含むことを見出した。更に、本発明者等は、3番目のチオ化中間体のチオ基は空気によってジスルフィド化合物に容易に酸化され、その後の環状化生成物の合成を不可能にすることも見出した。また、本発明者等は、Hitoshi (JP第10045706号)が開示した方法は、 Cl_2 を含むこと及び1番目の中間体の調製のためには、 NaSMe による臭化物の置換は別にしても、他の特許方法を使用しなければならないと判断した。

40

上記の問題を克服するために、本発明者等は、容易に入手でき且つ安価な出発物質から7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンを製造する新規な方法を開発した。本発明者等の方法は、単離及び精製工程を簡素化し、下記の式で示される一般的構造を有する7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピン及び他の化合物のような各種1,4-ベンゾチアゼピン中間体を調製するのに使用し得る：

【化4】



R1 = n-MeO, n-MeS, n-アルキル, n=6,7,8,9

R2 = アルキル

R3 = アルキル

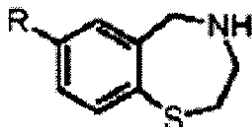
10

この方法は、JTV-519を調製するのにも使用し得る。

【0030】

従って、上記に鑑み、本発明は、下記の式：

【化5】



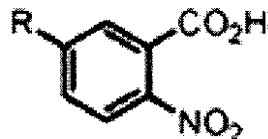
(式中、R = OR', SR', NR', アルキル又はハライドであり；R' = アルキル、アリール又はHであり；Rは、位置2、3、4又は5にあり得る)

20

を有する化合物の合成方法を提供し、該方法は、下記の工程を含むことを特徴とする：

(a) 下記の式：

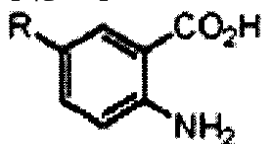
【化6】



(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を、任意成分としての触媒の存在下に、還元剤で処理して、下記の式：

【化7】

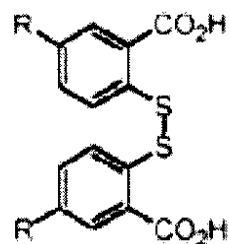


(Rは、上記で定義したとおりである)

を調製する工程；

(b) 工程(a)で調製した化合物をジアゾ化剤及びジスルフィドで処理して、下記の式：

【化8】



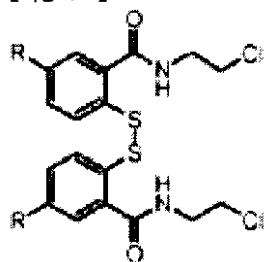
(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程；

(c) 工程(b)で調製した化合物をクロライド及びクロロエチルアミンで処理して、下記の式：

40

【化 9】



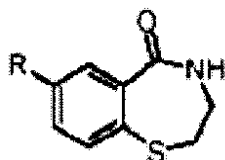
(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程；

10

(d) 工程(c)で調製した化合物を、テトラヒドロレートの存在下に、還元剤及び塩基で処理して、下記の式：

【化 10】



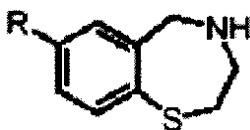
(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程；及び、

20

(e) 工程(d)で調製した化合物を還元剤で処理して、下記の式：

【化 11】



(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を調製する工程。

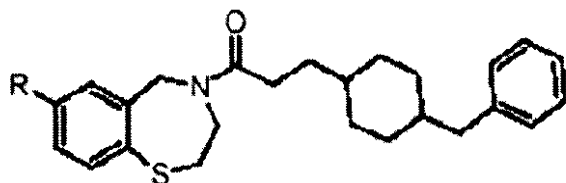
本発明の上記方法によれば、工程(a)における還元剤は、 H_2 であり得る。更に、工程(b)におけるジアゾ化剤は $NaNO_2$ であり得、工程(b)におけるジスルフィドは Na_2S_2 であり得る。更にまた、工程(c)におけるクロライドは、 $SOCl_2$ であり得る。工程(d)における還元剤はトリメチルホスフィン(PMe_3)であり得、また、工程(d)における塩基はトリエチルアミンであり得る。もう1つの実施態様においては、工程(e)における還元剤は、 $LiAlH_4$ であり得る。

30

【0031】

本発明は、更に、下記の式：

【化 12】



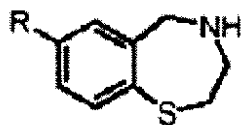
40

(式中、 $R = OR'$ 、 SR' 、 NR' 、アルキル又はハライドであり； $R' =$ アルキル、アリール又はHであり；Rは、位置2、3、4又は5にあり得る)

を有する化合物の合成方法を提供し、該方法は、下記の工程を含むことを特徴とする：

(a) 下記の式：

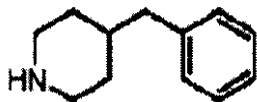
【化 1 3】



(Rは、上記で定義したとおりである)

を有する化合物を、3-ブロモプロピオン酸クロライド及び下記の式：

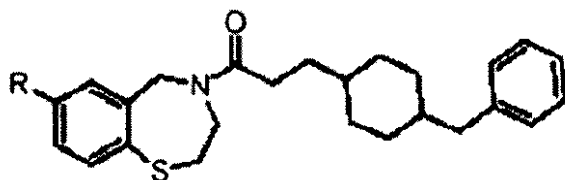
【化 1 4】



10

を有する化合物で処理して、下記の式：

【化 1 5】



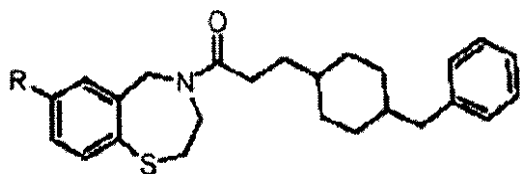
(Rは、上記で定義したとおりである)

20

を有する化合物を調製する工程。

例えば、下記の式：

【化 1 6】

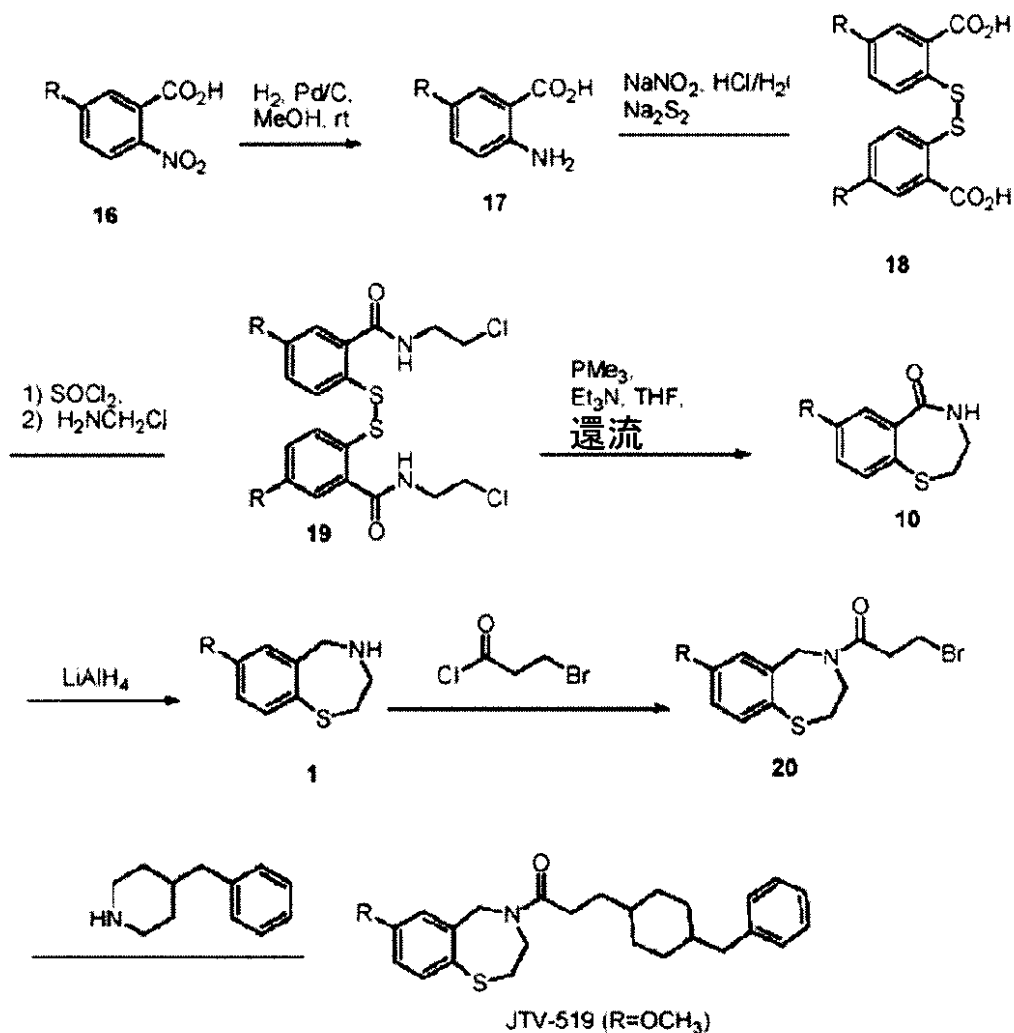


(式中、R = OR'、SR'、NR'、アルキル又はハライドであり；R' = アルキル、アリール又はHであり；Rは、位置2、3、4又は5にあり得る)

30

を有する化合物は、下記のとおり合成し得る：

【化 1 7】

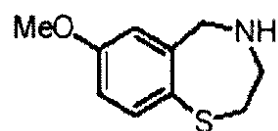


R=OR',SR',NR',アルキル,ハライド; R'=アルキル,アリール,H
Rは位置2,3,4又は5にあり得る

【 0 0 3 2 】

本発明の方法は、更に、下記の式：

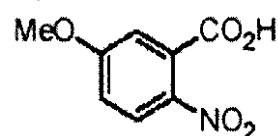
【化 1 8】



を有する化合物の合成方法を提供し、該方法は、下記の工程を含むことを特徴とする：

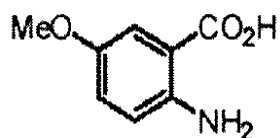
(a) 下記の式：

【化 1 9】



を有する化合物を、任意成分としての触媒の存在下に、還元剤で処理して、下記の式：

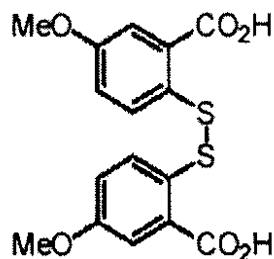
【化 2 0】



を有する化合物を調製する工程；

(b) 工程(a)で調製した化合物をジアゾ化剤及びジスルフィドで処理して、下記の式：

【化 2 1】

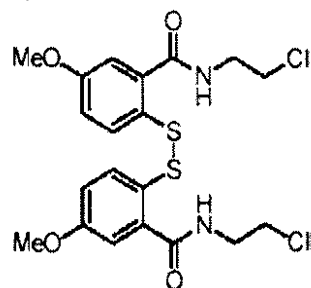


10

を有する化合物を調製する工程；

(c) 工程(b)で調製した化合物をクロライド及びクロロエチルアミンで処理して、下記の式：

【化 2 2】



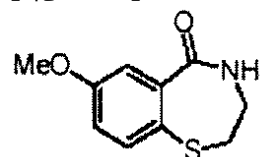
20

を有する化合物を調製する工程；

(d) 工程(c)で調製した化合物を、テトラヒドロレートの存在下に、還元剤及び塩基で処理して、下記の式：

30

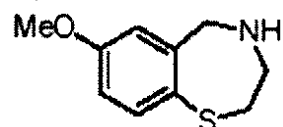
【化 2 3】



を有する化合物を調製する工程；

(e) 工程(d)で調製した化合物を還元剤で処理して、下記の式：

【化 2 4】



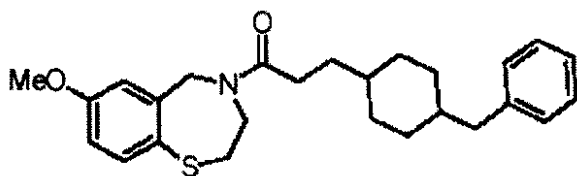
40

を有する化合物を調製する工程。

【0033】

また、本発明は、下記の式：

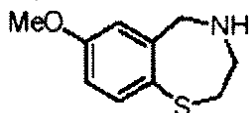
【化 2 5】



を有する化合物の合成方法を提供し、該方法は、下記の工程を含むことを特徴とする：

(a) 下記の式：

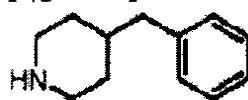
【化 2 6】



10

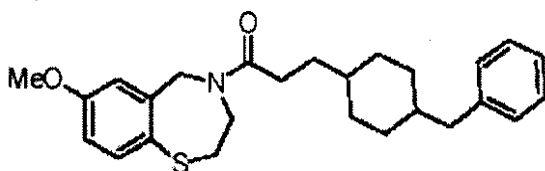
を有する化合物を、3-ブロモプロピオン酸クロライド及び下記の式：

【化 2 7】



を有する化合物で処理して、下記の式：

【化 2 8】



20

を有する化合物を調製する工程。

【0034】

例えば、下記の実施例 7 及び反応式 1 に示すように、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンは、2-ニトロ-5-メトキシ安息香酸から次のようにして調製し得る。2-ニトロ-5-メトキシ安息香酸のニトロ基を、触媒としての Pd/C と一緒に H₂ を使用して還元して 2-アミノ-5-メトキシ安息香酸を得る。2-アミノ-5-メトキシ安息香酸を NaNO₂ によりジアゾ化し、次いで Na₂S₂ で処理して、安定なジスルフィド化合物を調製し得る。更に精製することなく、安定なジスルフィド化合物を SOCl₂ で処理し、次いで、Et₃N の存在下に、2-クロロエチルアミンと反応させて、アミドを得ることができる。その後、アミド化合物を、ワンポット手順により、次のようにして環状化合物に転化できる。還元剤(トリメチルホスフィン又はトリフェニルホスフィンのような)及び塩基(トリエチルアミンのような)を THF (テトラヒドロ葉酸塩) 中のアミド化合物溶液に添加し得る。得られた反応混合物は、その後、3 時間還流させ得る。還元剤(トリメチルホスフィン又はトリフェニルホスフィン)はジスルフィド(S-S)をそのモノスルフィド(-S)に開裂させ、このモノスルフィドがその場でクロライドによる分子内環状化を受けて環状化アミドを生成する。その後、環状化アミドを LiAlH₄ で還元して、1,4-ベンゾチアゼピン中間体、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンを得ることができる。JTV-519 は、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンから、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピンを 3-ブロモプロピオン酸クロライドと反応させ、次いで、得られた化合物を 4-ベンジルピペリジンと反応させることによって調製し得る。

30

40

例えば、下記の実施例 8 及び反応式 2 に示すように、放射能標識 JTV-519 は、以下のようにして調製し得る。JTV-519 を、BBR₃ を使用して、フェニル環において脱メチル化し得る。その後、得られたフェノール化合物を、塩基(NaH のような)の存在下に、放射能標識メチル化剤(³H-ジメチルスルフェートのような)により再メチル化して、³H-標識 JTV-519 を調製し得る。

50

更に、本発明は、放射能標識JTV-519を含む組成物も提供する。JTV-519の標識化は、当該技術において公知の種々の異なる放射性標識の1つを使用して達成し得る。本発明の放射性標識は、例えば、放射性同位元素であり得る。放射性同位元素は、検出し得る放射線を発出し得る任意の同位元素であり得、限定するものではないが、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 又は ^{14}C がある。放射性同位元素から発出された放射活性は、当該技術において周知の方法により検出し得る。例えば、放射性同位元素からのガンマ放射は、ガンマ画像法、とりわけシンチグラフ画像法を使用して検出し得る。

【0035】

(実施例)

本発明を以下の実施例において説明するが、これらの実施例は、本発明の理解を助けるために提示するものであり、特許請求の範囲において定義するような本発明の範囲を如何なる形においても限定するものと解釈すべきではない。

実施例 1

FKBP12.6欠損マウス

FKBP12.6欠損マウスを、以前に開示されているようにして產生させた(Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113:829-40, 2003)。要するに、ヒトFK506結合性タンパク質12.6 (FKBP12.6)のマウス相同分子種に対するマウスゲノム ファージクローンを、全長マウスcDNAプローブを使用して、DBA/IIacJライブラリーから分離した。ターゲッティングベクターを、3.5 kbのマウスゲノムDNAをPGK-neo選択性マーカーで置換することによって、マウスFKBP12.6に対するコード配列全体を含有するエクソン3及び4 (Bennett et al., Identification and characterization of the murine FK506 binding protein (FKBP) 12.6 gene. *Mamm. Genome*, 9: 1069-71, 1998)を欠落するように設計した。5.0-kb 5'フラグメント及び1.9-kb 3'フラグメントを、pJNS2、即ち、PGK-neo及びPGK-TKカセットを有する主鎖ベクター中にクローニングした。DBA/IIacJ胚幹(ES)細胞を、確立されたプロトコールを使用して、増殖させ、移入させた。ターゲット化ES細胞を先ずサザン分析によりスクリーニングし、5つの陽性ES細胞系をPCRにより分析して相同組換えを確認した。雄キメラ体をDBA/IIacJ雌と交配させ、生殖細胞系列子孫をブラウンコート色により同定した。生殖細胞系列子孫は、5'サザン分析を使用して遺伝子型を特定した。陽性FKBP12.6^{+/+}雄と雌を交配させたところ、子孫はおおよそ25%の頻度でFKBP12.6^{-/-}マウスを生じていた。FKBP12.6^{-/-}マウスは、繁殖性であった。

FKBP12.6^{-/-}マウスで実施した試験は、全て、対照として、年齢及び性別を整合させたFKBP12.6^{+/+}マウスを使用した。以下の背景において產生させたFKBP12.6^{-/-}マウス間において差異は観察されなかった：DBA/C57BL6混成、純DBA及び純C57BL6。

【0036】

実施例 2

マウスにおける遠隔測定記録及び運動試験

FKBP12.6^{+/+}マウス及びFKBP12.6^{-/-}マウスを、コロンビア大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeによって承認されたプロトコールに従い、保育し試験した。マウスを、2.5%イソフルラン吸入麻酔を使用して麻酔させた。歩行動物のECG無線遠隔測定記録を腹腔内埋込み後の>7日において取得した(Data Sciences International社、ミシガン州セントポール)(Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113: 829-40, 2003)。ストレス試験においては、マウスを傾斜トレッドミル上で疲労するまで運動させ、その後、エピネフリン(0.5~2.0 mg/kg)を腹腔内注入した(Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113: 829-40, 2003)。歩行動物の安静時心拍数を4時間に亘って平均化した。

【0037】

実施例 3

10

20

30

40

50

野生タイプ及びRyR2-S2809D変異体の発現

RyR2上のPKAターゲット部位の変異誘発(RyR2-S2809D)を、以前に開示されているようにして実施した(Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113: 829-40, 2003)。HEK293細胞に、 Ca^{2+} ホスフェート沈降法を使用して、20 μg のRyR2野生タイプ(WT)又は変異体cDNA及び5 μg のFKBP12.6cDNAを共移入した。RyR2チャンネルを含有する小胞を、以前に開示されているようにして調製した(Wehrens et al., FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*, 113: 829-40, 2003)。

10

【0038】

実施例 4

RyR2 PKAリン酸化及びFKBP12.6結合性

心臓SR膜を、以前に開示されているようにして調製した(Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76, 2000; Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{(2+)}$ -release channels from cardiac muscle. *Circ Res.*, 78:990-97, 1996)。 ^{35}S 標識FKBP12.6を、Promega社(ウィスコンシン州マジソン)からのTNTTM Quick Coupled Transcription/Translationシステムを使用して、産生させた。 ^3H リアノジン結合性を使用してRyR2レベルを定量した。100 μg のミクロソームを100 μl の10-mM イミダゾール緩衝液(pH 6.8)中で希釈し、250-nM (最終濃度)の ^{35}S -FKBP12.6と一緒に37 °Cで60分間インキュベートし、その後、500 μl の氷冷イミダゾール緩衝液により失活させた。サンプルを100,000gで10分間遠心分離し、イミダゾール緩衝液中で3回洗浄した。結合 ^{35}S -FKBP12.6の量を、ペレットの液体シンチレーション計数により測定した。

20

【0039】

実施例 5

イムノプロット

ミクロソーム(50 μg)のイムノプロットティングを、抗-FKBP12/12.6 (1:1,000)、抗-RyR (5029; 1:3,000) (Jayaraman et al., FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.*, 267:9474-77, 1992)、又は抗-ホスホRyR2 (P2809; 1:5,000)により、開示されているようにして、室温で1時間実施した(Reiken et al., Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation*, 107:2459-66, 2003)。P2809-ホスホエピトープ特異性抗-RyR2抗体は、Ser²⁸⁰⁹でPKA-リン酸化したRyR2に相応するペプチドのCRTRRI-(pS)-QTSQを使用して、Zymed Laboratories社(カリフォルニア州サンフランシスコ)により特注製造されたアフィニティー精製ポリクローナルウサギ抗体である。HRP-標識抗-ウサギIgG (1:5,000希釈; Transduction Laboratories社、ケンタッキー州レキシントン)と一緒にインキュベーション後、プロットを、ECL (Amersham Pharmacia社、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を使用して展開した。

30

40

【0040】

実施例 6

単チャンネル記録

マウス心臓由来の天然RyR2又は組換えRyR2の単チャンネル記録を、0 mVの電圧固定条件下に、以前に開示されているようにして獲得した(Marx et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101: 365-76, 2000)。チャンネル記録用に使用した対称溶液は、次のとおりであった。トランスコンパートメント: HEPES、250 mmol/L; $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 、53 mmol/L (幾つかの試験においては、 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ を $\text{Ca}(\text{OH})_2$ で置換えた); pH 7.35、及びシスコンパートメント: HEPES、250 mmol/L; Tris-塩基、125 mmol/L; EGTA、1

50

.0 mmol/L ; CaCl₂、0.5 mmol/L ; pH 7.35。特に断らない限り、単チャンネル記録は、シスコンパートメント中で、150-nM [Ca²⁺]及び1.0-mM [Mg²⁺]の存在下に行なった。リアノジン (5 mM)をシスコンパートメントに加えて全チャンネルの同一性を確認した。データは、Fetchanソフトウェア (Axon Instruments社、カリフォルニア州ユニオンシティー)を使用して、デジタル化電流記録から分析した。全てのデータを平均 ± SEとして表している。不對スチューデント t-検定を、試験間の平均値の統計比較において使用した。P<0.05の値を統計的に有意とみなした。

RyR2チャンネルに対するJTV-519の効果を図 1 ~ 3 及び表 1 (下記)に示す。図 3 において実証されるように、単チャンネル試験は、特異性PKAインヒビター、PKA₅₋₂₄の存在下でのPKAリン酸化(C)と比較して、PKAリン酸化後のRyR2(D)の増大した開確率を示していた。単チャンネル機能は、JTV-519の存在下にFKBP12.6と一緒にインキュベートしたPKAリン酸化RyR2 (E)において正常化されていた。各増幅ヒストグラム(右側)は、JTV-519及びFKBP12.6による処理後ではないが、PKAリン酸化RyR2における活性増大と伝導度低下開放を明らかにしている。図 3 Fは、JTV-519の存在下でのFKBP12.6と一緒にのPKAリン酸化RyR2のインキュベーションが、RyR2活性化のCa²⁺依存性を右方向にシフトさせ、この依存性を未リン酸化チャンネルのCa²⁺依存性と同様にしていたことを示している。

【 0 0 4 1 】

表 1 : 運動前、運動中及び運動後、並びにエピネフリン注入後の歩行ECGデータ

	SCL (ms)	HR (bpm)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	QTc (ms)
<u>ベースライン</u>						
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
<u>最高運動</u>						
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
<u>運動後、エピネフリン</u>						
FKBP12.6 ^{+/-}	94 ± 4	645 ± 28	35 ± 2.6	9.3 ± 0.4	33 ± 1.8	34 ± 1.9
FKBP12.6 ^{+/-} + JTV-519	102 ± 4	592 ± 21	37 ± 2.6	9.9 ± 0.6	32 ± 2.3	32 ± 1.7
FKBP12.6 ^{-/-} + JTV-519	103 ± 4	585 ± 20	35 ± 3.8	11.1 ± 0.5	36 ± 1.2	36 ± 1.3

JTV-519 (n =8)又は対照 (n =6)で治療したFKBP12.6^{+/-}マウス、及びJTV-519で治療したFKBP12.6^{-/-}マウス (n = 5)における歩行ECGデータの要約。SCL = 洞周期長 ; HR = 心拍 ; ms = ミリ秒 ; bpm = 分当りの拍動数 ; FKBP12.6^{+/-} = FKBP12.6異型接合マウス ; FKBP12.6^{-/-} = FKBP12.6欠損マウス

【 0 0 4 2 】

実施例 7

1,4-ベンズチアゼピン中間体及びJTV-519の合成

生体内試験において、本発明者等は、グラム量のJTV-519を必要とした。しかしながら

、この化合物を報告された1,4-ベンゾチアゼピン中間体、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピン(下記の反応式1における化合物6)から調製する当初の試みは、不成功であった。この中間体のチオ基は、空気によりジスルフィド化合物に容易に酸化され、この化合物は環状化生成物(5)の合成を不可能にする。この問題を克服するため、本発明者等は、容易に入手でき且つ安価な2-ニトロ-5-メトキシ安息香酸(1)により出発する新規な方法を開発した。この方法は、下記の反応式1に示している。

触媒としてのPd/Cと一緒にH₂を使用しての化合物(1)のニトロ基の還元により、2-アミノ-5-メトキシ安息香酸(2)を定量的収率で得た。化合物(2)をNaNO₂によりジアゾ化し、次いでNa₂S₂で処理して、安定なジスルフィド化合物(3)を80%の収率でもって調製した。更に精製することなく、安定なジスルフィド(3)をSOCl₂で処理し、次いで、Et₃Nの存在下に、2-クロロエチルアミンと反応させて、アミド(4)を90%の収率で得た。化合物(4)を、ワンポット手順により、THF中でのトリメチルホスフィン及びEt₃Nによる還流によって環状化化合物(5)に転化させた。その後、環状化アミド(5)をLiAlH₄で還元して、7-メトキシ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,4-ベンゾチアゼピン(6)を得た。

10

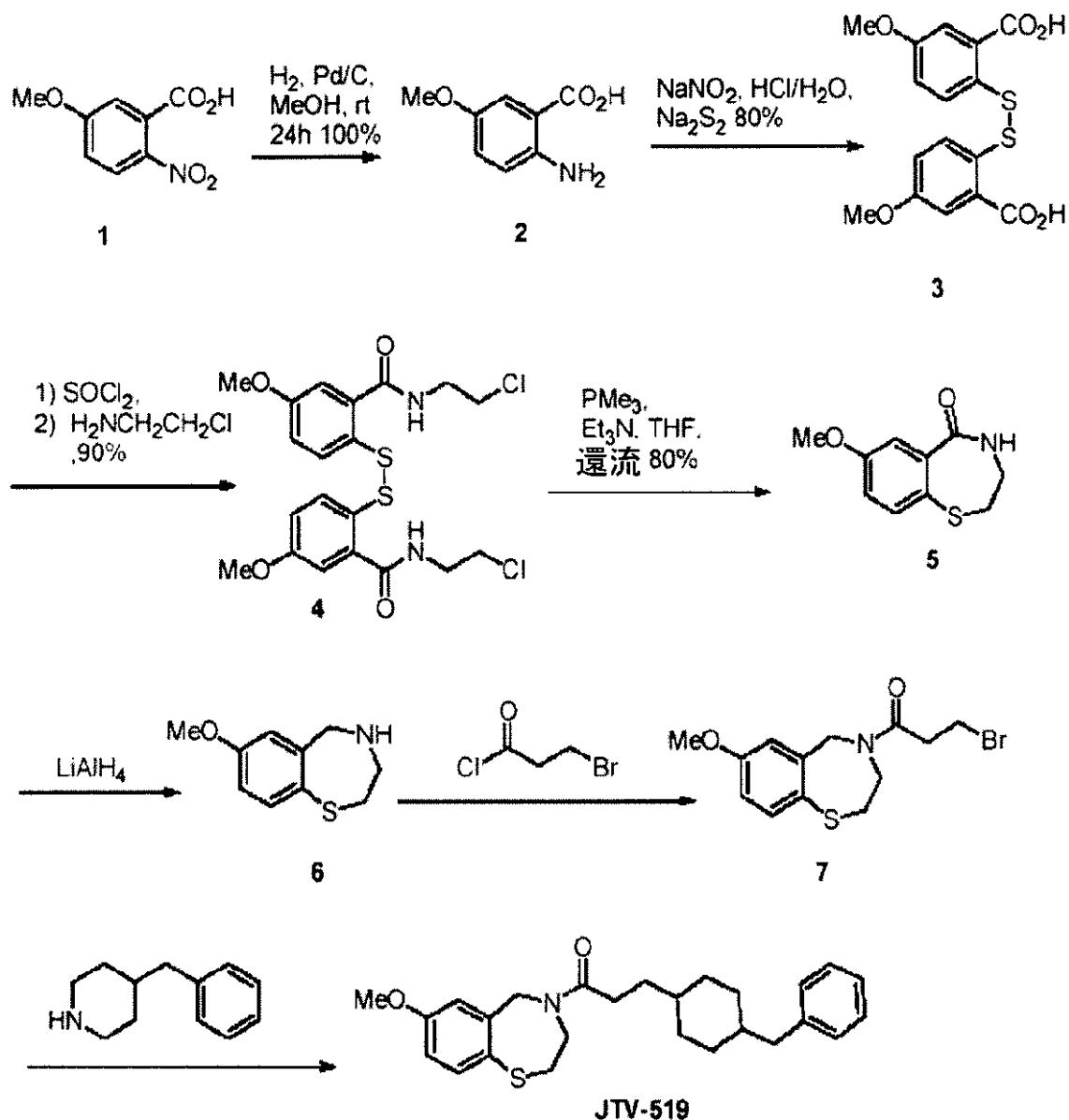
20

30

40

【化 2 9】

Scheme 1



10

20

30

40

50

JTV-519は、化合物(6)を3-ブロモプロピオン酸クロライドと反応させ、次いで、得られた生成物を4-ベンジルピペリジンと反応させることによって調製した。JTV-519の構造は、 ^1H NMRにより確立した。

【0043】

実施例 8

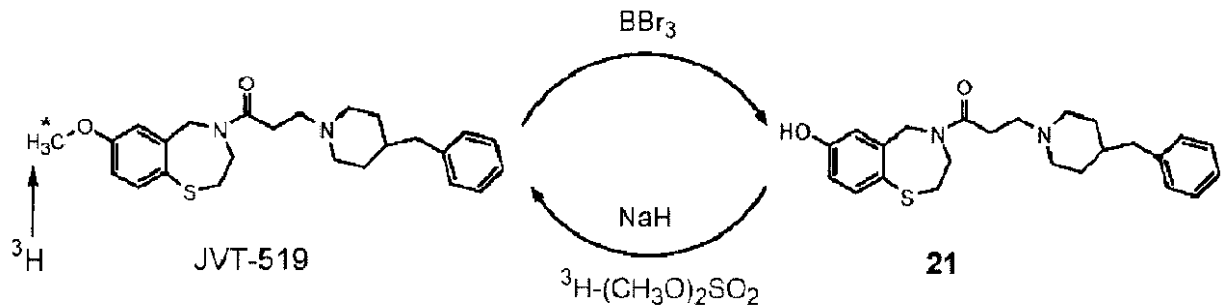
放射能標識 JTV-519 の合成

本発明者等の放射能標識 JTV-519 の新規な合成方法を下記の反応式 2 に示す。放射能標識 JTV-519 を調製するために、JTV-519 をフェニル環において BBr_3 を使用して脱メチル化させて、フェノール化合物(21)を得た。フェノール化合物(21)を、塩基(NaH)の存在下に、放射能標識メチル化剤(^3H -ジメチルスルフェート)により再メチル化して、 ^3H -標識 JTV-519 を調製した(反応式 2)。

反応式 2 :

【化 3 0】

Scheme 2



10

【0044】

上記発明を明確化及び理解を目的としてかなり詳細に説明してきたが、当業者であれば、上記の開示から、態様及び詳細における種々の変更を特許請求の範囲における本発明の真の範囲から逸脱することなくし得ることを認識されたい。

【図面の簡単な説明】

20

【0045】

【図 1】 JTV-519がFKBP12.6^{+/+}マウスの運動誘発性心室性不整脈を予防することを実証する。(A) 未治療FKBP12.6^{+/+}マウス、JTV-519で治療したFKBP12.6^{+/+}マウス、及びJTV-519で治療したFKBP12.6^{-/-}マウスの代表的な24時間心電図。心拍において或いは測定したECGパラメーターのいずれにおいても有意差はなかった。(B) 上方透写図：運動試験及び1.0mg/kgエピネフリン注射を受けた未治療FKBP12.6^{+/+}マウスにおいて記録した持続性多源性心室頻拍の例。中央透写図：同じプロトコル後のJTV-519治療FKBP12.6^{+/+}マウスの心電図；不整脈は、検出されなかった。下方透写図：JTV-519で治療したFKBP12.6^{-/-}マウスにおける運動誘発性心室頻拍(VT)。点線は、図中に示していない16.31秒のVTを示す。‘P’はP波を示し、心室頻拍後の洞律動を指標する。(C) JTV-519により治療した又は治療しなかったそれぞれのFKBP12.6^{+/+}マウス及びFKBP12.6^{-/-}マウスにおける突然心臓死(左側)、持続性心室頻拍(>10拍動数、中央)及び非持続性心室頻拍(3~10回の異常拍動数、右側)の数量化を示す棒グラフ。JTV-519による治療は、未治療FKBP12.6^{+/+}マウス(n = 10)又はJTV-519で治療したFKBP12.6^{-/-}マウス(n = 5)と比較したとき、JTV-519で治療したFKBP12.6^{+/+}マウス(n = 9)において運動-及びエピネフリン-誘発性不整脈を完全に予防しており、JTV-519が、FKBP12.6をRyR2に再結合させることにより、FKBP12.6^{+/+}マウスにおける不整脈及び突然死を予防することを示唆していたことに注目すべきである。

30

【0046】

【図 2】 JTV-519が、FKBP12.6^{+/+}マウス中のRyR2に対するFKBP12.6の親和性を増大させることにより、運動誘発性突然心臓死(SCD)を予防することを示す。(A~B) 心臓リアノジンレセプター(RyR2)を、RyR2-5029抗体を使用して免疫沈降させた。それぞれ、JTV-519の不存在又は存在下での安静条件下及び運動後の、野生タイプ(FKBP12.6^{+/+})マウス、FKBP12.6^{+/+}マウス及びFKBP12.6^{-/-}マウスにおけるRyR2、PKAリン酸化RyR2(RyR2-pSer²⁸⁰⁹抗体)及びFKBP12.6の定量化量を示すイムノプロット(A)及び棒グラフ(B)を示している。休息条件下においては、~70%のFKBP12.6がFKBP12.6^{+/+}マウス内のRyR2と結合している。運動試験後は、RyR2複合体と結合したFKBP12.6の量は、FKBP12.6^{+/+}マウスにおいて劇的に低下していたが、この低下はJTV-519による治療により救済し得ていた。(C) RyR2単チャンネルを、運動試験及びエピネフリン注入後に得た心臓から分離した。JTV-519による事前治療有り及び無しのFKBP12.6^{+/+}マウス由来のチャンネル、及びJTV-519事前治療後のFKBP12.6^{-/-}マウス由来のチャンネルを示している。RyR2チャンネル機能は、JTV-519により治療

40

50

した運動FKBP12.6^{+/+}マウスにおいて正常化されていることに注目すべきである。JTV-519治療後の運動FKBP12.6^{+/+}マウス由来の代表的な単チャンネルは、心臓内のFKBP12.6をJTV-519の作用において必要とすることを示している。点線は、不完全チャンネル開放又は‘伝導性低下’開放を示しており、FKBP12.6欠乏RyR2チャンネルを指標している。左の透写図は5.0秒を示しており、一方、右の透写図は500ミリ秒を示している。図中、Po = 開確率であり；To = 平均開放時間であり；Tc = 平均閉鎖時間であり；c = チャンネルの閉鎖状態である。(D) 単RyR2チャンネルの平均開確率(上記参照)を示す要約棒グラフ。JTV-519は、拡張期カルシウム濃度(150 nM)での運動試験後、FKBP12.6^{+/+}マウス由来のRyR2の開確率を劇的に低下させている。

【 0 0 4 7 】

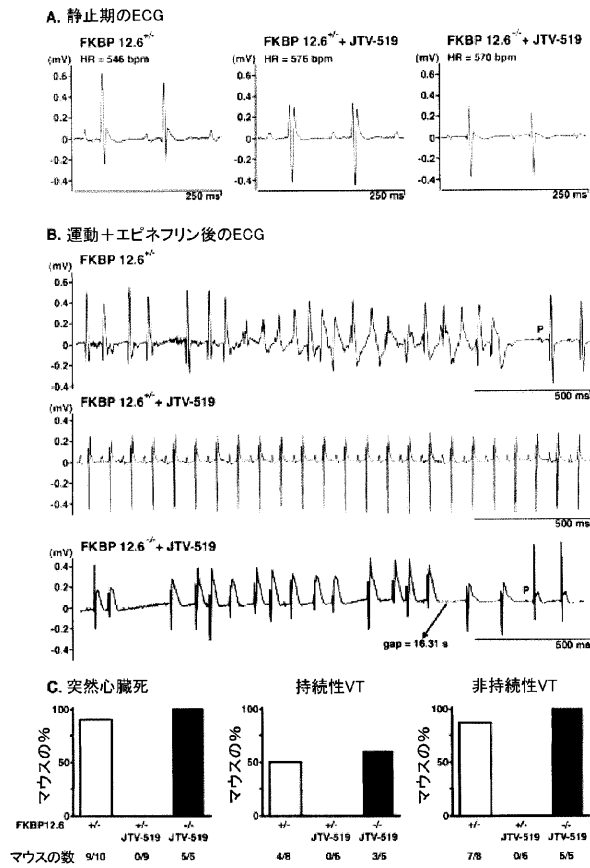
10

【図3】PKAリン酸化RyR2チャンネルに対する増大したFKBP12.6結合親和性によるJTV-519正常化RyR2チャンネル門通を示す。(A、B) イヌ心臓SR膜(A)及び組換え発現RyR2チャンネルを以前に開示されているようにして調製した(Kaftan et al., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca⁽²⁺⁾-release channels from cardiac muscle. Circ. Res., 78: 990-97, 1996)。(A) リアノジンレセプター(RyR2)を、PKA触媒サブユニット(40 U; Sigma Chemical社、ミズーリ州セントルイス)により、PKAインヒビター、PKI₅₋₂₄の存在又は不存在下にリン酸化緩衝液(8 mM MgCl₂、10 mM EGTA、及び50 mM Tris/PIPES; pH 6.8)中でリン酸化した。各サンプルを100,000 × gで10分間遠心分離し、イミダゾール緩衝液(10 mM イミダゾール; pH 7)中で3回洗浄した。組換え発現FKBP12.6(最終濃度 = 250 nM)を、各サンプルに、種々の濃度のJTV-519の不存在又は存在下に添加した。60分のインキュベーション後、各サンプル各サンプルを100,000 × gで10分間遠心分離し、イミダゾール緩衝液中で2回洗浄した。各サンプルを95 °Cに加熱し、SDS-PAGEを使用してサイズ分割した。SRミクロソームのイムノプロットイングは、以前に開示されているようにして(Jayaraman et al., FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). J. Biol. Chem., 267: 9474-77, 1992)、抗-FKBP12.6抗体(1:1000)及び抗-RyR2-5029抗体(1:3,000)により実施した。図は、JTV-519により、FKBP12.6が(A) PKAリン酸化RyR2(100 nMで部分的に結合; 1000 nMで完全結合)又は(B) 構造的にPKAリン酸化させたRyR2チャンネルであるRyR2-S2809D変異体チャンネルに結合可能であることを実証している。(C~E) 特定のPKAインヒビター、PKI₅₋₂₄の存在下でのPKAリン酸化(C)と比較したときの、PKAリン酸化後のRyR2 (D)の増大した開確率を示す単チャンネル試験。単チャンネル機能は、JTV-519の存在下にFKBP12.6と一緒にインキュベートしたPKAリン酸化RyR2 (E)において正常化されていた。チャンネル開放は上向きであり、ダッシュは完全開放のレベル(4 pA)を示し、文字‘c’は閉鎖状態を示す。チャンネルは、圧縮(5秒、上方透写図)及び拡大(500ミリ秒、下方透写図)時間尺度で示しており、記録は0 mVにおいてである。各増幅ヒストグラム(右側)は、JTV-519及びFKBP12.6による処理後ではないが、PKAリン酸化RyR2における活性増大と伝導度低下開放を明らかにしている。(F) 細胞質[Ca²⁺]の関数としての開確率の標準化プロット。JTV-519の存在下でのFKBP12.6と一緒にのPKAリン酸化RyR2のインキュベーションは、RyR2活性化のCa²⁺依存性を右方向にシフトさせ、この依存性を未リン酸化チャンネルのCa²⁺依存性と同様にした。

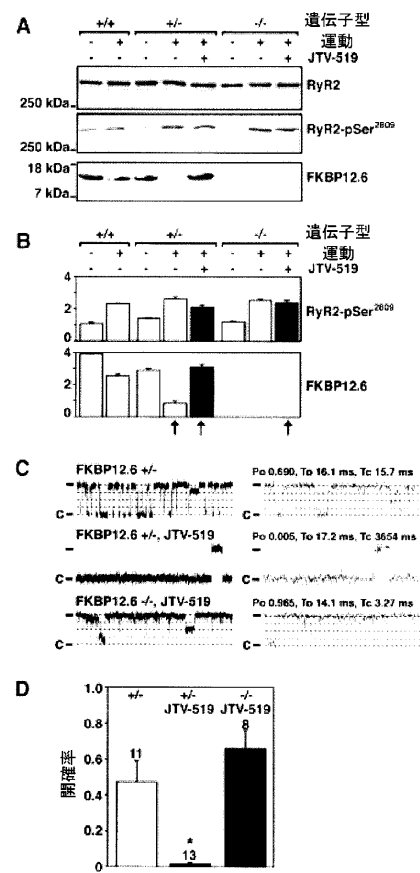
20

30

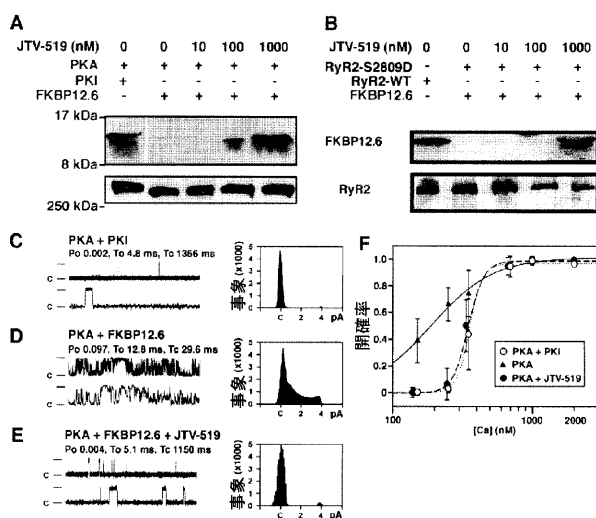
【図 1】



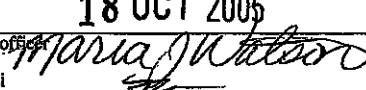
【図 2】



【図 3】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/32550		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 31/00; G01N, 33/53 US CL : 514/1; 435/4, 7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/1; 435/4, 7.1				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STNMEDLINE, BIOSIS, CAPLUS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	YANO et al, FKBP12.6-Mediated Stabilization of Calcium-Release Channel (Ryanodine Receptor) as a Novel Therapeutic Strategy Against Heart Failure. Circulation, January 2003, Vol 107, pages 477-484, especially pages 477, 478, 481-483.	1-18		
Y	MARKS et al, Involvement of the Cardiac Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. J. Cell. Physiol. January 2002, Vol 190, pages 1-6, especially pages 1 and 4.	1-18		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 12 August 2005 (12.08.2005)		Date of mailing of the international search report 18 OCT 2005		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  Ruixiang Li Telephone No. (571) 272-1600		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/32550

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-18

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/32550

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-6, 13-18, 25-32, and 40-47, drawn to a method for treating a subject afflicted with atrial tachyarrhythmia comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent which inhibits PKA phosphorylation of an RyR2 receptor or inhibits dissociation of a FKBP12.6 binding protein from an RyR2 receptor in the subject's heart.

Group II, claims 7, 8, 19, 20, 33-35, and 48-50, drawn to a method for treating a subject afflicted with atrial tachyarrhythmia comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent which mimics binding of a FKBP12.6 binding protein to an RyR2 receptor of the subject's heart.

Group III, claims 9-11, 21-23, 36-38, and 51-53, drawn to an article of manufacture comprising an agent which inhibits PKA phosphorylation of an RyR2 receptor or inhibits dissociation of a FKBP12.6 binding protein from an RyR2 receptor.

Group IV, claims 12, 24, 39, and 54, drawn to an article of manufacture comprising an agent which mimics binding of a FKBP12.6 binding protein to an RyR2 receptor.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:.

The special technical feature of Group I is considered to be a method for treating a subject afflicted with atrial tachyarrhythmia comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent which inhibits PKA phosphorylation of an RyR2 receptor or inhibits dissociation of a FKBP12.6 binding protein from an RyR2 receptor in the subject's heart.

The special technical feature of Group II is considered to be a method for treating a subject afflicted with atrial tachyarrhythmia comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent which mimics binding of a FKBP12.6 binding protein to an RyR2 receptor of the subject's heart.

The special technical feature of Group III is considered to be an article of manufacture comprising an agent which inhibits PKA phosphorylation of an RyR2 receptor or inhibits dissociation of a FKBP12.6 binding protein from an RyR2 receptor

The special technical feature of Group IV is considered to be an article of manufacture comprising an agent which mimics binding of a FKBP12.6 binding protein to an RyR2 receptor.

Since none of the special technical features of the Groups I-IV is found in more than one of the invention groups, unity is lacking.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 マークス アンドリュウ ロバート

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 5 3 8 ラーチモント ローカスト アベニュー 1 2

(72)発明者 ランドリー ドナルド ダブリュー

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 7 ニューヨーク クレアモント アベニュー 2 9

(72)発明者 デン シー シェン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 6 0 1 ホワイト プレインズ ヒルサイド テリトリー
3 3 ディー

(72)発明者 チェン ゼン ズアン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 1 3 7 3 エルムハースト ウッドヘヴン ブールヴァード
6 0 - 5 1 ファースト フロア

Fターム(参考) 4C036 AB03 AB06 AB13 AB20

4C086 AA01 AA02 AA04 BC92 NA14 ZA36 ZA38

4H039 CA71 CB30