

(11) Número de Publicação: **PT 1930007 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/495 (2007.10) **A61P 9/06** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.04.04**

(30) Prioridade(s): **2002.04.04 US 370150 P**
2002.09.05 US 408292 P
2002.10.30 US 422589 P

(43) Data de publicação do pedido: **2008.06.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.06.09**
158/2010

(73) Titular(es):

GILEAD PALO ALTO, INC.
333 LAKESIDE DRIVE FOSTER CITY CA 94404
US

(72) Inventor(es):

LUIZ BELARDINELLI US
BRENT BLACKBURN US
CHARLES ANTZELEVITCH US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE RANOLAZINA PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO
PARA O TRATAMENTO DE PÓS-DESPOLARIZAÇÕES PRECOCES (EAD)**

(57) Resumo:

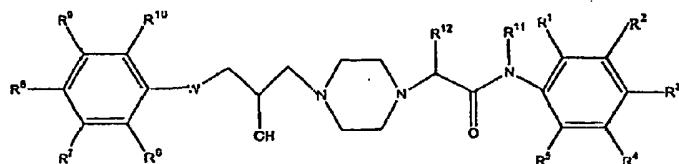
DESCRIÇÃO

"Utilização de ranolazina para a preparação de um medicamento para o tratamento de pós-despolarizações precoces (EAD)"

Campo do invento

Este invento refere-se a um composto seleccionado do grupo que consiste em:

um composto de Fórmula I:



Fórmula I

onde:

R¹, R², R³, R⁴ e R⁵ são cada um independentemente hidrogénio, alquilo inferior, alcoxi inferior, ciano, trifluorometilo, halo, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, ou alquilamido opcionalmente N-substituído, desde que quando R¹ é metilo, R⁴ não seja metilo; ou R² e R³ em conjunto formam -OCH₂O-;

R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ e R¹⁰ são cada um independentemente hidrogénio, acilo inferior, aminocarbonilmetilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, trifluorometilo, halo, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, ou di(alquil inferior)amino; ou R⁶ e R⁷ em conjunto formam -CH=CH-CH=CH-; ou R⁷ e R⁸ em conjunto formam -O-CH₂O-;

R¹¹ e R¹² são cada um independentemente hidrogénio ou alquilo inferior; e

W é oxigénio ou enxofre;

onde alquilo inferior se refere a uma cadeia de hidrocarboneto saturado não ramificada de 1-4 carbonos e acilo inferior se refere ao grupo RC(O)A, onde R é alquilo inferior e A representa o ponto de ligação,

um isómero de um composto de fórmula I, e um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis de um composto de Fórmula I ou de um seu isómero,

para utilização na supressão de pós-despolarizações precoces (EAD) num mamífero.

Informação de suporte

O coração é, essencialmente, uma bomba que é responsável por fazer circular o sangue através do corpo. Num coração funcionando normalmente esta circulação é causada pela geração de impulsos eléctricos que, por exemplo, aumentam ou diminuem o ritmo cardíaco e/ou a força de contracção em resposta às necessidades do sistema circulatório.

Os impulsos eléctricos do coração podem ser detectados electricamente e exibidos (o electrocardiograma, EKG), e a forma da onda eléctrica do EKG é caracterizada pela convenção aceite como o complexo "PQRST". O complexo PQRST inclui a onda P, que corresponde à onda de despolarização auricular; o complexo QRS, correspondendo à onda de despolarização ventricular; e a onda T, que representa a repolarização das células cardíacas. Assim, a onda P está associada com actividade nas câmaras superiores do coração, e o complexo QRS e a onda T reflectem ambos actividade nas câmaras inferiores.

Se o sinal eléctrico ficar de algum modo perturbado, a acção de bombagem eficiente do coração pode-se deteriorar, ou mesmo parar completamente. Uma perturbação no batimento rítmico regular do coração é uma das perturbações mais comuns observadas na doença cardíaca. Ritmos irregulares (arritmia) podem ser uma contrariedade menor, ou podem indicar um problema grave. Por exemplo, arritmias podem indicar uma anomalia subjacente do músculo cardíaco, válvulas ou artérias, e inclui a situação quando o coração está a bater demasiado lentamente (bradicardia) e também quando o coração está a bater demasiado rapidamente (taquicardia).

As taquicardias aparecem em duas variedades gerais: taquicardias supraventriculares e taquicardias ventriculares.

As taquicardias supraventriculares incluem taquicardia supraventricular paroxística (TSVP), fibrilhação auricular, flutter auricular, reentrada do nodo AV, e Síndroma de Wolff-Parkinson White (WPW). A taquicardia supraventricular (TSV) é uma condição na qual impulsos eléctricos que viajam através

do coração são anormais devido a um problema cardíaco algures acima das câmaras inferiores do coração. A TSV pode envolver ritmos cardíacos de 140 a 250 batimentos por minuto (o normal é cerca de 70 a 80 batimentos por minuto).

As taquicardias ventriculares incluem taquicardia ventricular propriamente dita, bem como fibrilhação ventricular e Torsade de Pointes (TdP). A taquicardia ventricular (TV) consiste no ritmo cardíaco rápido com origem nos ventrículos. A TV tende a quebrar a contracção ordenada do músculo ventricular, pelo que a capacidade do ventrículo para ejectar sangue é muitas vezes significativamente reduzida. Combinada com o ritmo cardíaco excessivo, isso pode reduzir a quantidade de sangue, que está realmente a ser bombeado pelo coração durante a TV, até níveis perigosos. Consequentemente, embora os pacientes com TV possam por vezes sentir-se relativamente bem, experimentam muitas vezes - para além das palpitações ubíquas - um atordoamento extremo, perda de consciência, ou mesmo morte súbita. Como regra geral, a TV não ocorre em pacientes sem doença cardíaca subjacente. Para pessoas com doença cardíaca subjacente, é geralmente verdade que quanto pior for a função ventricular esquerda, mais elevado o risco de desenvolvimento de taquicardias ventriculares com risco de vida.

As taquicardias ventriculares podem surgir em situações de isquemia do miocárdio tais como angina instável, angina crónica, angina variante, enfarte do miocárdio, síndroma coronária aguda e, adicionalmente, em insuficiência cardíaca, tanto aguda como crónica.

Existe uma condição conhecida como prolongamento anormal da repolarização, ou Síndrome de QT longo (SQTL), que é reflectida por um intervalo mais longo do que a média entre a onda Q e a onda T conforme medido por um EKG. O prolongamento do intervalo QT torna os pacientes vulneráveis a um ritmo cardíaco anormal (uma "arritmia") muito rápido conhecido por Torsade de Pointes. Quando ocorre uma arritmia, não é bombeado sangue a partir do coração, e o cérebro fica rapidamente privado de sangue, causando uma perda súbita de consciência (síncope) e potencialmente conduzindo a morte súbita.

A SQTL é causada por disfunção dos canais de iões do coração ou por fármacos. Estes canais controlam o fluxo de iões potássio, iões sódio e iões cálcio, cujo fluxo para dentro e para fora das células gera a actividade eléctrica do coração. Os pacientes com SQTL não têm usualmente qualquer doença cardíaca estrutural subjacente identificável. A SQTL pode ser hereditária, com a propensão para desenvolver uma variedade particular de taquicardia ventricular sob certas circunstâncias, por exemplo exercício, a administração de certos agentes farmacológicos, ou mesmo durante o sono. Alternativamente, os pacientes podem adquirir SQTL, por exemplo por exposição a certas medicações de prescrição.

A forma adquirida de SQTL pode ser causada por agentes farmacológicos. Por exemplo, estima-se que a incidência de Torsade de Pointes (TdP) em pacientes tratados com quinidina esteja na gama de 2,0 e 8,8%. O DL-sotalol tem sido associado com uma incidência na gama de 1,8 a 4,8%. Uma incidência similar tem sido descrita para agentes antiarrítmicos da classe III mais recentes, tais como dofetilida e ibutilida. De facto, tem sido mostrado que um número sempre crescente de agentes não cardiovasculares agrava e/ou precipita a TdP. Mais de 50 fármacos disponíveis comercialmente têm sido noticiados por causarem TdP. Este problema parece surgir mais frequentemente com fármacos mais recentes e vários têm sido retirados do mercado nos últimos anos (e.g. prenilamina, terodilina, e alguns países terfenadina, astemizole e cisaprida). Tem sido mostrado que a TdP induzida por fármacos se desenvolve grandemente como consequência de um aumento em dispersão de repolarização secundária ao aumento das heterogeneidades eléctricas intrínsecas do miocárdio ventricular.

A maioria dos agentes farmacológicos que são capazes de produzir repolarização prolongada e SQTL adquirida podem ser agrupados como actuando predominantemente através de um de quatro mecanismos diferentes (1) um atraso de uma ou de ambas as correntes de K, I_{Ks} e I_{Kr} . Exemplos são quinidina, N-acetilprocainamida, césio, sotalol, bretílio, clofílio e outros novos agentes antiarrítmicos da Classe III (esta acção pode ser especificamente antagonizada por fármacos que activam o canal de K, tais como pinacidil e cromacalina); (2) supressão de I_{to} , como no caso de 4-aminopiridina, que mostrou prolongar a repolarização e induzir EAD

preferencialmente em células M subepicárdicas caninas, noticiadas por terem I_{to} proeminente; (3) um aumento em I_{Ca} , como no caso de Bay K 8644 (esta acção pode ser revertida por bloqueadores do canal de Ca); (4) um atraso de inactivação de I_{Na} , como no caso de aconitina, veratridina, batracotoxina, DPI, e as toxinas de anémona do mar (ATX) antopleurina-A (AP-A) e ATX-II (esta acção pode ser antagonizada por fármacos que bloqueiam I_{Na} , e/ou inactivam lentamente a corrente de Na, tais como lidocaína e mexiletina). Porque estes fármacos (e.g., lidocaína e mexiletina) podem encurtar a repolarização prolongada, podem também suprimir EAD induzidas pelos dois primeiros mecanismos.

A lista de fármacos que causam SQTL e TdP está continuamente a aumentar. Literalmente, qualquer agente farmacológico que possa prolongar QT pode induzir SQTL. A incidência de TdP não tem sido correlacionada com as concentrações no plasma de fármacos conhecidos por precipitarem esta arritmia. Contudo, concentrações elevadas no plasma, resultantes de dose excessiva ou de metabolismo reduzido de alguns destes fármacos, podem aumentar o risco de precipitarem a TdP. Este metabolismo reduzido pode resultar da utilização concomitante doutros fármacos que interferem com enzimas de citocromo P₄₅₀. Medicações noticiadas por interferirem com o metabolismo de alguns fármacos associados com TdP incluem cetoconazole sistémico e fármacos estruturalmente similares (fluconazole, itraconazole, metronidazole); inibidores de reabsorção de serotonina (fluoxetina, fluvoxamina, sertralina), e outros antidepressivos (nefazodona), inibidores de protease de vírus de imunodeficiência de humano (HIV) (indinavir, ritonavir, saquinavir); bloqueadores do canal de cálcio de dihidropiridina (felodipina, nicardipina, nifedipina) e eritromicina, e outros antibióticos de macrólido. A toranja e o sumo de toranja podem também interactuar com alguns fármacos por interferência com enzimas citocromo P₄₅₀. Alguns dos fármacos têm sido associados com TdP, não tanto pelo facto de prolongarem o intervalo QT, mas porque são inibidores principalmente de P4503A4, e desse modo aumentam a concentração no plasma de outros agentes de prolongamento QT. O melhor exemplo é o cetoconazole e o itraconazole, que são inibidores potentes da enzima e desse modo contribuem para TdP durante a terapia com terfenadina, astemizole ou cisaprida. Por outro lado, a incidência de TdP associada a

fármacos tem sido muito baixa com alguns fármacos: difenidramina, fluconazole, quinina, lítio, indapamida e vasopressina. Será também de notar que a TdP pode resultar da utilização de fármacos que causam o prolongamento QT em pacientes com condições médicas, tais como disfunção hepática ou SQTL congénita, ou em pacientes com perturbações de electrólito (particularmente hipocalémia e hipomagnesemia).

No entanto, existem fármacos antiarrítmicos que são conhecidos por prolongarem o intervalo QT mas que não induzem TdP. Constatou-se que uma propriedade comum destes fármacos é a capacidade para inibir concorrentemente outras correntes de iões tais como os canais I_{Na} , e/ou o canal I_{Ca} .

A forma hereditária de SQTL ocorre quando se desenvolve uma mutação em um de vários genes que produzem ou "codificam" um dos canais de iões que controlam a repolarização eléctrica. Existem pelo menos cinco formas diferentes de SQTL hereditária, caracterizadas como LQT1, LQT2, LQT3, LQT4 e LQT5. Foram originalmente caracterizadas pela forma diferente do traçado do EKG, e têm sido associadas subsequentemente com mutações genéticas específicas. A forma LQT1, a partir das mutações do gene KCNQ1 (KVLQT1) ou KCNE1 (MinK), é a mais frequente, contribuindo para aproximadamente 55-60% dos pacientes do genótipo. A LQT2, a partir das mutações HERG ou KCNE2 (MiRPl), é a seguinte com cerca de 35-40%, e a LQT3, a partir das mutações SCN5A contribui para cerca de 3-5%. Os pacientes com duas mutações parecem contribuir para menos de 1% de todos os pacientes, mas isto pode alterar-se à medida que mais pacientes forem estudados com as técnicas genéticas mais recentes.

O gene mutante causa a formação de canais anormais, e como estes canais não funcionam adequadamente, a recuperação eléctrica do coração demora mais tempo, o que se manifesta em si mesma como um intervalo QT prolongado. Por exemplo, uma deleção hereditária de resíduos aminoácido 1505-1507 (KPQ) no canal de Na^+ cardíaco, codificado por SCN5A, provoca a síndrome LQT3 dominante autossómica grave, associada com arritmias ventriculares fatais. Ocorrem arritmias fatais em 39% de pacientes de LQT3 durante o sono ou repouso, presumivelmente porque a corrente de Na^+ tardia em excesso prolonga anormalmente a repolarização, particularmente para ritmos cardíacos baixos, e desse modo favorece o

desenvolvimento de pós-despolarizações precoces (EAD) e batimentos ectópicos. O abrandamento preferencial da repolarização no miocárdio médio pode adicionalmente aumentar a dispersão de repolarização transmural e causar bloqueio unidireccional e arritmias reentrantes. Noutros 32% de pacientes de LQT3, são desencadeados eventos cardíacos fatais por exercício ou emoções.

Foi recentemente noticiado que uma variante do gene do canal de sódio cardíaco SCN5A estava associada a arritmias em afro-americanos. Análises do polimorfismo de conformação de cadeia simples (SCCP, "Single-strand conformation polymorphism") e da sequência de ADN revelaram uma mutação transversa heterozigótica de C para A no codão 1102 de SCN5A causando uma substituição de serina (S1102) por tirosina (Y1102). O S1102 é um resíduo conservado localizado nas sequências intracelulares que ligam os domínios II e III do canal. Estes investigadores constataram que o alelo Y1102 aumentava a susceptibilidade à arritmia. Verificou-se que o QT_c (QT corrigido) era nitidamente prolongado com amiodarona, conduzindo a taquicardia ventricular Torsade de Pointes.

Existe uma necessidade de um agente para tratar ou prevenir a SQTL hereditária ou adquirida de um modo que reduza o risco de arritmia e TdP. Foi anteriormente demonstrado que a ranolazina é um agente eficaz para o tratamento de angina não causando quaisquer efeitos ou apenas efeitos mínimos no ritmo cardíaco ou na pressão sanguínea. Constatámos agora surpreendentemente que a ranolazina e compostos relacionados são agentes eficazes para a profilaxia e/ou tratamento de arritmia hereditária ou adquirida.

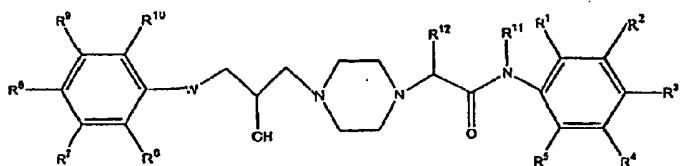
Surpreendentemente, constatámos que compostos que inibem canais de iões I_{Kr}, I_{KS} e I_{Na} tardio exibem este espectro de actividade preferido. Estes compostos prolongam a duração do potencial de acção ventricular, aumentam o período refractário efectivo ventricular, diminuem a TDR, aumentam a APD, e não produzem EAD. Por exemplo, constatou-se que a ranolazina, que é conhecida por ser útil no tratamento de angina e de insuficiência cardíaca congestiva, é útil no tratamento de taquicardia ventricular em virtude da sua capacidade para inibir os canais de iões I_{Kr}, I_{KS} e I_{Na} tardio para níveis de dose que não bloqueiam os canais de cálcio. Isto é particularmente surpreendente uma vez que a Patente

U.S. n.º 4567264 revela que a ranolazina é um fármaco cardiosseletivo que inibe os canais de iões cálcio e sugere que, como consequência do seu efeito para bloquear os canais de cálcio, pode ser útil no tratamento de múltiplos estados de doença incluindo arritmia. Contudo, constatámos que a ranolazina actua como um agente antiarrítmico eficaz em níveis que têm pouco ou nenhum efeito sobre o canal de cálcio. A ausência de efeito ou o efeito mínimo sobre a actividade do canal de cálcio em níveis de dose terapêutica é benéfica pelo facto de prevenir os efeitos bem conhecidos dos inibidores do canal de iões cálcio (e.g., alterações em pressão sanguínea) que são indesejáveis quando se trata a arritmia num paciente. Constatámos também que a ranolazina é eficaz em suprimir EAD e a actividade provocada que são um efeito colateral da administração de fármacos tais como quinidina e sotalol.

Deste modo, é proporcionado um novo e eficaz método de tratamento de TV que restaura o ritmo sinusal estando virtualmente isento de efeitos colaterais indesejáveis, tais como alterações em pressão arterial média, pressão sanguínea, ritmo cardíaco, ou outros efeitos adversos.

Sumário do invento

É um objecto deste invento proporcionar um método eficaz para supressão de pós-despolarização precoce (EAD) num mamífero. Em conformidade, num primeiro aspecto, o invento refere-se a um composto de Fórmula I:



Fórmula I

onde:

R¹, R², R³, R⁴ e R⁵ são cada um independentemente hidrogénio, alquilo inferior, alcoxi inferior, ciano, trifluorometilo, halo, alquistio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, ou alquilamido opcionalmente N-substituído, desde que quando R¹ é metilo, R⁴ não seja metilo; ou R² e R³ em conjunto formam -OCH₂O-;

R^6 , R^7 , R^8 , R^9 e R^{10} são cada um independentemente hidrogénio, acilo inferior, aminocarbonilmetilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, trifluorometilo, halo, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfônico inferior, ou di(alquilo inferior)amino; ou R^6 e R^7 em conjunto formam $-CH=CH-CH=CH-$; ou

R^7 e R^8 em conjunto formam $-O-CH_2O-$;

R^{11} e R^{12} são cada um independentemente hidrogénio ou alquilo inferior; e

W é oxigénio ou enxofre;

ou um seu isómero, ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis de um composto de Fórmula I ou do seu isómero, para utilização na supressão de pós-despolarização precoce num mamífero.

Um composto preferido é a ranolazina, que é denominada N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-1-piperazinoacetamida {também conhecida como 1-[3-(2-metoxifenoxi)-2-hidroxipropil]-4-[(2,6-dimetilfenil)amino-carbonilmetil]piperazina}, como uma mistura racémica, ou um seu isómero, ou um seu sal farmaceuticamente aceitável. É preferivelmente administrado para níveis de dose que inibem os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio mas não inibem canais de cálcio ou outros canais de iões. A ranolazina, como uma mistura racémica ou como um isómero, pode ser formulada quer como base livre quer como um sal farmaceuticamente aceitável. Se formulada como um sal farmaceuticamente aceitável, prefere-se o sal de dicloridrato.

Num segundo aspecto, o invento refere-se a um método de supressão de pós-despolarização precoce num mamífero, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de ranolazina, ou um seu isómero, ou um sal farmaceuticamente aceitável do composto ou do seu isómero, a um mamífero disso necessitado.

Num terceiro aspecto, o invento refere-se a um método para supressão de pós-despolarização precoce num mamífero compreendendo a administração de ranolazina, ou um seu isómero, ou um sal farmaceuticamente aceitável do composto ou do seu isómero, num nível de dose que inibe os canais de iões

I_{Na} tardio. É preferida uma quantidade terapêutica que inibe os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio. É mais preferida uma quantidade terapêutica que inibe os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio mas não inibe os canais de cálcio.

Numa concretização preferida, os compostos do invento são administrados de um modo que proporciona um nível no plasma do composto de Fórmula I de pelo menos 350 ± 30 ng/mL durante pelo menos 12 horas.

Numa segunda concretização, os compostos do invento são administrados como uma formulação de libertação prolongada que mantém concentrações no plasma do composto de Fórmula I inferiores a um máximo de 4000 ng/mL, preferivelmente entre cerca de 350 e cerca de 4000 ng base/mL, durante pelo menos 12 horas.

Numa terceira concretização preferida, os compostos do invento são administrados numa formulação que contém entre cerca de 10 mg e 700 mg de um composto de Fórmula I. Um composto preferido de Fórmula I é ranolazina, ou um seu isómero, ou um sal farmaceuticamente aceitável do composto ou um seu isómero.

Numa quarta concretização preferida, os compostos do invento são administrados numa formulação que proporciona um nível de dose de cerca de 1 a cerca de 30 micromoles por litro da formulação. Prefere-se a administração de uma formulação que proporciona um nível de dose de cerca de 1 a cerca de 10 micromoles por litro da formulação.

Num quarto aspecto, este invento refere-se a um método de supressão de pós-despolarização precoce num mamífero compreendendo a administração de uma quantidade terapêutica de um composto de Fórmula I em níveis de dose que inibem os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio mas não inibem canais de cálcio.

Num quinto aspecto, este invento refere-se a um método de supressão de pós-despolarização precoce num mamífero por administração de um composto de Fórmula I como um bólus de um modo que proporciona um nível no plasma do composto de Fórmula I de pelo menos 350 ± 30 ng/mL durante pelo menos 12 horas.

Num sexto aspecto, este invento refere-se a um método de supressão de pós-despolarização precoce num mamífero por administração de um composto de Fórmula I como uma formulação de libertação prolongada de um modo que mantém um nível no plasma do composto de Fórmula I inferior a um máximo de 4000 ng/ml, preferivelmente entre cerca de 350 e cerca de 4000 ng de base/mL durante pelo menos 12 horas.

Num sétimo aspecto, este invento refere-se a métodos de supressão de pós-despolarização precoce num mamífero onde um composto de Fórmula I ou um seu isómero, ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis do composto ou do seu isómero é administrado por um bólus ou por uma composição de libertação prolongada.

Num oitavo aspecto, este invento refere-se a métodos de supressão de pós-despolarização precoce num mamífero onde um composto de Fórmula I ou um seu isómero, ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis do composto ou do seu isómero, é administrado intravenosamente.

Num nono aspecto, este invento refere-se à utilização de um composto de Fórmula I ou de um seu isómero, ou de um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis do composto ou do seu isómero para o fabrico de uma composição farmacêutica para supressão de pós-despolarização precoce num mamífero.

Abreviaturas

APD: Duração do potencial de acção

BCL: duração de ciclo básico

EAD: Pós-despolarização precoce

ECG e EKG: Electrocardiograma

I_{Kr} : corrente de rectificação do canal de potássio rápido

I_{Ks} : corrente de rectificação do canal de potássio lento

$I_{Na,L}$: corrente do canal de sódio tardio

Células epi: Células epicárdicas

Células endo: Células endocárdicas

SQTL: síndroma de QT longo

Células M: células obtidas a partir da região do miocárdica médio do coração

RMP: Potencial de membrana em repouso

TdP: Torsade de Pointes

TDR dispersão de repolarização transmural

TV: taquicardia ventricular

Legendas das figuras

Figura 1. A relação entre um potencial de acção hipotético a partir do sistema de condução e o intervalo de tempo das correntes que o geram.

Figura 2. Propagação de impulsos normal.

Figura 3. Efeito de ranolazina no componente de activação rápida da corrente rectificadora retardada (I_{Kr}) em miócitos de ventrículo esquerdo canino. A: traçados de corrente representativos registados durante impulsos de 250 ms até 30 mV desde um potencial de repouso (*holding potential*) de -40 mV e repolarização de novo até -40 mV antes e após ranolazina (50 μ M). Banharam-se as células em solução de Tyrode contendo nifedipina 5 μ M. B: Curvas de concentração-resposta para os efeitos inibidores de ranolazina na I_{Kr} . Mediu-se a I_{Kr} como a corrente de cauda na repolarização até -40 mV após um impulso de despolarização de 250 ms até 30 mV ($n = 5-8$).

Figura 4. A ranolazina inibe o componente de activação lenta da corrente rectificadora retardada (I_{Ks}). A: Traçados de corrente I_{Ks} representativos registados a partir de uma experiência típica em miócitos epicárdicos de ventrículo esquerdo canino na presença e na ausência de ranolazina 100 μ M. As correntes foram induzidas por um passo de despolarização até 30 mV durante 3 s a partir de um potencial de repouso de -50 mV seguido por um passo de repolarização até 0 mV (4,5 s). Mediu-se a I_{Ks} como a corrente de cauda registada após o passo de repolarização. A ranolazina (100 μ M) bloqueou quase completamente a I_{Ks} e o efeito inibidor foi completamente revertido na lavagem. B: Curva concentração-resposta para o efeito inibidor de ranolazina na I_{Ks} (medida como a corrente de cauda induzida pelo passo de repolarização até 0 mV após um passo de despolarização de 3 s até 30 mV) ($n = 5-14$) na presença de E-4031 5 μ M e nifedipina 5 μ M. Os valores representam a média±EPM da corrente de cauda normalizada. A ranolazina inibiu a I_{Ks} com uma IC_{50} de 13,4 μ M.

Figura 5. A ranolazina não afecta I_{K1} em miócitos de ventrículo canino. A: Mostram-se traçados representativos de corrente registados antes e após exposição a ranolazina

(100 μ M) durante passos de voltagem desde um potencial de repouso de -40 mV até potenciais de teste de 900 ms na gama entre -100 e 0 mV. B: Relações I-V em estado estacionário obtidas representando graficamente o nível de corrente medido no final do impulso de 900 ms em função das voltagens de teste. A ranolazina até uma concentração de 100 μ M, não alterou a I_{K1} . Os resultados são apresentados como a média \pm DP ($n = 6$).

Figura 6. Efeitos de ranolazina nos potenciais de acção de células M e epicárdicas para uma duração de ciclo básico (BCL) de 2000 ms ($[K^+]_0 = 4$ mM). A: Mostram-se potenciais de acção transmembranar sobrepostos registados sob condições de linha de base e após adição de concentrações progressivamente mais elevadas de ranolazina (1-100 μ M). B e C: Os gráficos representam o efeito dependente da concentração de ranolazina na duração do potencial de acção (APD₅₀ e APD₉₀). Os resultados apresentados são a média \pm DP. * $p<0,05$ vs. controlo.

Figura 7. Efeito de ranolazina na duração do potencial de acção (APD₅₀ e APD₉₀) de células epicárdicas e M para uma duração de ciclo básico de 500 ms ($[K^+]_0 = 4$ mM). Os gráficos representam o efeito dependente da concentração de ranolazina na duração do potencial de acção (APD₅₀ e APD₉₀). Os resultados apresentados são a média \pm DP. * $p<0,05$ vs. Controlo.

Figura 8. Efeito de ranolazina na velocidade de elevação do disparo (*upstroke*) do potencial de acção (V_{max}). Mostram-se potenciais de acção sobrepostos (B) e os disparos diferenciados correspondentes (dV/dt , A) registados sob condições de linha de base e na presença de ranolazina 10 e 100 μ M (BCL = 500 ms). C: Relação concentração-resposta do efeito de ranolazina para reduzir V_{max} .

Figura 9. Efeitos de ranolazina nos potenciais de acção de células epicárdicas e M registados para uma duração de ciclo básico de 2000 ms e $[K^+]_0 = 2$ mM. A: Mostram-se potenciais de acção transmembranar sobrepostos registados na ausência e na presença de ranolazina (1-100 μ M). B e C: Os gráficos representam o efeito dependente da concentração de ranolazina na duração do potencial de acção (APD₅₀ e APD₉₀). Os resultados são a média \pm DP. * $p<0,05$ vs. controlo.

Figura 10. Efeitos de ranolazina na duração do potencial de accção (APD_{50} e APD_{90}) de células epicárdicas e M para uma duração de ciclo básico de 500 ms ($[K^+]_0 = 2\text{ mM}$). Os gráficos representam o efeito dependente da concentração de ranolazina na duração do potencial de accção (APD_{50} e APD_{90}). Os resultados são a média \pm DP. * $p<0,05$ vs. controlo.

Figura 11. Cada painel mostra, de cima para baixo, um traçado de ECG e potenciais de accção transmembranar registados a partir do miocárdio médio (região M) e epicárdio (Epi) da preparação em fatia de ventrículo esquerdo de canino perfundida arterialmente para uma duração de ciclo básico (BCL) de 2000 ms. Os sinais sobrepostos representam as condições de linha de base (Controlo) e o efeito de ranolazina numa gama de concentrações de 1-100 μM . A: Realizado utilizando solução de Tyrode contendo KCl 4 mM para perfundir a fatia. B: Realizado utilizando solução de Tyrode contendo KCl 2 mM.

Figura 12. Resultados compostos ilustrando graficamente os valores de APD_{90} (de Epi e M) e do intervalo QT (A, C) e os valores de APD_{50} (B, D) antes e após exposição a ranolazina (1-100 μM). A, B: KCl 4 mM. C, D: KCl 2 mM. BCL = 2000 ms.

Figura 13. Efeito de ranolazina para suprimir pós-despolarizações precoces (EAD) induzidas por d-sotalol em preparações de células M. A e B: Potenciais de accção transmembranar sobrepostos registados a partir de duas preparações de células M sob condições de controlo, na presença de bloqueio de I_{Kr} (d-sotalol μM), e após a adição de concentrações de ranolazina aumentadas por passos (5, 10 e 20 μM) na presença continuada de d-sotalol. Duração de ciclo básico = 2000 ms.

Figura 14. Bloqueio de I_{Na} tardia por ranolazina registado utilizando a técnica de voltage clamp de adesivo perfurado. A: Mostram-se correntes sensíveis TTX em solução de controlo (traçado a preto) e após ranolazina 20 μM (traçado a vermelho). B: Gráfico resumo da curva concentração-resposta para 2-8 células.

Figura 15. Efeitos de ranolazina em I_{to} . Registaram-se as correntes durante passos de 100 ms até -10 (pequena corrente para o exterior), 0 e 10 mV. I_{to} registada em solução de

controlo (esquerda, traçados a preto), e 4 min após adição de ranolazina 50 μM (direita, traçados a vermelho).

Figura 16. Resultados resumidos para os efeitos de ranolazina na I_{to} para 3 potenciais de teste para concentrações de 10 μM (9 células), 20 μM (9 células), 50 μM (6 células) e 100 μM (7 células).

Figura 17. I_{to} normalizada e os efeitos de ranolazina. Estes resultados são os mesmos que foram apresentados na figura 4.

Figura 18. O painel superior mostra traçados sobrepostos de $I_{\text{Na-Ca}}$ em solução de controlo, 4 min após adição de ranolazina 100 μM , e após retorno à solução de controlo (traçado a vermelho). O painel inferior da figura mostra a curva de concentração-resposta.

Figura 19. Curvas concentração-resposta para I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Ca} , $I_{\text{Na,tardia}}$ e I_{NaCa} num único gráfico. I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardia mostraram sensibilidades similares à ranolazina, enquanto que I_{NaCa} e I_{Ca} eram consideravelmente menos sensíveis.

Figura 20. Efeitos de ranolazina no potencial de acção de fibras Purkinje. A e B: Os gráficos representam efeitos dependentes da concentração de ranolazina (1-100 μM) na duração do potencial de acção (APD_{50} e APD_{90}) para uma BCL de 500 (A) e 2000 (B) ms. C e D: Potenciais de acção transmembranar sobrepostos registados sob condições de linha de base e após a adição de concentrações progressivamente mais elevadas de ranolazina para uma BCL de 500 (C) e 2000 (D) ms. ($[\text{K}^+]_0 = 4 \text{ mM}$). Os resultados são apresentados como a média \pm DP. * $p < 0,05$ vs. controlo.

Figura 21. Efeitos dependentes da concentração de ranolazina na velocidade de elevação do disparo do potencial de acção (V_{max}). Mostram-se potenciais de acção sobrepostos (B) e disparos diferenciados correspondentes (dV/dt , A) registados na ausência e na presença de ranolazina (1-100 μM) (BCL = 500 ms). C: Relação concentração-resposta do efeito de ranolazina para reduzir V_{max} .

Figura 22. Efeitos de ranolazina no potencial de acção de fibras Purkinje na presença de $[\text{K}^+]_0$ baixa. A e B: Os gráficos representam efeitos dependentes da concentração de

ranolazina (1-100 μ M) na duração do potencial de acção (APD₅₀ e APD₉₀) para uma BCL de 500 (A) e 2000 (B) ms. ($[K^+]$ ₀ = 3 mM). Os resultados são apresentados como a média±DP. * p<0,05 vs. controlo.

Figura 23. Efeito de ranolazina para suprimir pós-despolarização precoce (EAD) induzida por d-sotalol numa preparação de fibras Purkinje. Mostram-se potenciais de acção transmembranar sobrepostos registados a partir de uma preparação de fibras Purkinje na presença de bloqueio de I_{Kr} (d-sotalol 100 μ M), e após adição de concentrações aumentadas por passos de ranolazina (5 e 10 μ M) na presença continuada de d-sotalol. Duração de ciclo básico = 8000 ms.

Figuras 24 A e B. Resultados electrofisiológicos globais para sotalol. Mostram-se os efeitos de sotalol no ERP ventricular direito e esquerdo em ms.

Figuras 25 A e B. Resultados electrofisiológicos globais para sotalol. Mostram-se os efeitos de sotalol nos intervalos QT e QRS em ms.

Figura 26. Resultados electrofisiológicos globais para ranolazina. Mostram-se os efeitos de ranolazina no ERP ventricular direito e esquerdo em ms.

Figura 27. Resultados electrofisiológicos globais para ranolazina. Mostram-se os efeitos de ranolazina no ERP-LV médio.

Figura 28. Resultados electrofisiológicos globais para ranolazina. Mostram-se os efeitos de ranolazina no intervalo QT em ms.

Figura 29. Resultados electrofisiológicos globais para ranolazina. Mostram-se os efeitos de ranolazina no intervalo QRS.

Figura 30. Bloqueio de I_{Na} tardia por ranolazina registado utilizando a técnica de *voltage clamp* do potencial de acção. A: Mostram-se correntes sensíveis a TTX em solução de controlo e após ranolazina 20 μ M. Efectuaram-se as medições nos dois cursores, correspondendo a voltagens de 20 mV e -28 mV. A inibição foi maior para 20 mV, mas alguma corrente

sensível a TTX permanece para -28 mV na presença de ranolazina. Permanece também corrente sensível a TTX precocemente no potencial de acção na presença de ranolazina.

Figura 31. Bloqueio de I_{Na} , tardia por ranolazina. BCL 2000 ms. Gráfico resumo da curva concentração-resposta. As barras de erro são \pm e.p.m., número de células 3-11 células.

Figura 32. Bloqueio de I_{Na} , tardia por ranolazina. BCL 300 ms. Gráfico resumo da curva concentração-resposta. As barras de erro são \pm e.p.m., número de células 6-10 células.

Figura 33. Resultados resumidos para os efeitos de ranolazina na I_{Na} , tardia para frequências de estimulação lentas e rápidas. As barras de erro são \pm e.p.m., número de células 6-12 células.

Figura 34. O efeito de ranolazina para 3, 10 e 30 μ mol/L na duração do potencial de acção de miócitos.

Figura 35. Os efeitos de ranolazina para 30 μ mol/L num miócito primeiro ritmado (*paced*) a 2 Hz e depois a 0,5 Hz.

Figura 36. A comparação de APD₅₀ e APD₉₀ medidas na ausência e na presença de 3, 10 e 30 μ mol/L de ranolazina para frequências de *pacing* de 0,5, 1 e 2 Hz.

Figura 37. Efeitos de ranolazina, diminuição de APD₅₀ e APD₉₀ para várias frequências de *pacing*. Normalizados como percentagem de controlo.

Figura 38. Efeito de quinidina para 5 μ mol/L na duração do potencial de acção de um miócito ritmado a 0,25 Hz. Para 10 μ mol/L a ranolazina atenuou o efeito de quinidina.

Figura 39. Efeitos de quinidina e/ou de ranolazina nas EAD. Constatou-se que a ranolazina para 10 μ mol/L era eficaz na supressão de EAD induzidas por quinidina.

Figura 40. Efeitos de quinidina e/ou de ranolazina na actividade provocada. Constatou-se que a ranolazina para 10 μ mol/L era eficaz em suprimir a actividade provocada induzida por quinidina.

Figura 41. Efeitos de ATXII e/ou de ranolazina para 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ na duração do potencial de acção em miócitos ventriculares de cobaia.

Figura 42. Efeitos de ATXII e/ou de ranolazina para 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ na duração do potencial de acção em miócitos ventriculares de cobaia. A ranolazina numa concentração tão baixa quanto 1 $\mu\text{mol/L}$ aboliu eficazmente EAD e actividade provocada induzidas por ATXII.

Figura 43. Efeitos de ATXII e/ou de ranolazina para 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ na duração do potencial de acção em miócitos ventriculares de cobaia. A ranolazina numa concentração tão baixa quanto 1 $\mu\text{mol/L}$ aboliu eficazmente EAD e actividade provocada induzidas por ATXII.

Figura 44. Efeitos de ATXII e/ou de ranolazina para 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ na duração do potencial de acção em miócitos ventriculares de cobaia. A ranolazina numa concentração tão baixa quanto 1 $\mu\text{mol/L}$ aboliu eficazmente EAD e actividade provocada induzidas por ATXII.

Figura 45. Figura 42. Efeitos de ATXII e/ou de ranolazina para 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ na duração do potencial de acção em miócitos ventriculares de cobaia. A ranolazina numa concentração tão baixa quanto 1 $\mu\text{mol/L}$ aboliu eficazmente EAD e actividade provocada induzidas por ATXII.

Figura 46. Efeitos de ATXII e/ou de ranolazina para 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ na duração do potencial de acção em miócitos ventriculares de cobaia. A ranolazina numa concentração tão baixa quanto 1 $\mu\text{mol/L}$ aboliu eficazmente EAD e actividade provocada induzidas por ATXII.

Figura 47. Efeitos de ATXII e ranolazina para 10 μM em EAD e prolongamento de MAP induzidos no modelo de coração isolado de cobaia perfundido com tampão K-H. A ranolazina numa concentração tão baixa quanto 10 $\mu\text{mol/L}$ reduziu ou aboliu eficazmente EAD e prolongamento de MAP induzidos por ATXII.

Figura 48. Efeitos de ATXII na TV. ATXII (20 nM) induziu TV, tanto a TV espontânea como a TV induzida por *pacing*.

Figura 49. Efeitos de ATXII (20 nM) e de ranolazina na TV induzida. A ranolazina numa concentração de 30 μ M reduziu ou aboliu eficazmente a TV induzida por ATXII.

Figura 50. Efeitos de ATXII (20 nM) e de ranolazina na EAD induzida e Δ MAP.

Descrição detalhada do invento

O invento proporciona meios para supressão de pós-despolarização precoce num mamífero.

O ritmo cardíaco normal (ritmo sinusal) resulta de potenciais de acção (AP), que são gerados pelo comportamento electrofisiológico altamente integrado de canais de iões sobre múltiplas células cardíacas. Os canais de sódio, cálcio e potássio são os canais mais importantes para determinação da forma e da duração do potencial de acção cardíaca. Resumidamente, a activação de canais de sódio e de cálcio conduz ao influxo de iões carregados positivamente para o interior de células cardíacas individuais, causando despolarização da membrana. Contrariamente, a abertura de canais de potássio permite o fluxo de carga positiva para fora das células e, em grande parte, termina o potencial de acção e repolariza a célula (Figura 1).

Os AP são propagados a partir da sua origem no pacemaker, através do nodo sinoauricular, através do músculo auricular, depois através do nodo atrioventricular (AV), através do sistema de condução Purkinje, e finalmente para o ventrículo.

A arritmia, uma interrupção na sequência normal de início e de propagação de impulsos no coração, pode resultar de doença cardiovascular primária, perturbações pulmonares, perturbações autónomas, perturbações sistémicas, efeitos colaterais relacionados com fármacos, efeitos hereditários (mutações de genes), ou desequilíbrios de electrólito.

Ritmo sinusal normal e arritmias são visualizados nos electrocardiogramas (ECG). Um ECG é um traçado gráfico das variações em potencial eléctrico causadas pela excitação do músculo cardíaco e detectadas à superfície do corpo. A partir dos electrocardiogramas podem-se medir ritmo cardíaco,

duração do intervalo PR, uma reflexão do tempo de condução no nodo AV, duração QRS, uma reflexão do tempo de condução no ventrículo, e intervalo QT, que é uma medida da duração do potencial de acção ventricular. Na Figura 2 mostra-se uma representação do ECG gerado durante um ritmo sinusal.

As taquicardias ventriculares são causadas por automatismo aumentado, pós-despolarizações e automatismo provocado e reentrada. O automatismo aumentado ocorre em células que normalmente exibem despolarização diastólica espontânea. Estimulação B-adrenérgica, hipocalémia e alongamento mecânico de células do músculo cardíaco aumentam o declive da fase 4 e assim aceleram a frequência de pacemaker, enquanto que a acetilcolina reduz a frequência de pacemaker tanto por diminuição do declive da fase 4 como por hiperpolarização. Quando os impulsos se propagam a partir de uma região de automatismo anormal ou normal aumentado para excitar o resto do coração resultam arritmias.

Pós-despolarizações e automatismo provocado ocorrem sob algumas condições patofisiológicas nas quais um potencial de acção cardíaco normal é interrompido ou seguido por uma despolarização anormal. Se esta despolarização anormal atinge um limiar, pode, por sua vez, dar origem a disparos secundários, que se podem depois propagar e criar ritmos anormais. Estes disparos secundários anormais ocorrem apenas após um disparo normal inicial, ou "triggering", e assim são denominados ritmos provocados (*triggered*). São reconhecidas duas formas principais de ritmos provocados: (1) pós-despolarização retardada (DAD) que pode ocorrer sob condições de sobrecarga de cálcio intracelular (isquemia do miocárdio, stress adrenérgico, etc.). Se esta pós-despolarização atinge o limiar, podem ocorrer um batimento ou batimentos provocados secundários e; (2) pós-despolarizações precoces (EAD) ocorrem frequentemente quando existe um prolongamento acentuado do potencial de acção cardíaco. Quando isto ocorre, a repolarização de fase 3 pode ser interrompida por uma EAD. Arritmias provocadas mediadas por EAD *in vitro* e arritmias clínicas são muito comuns quando a frequência cardíaca subjacente é lenta, o K⁺ extracelular é baixo, e estão presentes certos fármacos que prolongam a duração do potencial de acção. As EAD resultam de um aumento em corrente líquida para o interior durante a fase de repolarização do potencial de acção.

A TdP é um efeito colateral comum e grave de tratamento com muitos tipos diferentes de fármacos; e pode ser causada por EAD e pela provoção (*triggering*) resultante. Contudo, existem outras condições que medem o risco de TdP, incluindo hipocalémia, hipomagnesemia, hipocalémia, bloqueio AV de alto grau, perturbações congénitas e bradicardia grave.

A síndrome de QT longo (SQTL) é causada por disfunção de estruturas de proteína nas células de coração denominadas canais de iões. Estes canais controlam o fluxo de iões tais como moléculas de potássio, sódio e cálcio. O fluxo destes iões para dentro e para fora das células produz a actividade eléctrica do coração. As anomalias destes canais podem ser adquiridas ou hereditárias. A forma adquirida é usualmente causada por medicações de prescrição.

A forma hereditária ocorre quando se desenvolve uma mutação num de vários genes que produzem ou "codificam" um dos canais de iões que controlam a repolarização eléctrica. O gene mutante produz a formação de canais anormais, e como estes canais anormais não são tão eficientes como os canais normais, a recuperação eléctrica do coração demora mais tempo. Isto manifesta-se no electrocardiograma (ECG, EKG) por um intervalo QT prolongado. O prolongamento QT torna o coração vulnerável a TV polimórficas, um tipo das quais é ritmo cardíaco anormal, rápido, conhecido como "Torsade de Pointes".

A SQTL congénita é causada por mutações de pelo menos um de seis genes.

Doença	Gene	Cromossoma	Canal de iões
LQT1	KVLQT1*	11p15.5	subunidade I_{Ks}
LQT2	HERG	7q35-36	I_{Kr}
LQT3	SCNSA	3q21-24	Na
LQT4	E1425G	4q25-27	Ca^{2+}
LQT5	MinK	21	subunidade I_{Ks}

* Transportadores homozigóticos de novas mutações de KVLQT1 têm síndroma Jervell, Lange-Nielsen. KVLQT1 e MinK montam-se em conjunto para formar o canal I_{Ks} .

As doenças LQT e os canais de iões listados na tabela acima são os mesmos para a SQTL adquirida e para a SQTL hereditária.

Será de notar que, se está presente num mamífero a forma hereditária ou adquirida de SQTL, e se tiverem surgido sintomas de uma TV, então a administração de um composto de Fórmula I, especialmente ranolazina, reduz a ocorrência e/ou frequência de TV. Se está presente a forma hereditária ou adquirida de SQTL, mas não existem quaisquer sintomas de TV, então a administração de um composto de Fórmula I, especialmente ranolazina, previne a ocorrência de TV.

O pentobarbital de sódio é conhecido por prolongar o intervalo QT, mas também reduz a dispersão de repolarização transmural. Fá-lo por inibição de I_{Kr} , I_{Ks} e muito proeminente de I_{Na} . A redução da dispersão transmural é mostrada por um maior prolongamento de APD em células epi e endo do que em células M. O pentobarbital de sódio suprime também actividade de EAD induzida por d-sotalol em células M. Assim, apesar das suas acções para prolongar QT, o pentobarbital não induz TdP.

A amiodarona é conhecida por prolongar QT e em casos graves induz TdP. Constatou-se que a amiodarona reduz a dispersão de repolarização transmural exibindo um maior prolongamento de APD em células epi e endo do que em células M. A amiodarona bloqueia os canais de sódio, potássio e cálcio no coração. Quando administrada cronicamente (30-40 mg/kg/dia oralmente durante 30-45 dias) suprime também a capacidade do bloqueador de I_{Kr} , d-sotalol, para induzir uma acentuada dispersão de repolarização ou actividade de EAD.

Em preparações de fatia perfundida arterialmente a partir de ventrículo esquerdo canino, constatou-se que a ranolazina prolonga preferencialmente APD₉₀ de células epicárdicas (epc). Constatou-se que a redução em dispersão transmural era mais pronunciada para concentrações mais elevadas porque a ranolazina reduz também a APD₉₀ das células M enquanto prolonga a de células epi.

Realizaram-se também testes em miócitos isolados a partir de ventrículo esquerdo canino para determinar se a ranolazina induzia EAD e se a acção de ranolazina na corrente de sódio tardia e na corrente de cálcio podia ou não antagonizar a indução de EAD por d-sotalol em fibras Purkinje. Não se observaram EAD na presença de ranolazina. Constou-se que a ranolazina suprimia EAD induzidas por d-sotalol em concentrações tão baixas quanto 5 micromolar/L.

Constatou-se também que a ranolazina bloqueia o canal de cálcio, mas fá-lo para uma concentração (296 micromolar/L) muito mais elevada do que a concentração terapêutica do fármaco (~2 a 8 µM).

Assim, mesmo se a ranolazina exibir um intervalo QT prolongado, não induz EAD ou TdP.

Porque a ranolazina pode causar um intervalo QT prolongado, a ranolazina pode aumentar a duração de APD de miócitos ventriculares. O intervalo QT de EKG de superfície reflecte a duração de repolarização ventricular.

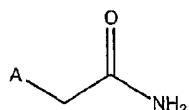
Constatou-se que a ranolazina diminuiu a APD de miócitos de cobaia (reversível por lavagem). Constatou-se também que a ranolazina reduz a APD na presença de quinidina. A quinidina é também conhecida por provocar EAD e TdP. Constatou-se que a ranolazina suprime EAD e outra actividade provocada induzida por quinidina.

A ATXII (uma toxina da anémona do mar) retarda a inactivação do estado aberto do canal de sódio, provoca EAD, prolonga o intervalo QT e causa um aumento súbito em dispersão de repolarização transmural como resultado de um maior prolongamento de APD em células M. Os resultados mostram que a ranolazina causa uma diminuição em APD na presença de ATXII. Deste modo, a ranolazina suprime EAD induzidas por ATXII. A ATXII é um activador de iões sódio que mimetiza a síndrome LTQ3 (que conduz a TdP). Assim, a ranolazina não conduz a TdP, em vez disso suprime a TdP causada por ATX.

Definições

Como utilizadas no presente fascículo, pretende-se geralmente que as palavras e expressões seguintes tenham os significados com a seguir descrito, exceptuando-se as situações de o contexto no qual estão a ser utilizadas indicar de outro modo.

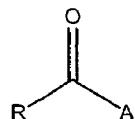
"Aminocarbonilmetilo" refere-se a um grupo com a seguinte estrutura:



onde A representa o ponto de ligação.

"Halo" ou "halogéneo" refere-se a fluoro, cloro, bromo ou iodo.

"Acilo inferior" refere-se a um grupo com a seguinte estrutura:



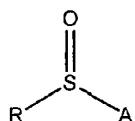
onde R é alquilo inferior como aqui definido, e A representa o ponto de ligação, e inclui grupos tais como acetilo, propanoílo, n-butanoílo e outros.

"Alquilo inferior" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto saturado não ramificada de 1-4 carbonos, tais como metilo, etilo, n-propilo e n-butilo.

"Alcoxi inferior" refere-se a um grupo -OR onde R é alquilo inferior como aqui definido.

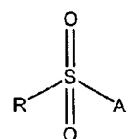
"Alquiltio inferior" refere-se a um grupo -SR onde R é alquilo inferior como aqui definido.

"Alquilsulfínico inferior" refere-se a um grupo da fórmula:



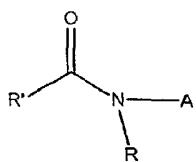
onde R é alquilo inferior como aqui definido, e A representa o ponto de ligação.

"Alquilsulfônico inferior" refere-se a um grupo da fórmula:



onde R é alquilo inferior como aqui definido, e A representa o ponto de ligação.

"Alquilamido opcionalmente N-substituído" refere-se a um grupo com a seguinte estrutura:



onde R é independentemente hidrogénio ou alquilo inferior e R' é alquilo inferior como aqui definido, e A representa o ponto de ligação.

O termo "fármaco" ou "fármacos" refere-se a medicações de prescrição bem como a medicações sem receita médica e a todos os agentes farmacológicos.

"Isómeros" refere-se a compostos com a mesma massa atómica e número atómico mas diferindo em uma ou mais propriedades físicas ou químicas. Todos os isómeros do composto de Fórmula I estão dentro do âmbito do invento.

"Opcional" ou "opcionalmente" significa que o evento ou circunstância subsequentemente descrito pode ocorrer ou não, e que a descrição inclui casos onde o referido evento ou circunstância ocorre e casos em que não ocorre.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se àquela quantidade de um composto de Fórmula I que é suficiente para efectuar o tratamento, como definido abaixo, quando administrada a um mamífero necessitado de um tal tratamento. A quantidade terapeuticamente eficaz variará dependendo do sujeito e da condição de doença que está a ser tratada, do peso e da idade do sujeito, da gravidade da condição de doença, do modo de administração e outros factores, que podem ser facilmente determinados por um técnico competente na especialidade.

O termo "tratamento" ou "tratar" significa qualquer tratamento de uma doença num mamífero, incluindo:

- (i) prevenção da doença, isto é, fazendo com que os sintomas clínicos da doença não se desenvolvam;
- (ii) inibição da doença, isto é, parando o desenvolvimento de sintomas clínicos; e/ou
- (iii) alívio da doença, isto é, causando a regressão de sintomas clínicos.

Arritmia refere-se a qualquer frequência cardíaca anormal. Bradicardia refere-se a uma frequência cardíaca anormalmente lenta enquanto que taquicardia se refere a uma frequência cardíaca anormalmente rápida. Como aqui utilizado, o tratamento de arritmia pretende incluir o tratamento de taquicardias supraventriculares tais como fibrilhação auricular, flutter auricular, taquicardia reentrante do nodo AV, taquicardia auricular, e as taquicardias ventriculares (TV), incluindo taquicardia ventricular idiopática, fibrilhação ventricular, síndroma pré-excitação e Torsade de Pointes (TdP).

Ritmo sinusal refere-se à frequência cardíaca normal.

O termo "mamífero comprometido cardíaco" significa um mamífero com um estado de doença cardiopatológico, por exemplo angina, insuficiência cardíaca congestiva, isquemia e outros.

Em muitos casos, os compostos deste invento são capazes de formarem sais de ácido e/ou base em virtude da presença de grupos amino e/ou carboxilo ou de grupos similares a estes. O termo "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a sais que retêm a eficácia biológica e as propriedades dos compostos de Fórmula I, e que não são biologicamente ou de outro modo indesejáveis. Sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis podem ser preparados a partir de bases inorgânicas e orgânicas. Sais derivados de bases inorgânicas, incluem apenas como exemplo, sais de sódio, potássio, lítio, amónio, cálcio e magnésio. Sais derivados de bases orgânicas incluem, mas não estão limitados a, sais de aminas primárias, secundárias e terciárias, tais como alquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas, (alquil substituído)aminas, di(alquil substituído)aminas, tri(alquil substituído)aminas, alcenilaminas, dialcenilaminas, trialcenilaminas, (alcenil substituído)aminas, di(alcenil substituído)aminas, tri(alcenil substituído)aminas, cicloalquilaminas, di(cicloalquil)aminas, tri(cicloalquil)aminas, (cicloalquil substituído)aminas, di(cicloalquil substituído)aminas, tri(cicloalquil substituído)aminas, cicloalcenilaminas, di(cicloalcenil)aminas, tri(cicloalcenil)aminas, (cicloalcenil substituído)aminas, di(cicloalcenil substituído)aminas, tri(cicloalcenil substituído)aminas, arilaminas, diarylaminas, triarylaminas, heteroarylaminas, di-heteroarylaminas, tri-heteroarylaminas,

aminas heterocíclicas, aminas di-heterocíclicas, aminas tri-heterocíclicas, di- e tri-aminas mistas onde pelo menos dois dos substituintes na amina são diferentes e são seleccionados entre o grupo consistindo de alquilo, alquilo substituído, alcenilo, alcenilo substituído, cicloalquilo, cicloalquilo substituído, cicloalcenilo, cicloalcenilo substituído, arilo, heteroarilo, heterociclo e outros. Incluem-se também aminas onde os dois ou três substituintes, em conjunto com o azoto de amino, formam um grupo heterocíclico ou heteroarilo.

Exemplos específicos de aminas adequadas incluem, apenas como exemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, tri(isopropil)amina, tri(n-propil)amina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaina, etilenodiamina, glucosamina, N-alquilglucaminas, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, morfolina, N-etilpiperidina, e outras.

Sais de adição de base farmaceuticamente aceitáveis podem ser preparados a partir de ácidos inorgânicos e orgânicos. Sais derivados de ácidos inorgânicos incluem ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, e outros. Sais derivados de ácidos orgânicos incluem ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzólico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfónico, ácido etanossulfónico, ácido p-toluenossulfónico, ácido salicílico, e outros.

Como aqui utilizado, "transportador farmaceuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifungícios, agentes isotónicos e retardadores de absorção e outros. A utilização destes meios e agentes para substâncias farmaceuticamente activas é bem conhecida na especialidade. Excepto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o ingrediente activo, é contemplada a sua utilização nas composições terapêuticas. Podem também ser incorporados nas composições ingredientes activos suplementares.

Composições farmacêuticas e administração

Os compostos do invento são usualmente administrados na forma de composições farmacêuticas. Deste modo, este invento proporciona composições farmacêuticas que contêm, como o ingrediente activo, um ou mais dos compostos do invento, ou um seu sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis, e um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis; transportadores, incluindo diluentes sólidos inertes e cargas; diluentes, incluindo soluções aquosas estéreis e vários solventes orgânicos; melhoradores da permeação; solubilizantes; e adjuvantes. Os compostos do invento podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros agentes terapêuticos. Estas composições são preparadas de um modo bem conhecido na especialidade farmacêutica (ver e.g. "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mace Publishing Co., Philadelphia, PA, 17.^a Ed. (1985) e "Modern Pharmaceutics", Marcel Dekker, Inc. 3.^a Ed. (G.S. Banker & C.T. Rhodes, Eds.).

Os compostos do invento podem ser administrados quer em doses únicas quer em doses múltiplas por qualquer dos modos aceites de administração de agentes com utilidades similares, por exemplo como descrito nas patentes e pedidos de patente acima mencionados, incluindo vias rectal, bucal, intranasal e transdérmica, por injecção intra-arterial, intravenosamente, intraperitonealmente, parentericamente, intramuscularmente, subcutaneamente, oralmente, topicamente, como um inalante, ou via um dispositivo impregnado ou revestido tal como um stent, por exemplo, ou um polímero cilíndrico inserido numa artéria.

Um modo preferido para administração é o parentético, particularmente por injecção. As formas nas quais as novas composições do presente invento podem ser incorporadas para administração por injecção incluem suspensões aquosas ou oleosas, ou emulsões, com óleo de sésamo, óleo de milho, óleo de semente de algodão ou óleo de amendoim, bem como elixires, manitol, dextrose ou uma solução aquosa estéril, e veículos farmacêuticos similares. Soluções aquosas em solução salina são também utilizadas convencionalmente para injecção, mas são menos preferidas no contexto do presente invento. Podem-se também utilizar etanol, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol líquido, e outros (e suas misturas adequadas), derivados de ciclodextrina, e óleos vegetais. A

fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pela utilização de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de tensioactivos. A prevenção da acção de microrganismos pode ser conseguida com vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e outros.

Preparam-se soluções injectáveis estéreis por incorporação do composto do invento na quantidade requerida no solvente apropriado com vários outros ingredientes como acima enumerados, conforme requerido, seguida de esterilização por filtração. Geralmente, preparam-se dispersões por incorporação dos vários ingredientes activos esterilizados num veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos entre os acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são técnicas de secagem sob vácuo e de liofilização que proporcionam um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma sua solução previamente esterilizada por filtração.

A administração oral é outra via para administração dos compostos de Fórmula I. A administração pode ser via cápsula ou comprimidos revestidos entéricos, ou outros. Na preparação das composições farmacêuticas que incluem pelo menos um composto de Fórmula I, o ingrediente activo é usualmente diluído por um excipiente e/ou incluído num transportador tal que possa estar na forma de uma cápsula, saqueta, papel ou outro recipiente. Quando o excipiente serve como diluente, este pode ser um material sólido, semi-sólido ou líquido (como acima), que actua como um veículo, transportador ou meio para o ingrediente activo. Assim, as composições podem estar na forma de comprimidos, pílulas, pós, pastilhas, saquetas, hóstias, elixires, suspensões, emulsões, soluções, xaropes, aerossóis (como um sólido ou num meio líquido), pomadas contendo, por exemplo, até 10% em peso do composto activo, cápsulas de gelatina mole e dura, soluções injectáveis estéreis, e pós embalados estéreis.

Alguns exemplos de excipientes adequados incluem lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma-

arábica, fosfato de cálcio, alginatos, goma adragante, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, água esterilizada, xarope e metilcelulose. As formulações podem incluir adicionalmente: agentes lubrificantes tais como talco, estearato de magnésio, e óleo mineral; agentes molhantes; agentes emulsionantes e de suspensão; agentes conservantes tais como metil- e propil-hidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; e agentes aromatizantes.

As composições do invento podem ser formuladas de modo a proporcionar uma libertação rápida, prolongada, retardada ou qualquer combinação destes meios de libertação do ingrediente activo após administração ao paciente utilizando procedimentos conhecidos na especialidade. Sistemas de entrega de fármaco de libertação controlada para administração oral incluem sistemas de bomba osmótica e sistemas de difusão/dissolução incluindo reservatórios revestidos a polímero ou formulações de matriz de polímero-fármaco. Exemplos de sistemas de libertação controlada são apresentados nas Patentes U.S. N.^{os} 3845770; 4326525; 4902514; e 5616345; e WO 0013687. Outra formulação para utilização nos métodos do presente invento utiliza dispositivos de entrega transdérmica ("emplastros"). Estes emplastros transdérmicos podem ser utilizados para proporcionar perfusão contínua ou descontínua dos compostos do presente invento em quantidades controladas. A construção e utilização de emplastros transdérmicos para a entrega de agentes farmacêuticos é bem conhecida na especialidade. Ver, e.g., patentes U.S. N.^{os} 5023252, 4992445 e 5001139. Estes emplastros podem ser construídos para entrega contínua, pulsátil ou a pedido de agentes farmacêuticos.

As composições são preferivelmente formuladas numa forma de unidade de dosagem. O termos "formas de unidade de dosagem" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para sujeitos humanos e outros mamíferos, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com um excipiente farmacêutico adequado (e.g., um comprimido, cápsula, ampola). Os compostos de Fórmula I são eficazes numa vasta gama de dosagens e são geralmente administrados numa quantidade farmaceuticamente eficaz. Preferivelmente, para administração

oral, cada unidade de dosagem contém de 10 mg a 2 g de um composto de Fórmula I, mais preferivelmente de 10 a 700 mg, e para administração parentérica, preferivelmente de 10 a 700 mg de um composto de Fórmula I, mais preferivelmente cerca de 50 a cerca de 200 mg. No entanto, deverá ser entendido que a quantidade do composto de Fórmula I realmente administrada será determinada por um médico, à luz das circunstâncias relevantes, incluindo a condição a ser tratada, a via de administração escolhida, o composto real administrado e a sua actividade relativa, a idade, peso e resposta do paciente individual, a gravidade dos sintomas do paciente e outros factores.

Para preparar composições sólidas tais como comprimidos, o ingrediente activo principal é misturado com um excipiente farmacêutico para formar uma composição de pré-formulação sólida contendo uma mistura homogénea de um composto do presente invento. Quando se referem estas composições pré-formulação como homogéneas, pretende-se significar que o ingrediente activo está disperso uniformemente através da composição tal que a composição pode ser facilmente subdividida em formas de unidade de dosagem igualmente eficazes tais como comprimidos, pílulas e cápsulas.

Os comprimidos ou pílulas do presente invento podem ser revestidos ou de outro modo formulados para fornecer uma forma de dosagem proporcionando a vantagem de acção prolongada, ou para protecção das condições ácidas do estômago. Por exemplo, o comprimido ou pílula podem compreender um componente de dosagem interior e um componente de dosagem exterior, o último estando na forma de um invólucro sobre o primeiro. Os dois componentes podem estar separados por uma camada entérica que serve para resistir à desintegração no estômago e permitir que o componente interior passe intacto para o duodeno ou seja de libertação retardada. Podem-se utilizar vários materiais para estas camadas ou revestimentos entéricos, estes materiais incluindo vários ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com materiais tais como goma laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

Numa concretização, as composições preferidas do invento são formuladas de modo a proporcionar uma libertação rápida, prolongada ou retardada do ingrediente activo após

administração ao paciente, especialmente formulações de libertação prolongada. O composto do invento mais preferido é a ranolazina, que é denominada (\pm)-N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-1-piperazinoacetamida. A não ser que especificado de outro modo, as concentrações de ranolazina no plasma utilizadas no fascículo e exemplos refere-se à ranolazina base livre.

Composições para inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes farmaceuticamente aceitáveis, aquosos ou orgânicos, ou suas misturas, e pós. As composições líquidas e sólidas podem conter excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados conforme descrito *supra*. Preferivelmente, as composições são administradas pela via respiratória oral ou nasal para efeito local ou sistémico. Composições preferivelmente em solventes farmaceuticamente aceitáveis podem ser nebulizadas por utilização de gases inertes. As soluções nebulizadas podem ser inaladas directamente a partir do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode ser ligado a uma máscara facial, ou a uma máquina de respiração de pressão positiva intermitente. As composições em solução, suspensão ou pó podem ser administradas, preferivelmente oralmente ou nasalmente, a partir de dispositivos que entregam a formulação de um modo apropriado.

A formulação intravenosa de ranolazina é fabricada via um processo de enchimento asséptico como se segue. Num vaso adequado, dissolve-se a quantidade requerida de dextrose mono-hidrato em água para injecção até aproximadamente 78% do peso de lote final. Com agitação contínua, adiciona-se a quantidade requerida de ranolazina base livre à solução de dextrose. Para facilitar a dissolução de ranolazina, o pH da solução é ajustado até um valor alvo de 3,88-3,92 com solução de ácido clorídrico 0,1 N ou 1 N. Adicionalmente, podem-se utilizar HCl 0,1 N ou NaOH 1,0 N para fazer o ajuste final da solução ao pH alvo de 3,88-3,92. Após a ranolazina estar dissolvida, ajusta-se o lote até ao peso final com água para injecção. Após confirmação de que as especificações em curso de processo foram satisfeitas, a solução volumosa de ranolazina é esterilizada por filtração estéril através de dois filtros de esterilização de 0,2 μm . Subsequentemente, a solução volumosa estéril de ranolazina é utilizada para encher assepticamente frascos de vidro esterilizados e tapam-

se assepticamente com tampas esterilizadas. Os frascos tapados são depois selados com cápsulas de alumínio de topo destacável.

Os compostos do invento podem ser impregnados num *stent* por difusão, por exemplo, ou revestido sobre o *stent* tal como numa forma de gel, por exemplo, utilizando procedimentos conhecidos de um perito na especialidade à luz da presente revelação.

A formulação intravenosa de ranolazina é fabricada via um processo de enchimento asséptico como se segue. Num vaso adequado, dissolve-se a quantidade requerida de dextrose mono-hidrato em água para injecção até aproximadamente 78% do peso de lote final. Com agitação contínua, adiciona-se a quantidade requerida de ranolazina base livre à solução de dextrose. Para facilitar a dissolução de ranolazina, o pH da solução é ajustado até um valor alvo de 3,88-3,92 com solução de ácido clorídrico 0,1 N ou 1 N. Adicionalmente, podem-se utilizar HCl 0,1 N ou NaOH 1,0 N para fazer o ajuste final da solução ao pH alvo de 3,88-3,92. Após a ranolazina estar dissolvida, ajusta-se o lote até ao peso final com água para injecção. Após confirmação de que as especificações em curso de processo foram satisfeitas, a solução volumosa de ranolazina é esterilizada por filtração estéril através de dois filtros de esterilização de 0,2 µm. Subsequentemente, a solução volumosa de ranolazina estéril é utilizada para encher assepticamente frascos de vidro esterilizados e tapam-se assepticamente com tampas esterilizadas. Os frascos tapados são depois selados com cápsulas de alumínio de topo destacável.

As formulações de libertação prolongada preferidas deste invento estão preferivelmente na forma de um comprimido prensado compreendendo uma mistura íntima de composto e de um ligante dependente do pH parcialmente neutralizado que controla a velocidade de dissolução em meios aquosos através da gama de pH no estômago (tipicamente aproximadamente 2) e no intestino (tipicamente aproximadamente cerca de 5,5).

Para proporcionar uma libertação prolongada de composto, podem ser escolhidos um ou mais ligantes dependentes do pH para controlar o perfil de dissolução do composto tal que a formulação liberta o fármaco lentamente e continuamente à

medida que a formulação passa através do estômago e do tracto gastrintestinal. A capacidade de controlo da dissolução do(s) ligante(s) dependente(s) do pH é particularmente importante numa formulação de libertação prolongada porque uma formulação de libertação prolongada que contém composto suficiente para administração duas vezes ao dia pode causar efeitos colaterais indesejáveis se o composto for libertado demasiado rapidamente ("descarga de dose").

Deste modo, os ligantes dependentes do pH adequados para utilização neste invento são aqueles que inibem a libertação rápida de fármaco a partir de um comprimido durante a sua permanência no estômago (onde o pH é inferior a cerca de 4,5), e que promovem a libertação de uma quantidade terapêutica de composto a partir da forma de dosagem no tracto gastrintestinal inferior (onde o pH é geralmente superior a cerca de 4,5). Muitos materiais conhecidos na especialidade farmacêutica como ligantes e agentes de revestimento "entéricos" têm as propriedades de dissolução de pH desejadas. Estes incluem derivados de ácido ftálico tais como os derivados de ácido ftálico de polímeros e copolímeros de vinilo, hidroxialquilceluloses, alquilceluloses, acetatos de celulose, acetatos de hidroxialquilcelulose, éteres de celulose, acetatos de alquilcelulose, e seus ésteres parciais, e polímeros e copolímeros de ácidos (alquilo inferior)acrílicos e (alquilo inferior)acrilatos, e os seus ésteres parciais.

Materiais de ligante dependente do pH preferidos que podem ser utilizados em conjunção com o composto para criar uma formulação de libertação prolongada são os copolímeros de ácido metacrílico. Os copolímeros de ácido metacrílico são copolímeros de ácido metacrílico com ésteres neutros de acrilato ou metacrilato tais como acrilato de etilo ou metacrilato de metilo. Um copolímero muito preferido é o copolímero de ácido metacrílico, Tipo C, USP (que é um copolímero de ácido metacrílico e de acrilato etilo possuindo entre 46,0% e 50,6% de unidades ácido metacrílico). Um destes copolímeros está disponível comercialmente, da Röhm Pharma como Eudragit® L 100-55 (como um pó) ou L30D-55 (como uma dispersão a 30% em água). Outros materiais de ligante dependente do pH que podem ser utilizados sozinhos ou em combinação numa forma de dosagem de formulação de libertação prolongada incluem ftalato de hidroxipropilcelulose, ftalato hidroxipropilmetylcelulose, acetato-ftalato de celulose,

polivinilacetato-ftalato, polivinilpirrolidona-ftalato, e outros. Estão presentes nas formas de dosagem deste invento um ou mais ligantes dependentes do pH numa quantidade na gama de cerca de 1 a cerca de 20% em peso, mais preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 12% em peso e muito preferivelmente cerca de 10% em peso.

Podem-se utilizar um ou mais ligantes independentes do pH em formulações de libertação prolongada, em formas de dosagem oral. É de notar que ligantes dependentes do pH e agentes melhoradores da viscosidade, tais como hidroxipropilmetylcelulose, hidroxipropilmetylcelulose, metilcelulose, polivinilpirrolidona, ésteres de poli(met)acrilato neutros, e outros, não proporcionam eles próprios o controlo de dissolução requerido proporcionado pelos ligantes dependentes do pH identificados. Os ligantes independentes do pH estão presentes na formulação deste invento numa quantidade na gama de cerca de 1 a cerca de 10% em peso, e preferivelmente numa quantidade na gama de cerca de 1 a cerca de 3% em peso e muito preferivelmente cerca de 2,0% em peso.

Como se mostra na Tabela 1, o composto preferido do invento, ranolazina, é relativamente insolúvel em soluções aquosas com um pH acima de cerca de 6,5, enquanto a solubilidade começa a aumentar dramaticamente abaixo de um pH de cerca de 6. Nos exemplos seguintes, as soluções de ranolazina em água ou em soluções com um pH acima de 6 são preparadas a partir de dicloridrato de ranolazina. Nas porções de discussão dos exemplos seguintes, as concentrações de ranolazina encontradas como resultado de experiências são calculadas como ranolazina base livre.

Tabela 1

pH da solução	Solubilidade (mg/mL)	Classe de solubilidade USP
4,81	161	Livremente solúvel
4,89	73,8	Solúvel
4,90	76,4	Solúvel
5,04	49,4	Solúvel
5,35	16,7	Moderadamente solúvel
5,82	5,48	Ligeiramente solúvel
6,46	1,63	Ligeiramente solúvel
6,73	0,83	Muito ligeiramente solúvel
7,08	0,39	Muito ligeiramente solúvel
7,59 (água não tamponada)	0,24	Muito ligeiramente solúvel
7,79	0,17	Muito ligeiramente solúvel
12,66	0,18	Muito ligeiramente solúvel

Aumentar o teor em ligante dependente do pH na formulação diminui a velocidade de libertação da forma de libertação controlada do composto a partir da formulação para um pH inferior a 4,5 típico do pH encontrado no estômago. O revestimento entérico formado pelo ligante é menos solúvel e aumenta a velocidade de libertação relativa acima de pH 4,5, onde a solubilidade do composto é inferior. Uma selecção apropriada do ligante dependente do pH permite uma velocidade de libertação mais rápida do composto a partir da formulação acima de pH 4,5, afectando grandemente a velocidade de libertação a pH baixo. A neutralização parcial do ligante facilita a conversão do ligante numa película tipo látex que se forma em torno dos grânulos individuais. Deste modo, o tipo e a quantidade do ligante dependente do pH e a quantidade da composição de neutralização parcial são escolhidos para controlar rigorosamente a velocidade de dissolução de composto a partir da formulação.

As formas de dosagem deste invento deverão ter uma quantidade de ligantes dependentes do pH suficiente para produzir uma formulação de libertação prolongada a partir da qual a velocidade de libertação do composto é controlada, tal que a pH baixos (inferiores a cerca de 4,5) a velocidade de dissolução é significativamente retardada. No caso de copolímero de ácido metacrílico, tipo C, USP (Eudragit® L 100-55), uma quantidade adequada de ligante dependente do pH está entre 5% e 15%. O ligante dependente do pH terá tipicamente de cerca de 1 a cerca de 20% dos grupos carboxilo de ácido metacrílico do ligante neutralizados. No entanto, prefere-se que o grau de neutralização varia de cerca de 3 a 6%. A formulação de libertação prolongada pode também conter excipientes farmacêuticos misturados intimamente com o composto e o ligante dependente do pH. Excipientes farmaceuticamente aceitáveis podem incluir, por exemplo, ligantes independentes do pH ou agentes de formação de película tais como hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, polivinilpirrolidona, ésteres de poli(met)acrilato neutros (e.g. os copolímeros de metacrilato de metilo/acrilato de etilo vendidos sob a marca comercial Eudragit® NE pela Röhm Pharma, amido, gelatina, açúcares, carboximetilcelulose, e outros. Outros excipientes farmacêuticos úteis incluem diluentes tais como lactose, manitol, amido seco, celulose microcristalina e outros; agentes tensioactivos tais como ésteres de polioxietileno-

sorbitano, ésteres de sorbitano, e outros; e agentes corantes e agentes aromatizantes. Opcionalmente, podem também estar presentes lubrificantes (tais como talco e estearato de magnésio) e outros auxiliares de compressão.

As formulações de libertação prolongada deste invento têm preferivelmente um teor em composto de cerca de 50% em peso a cerca de 95% ou mais em peso, mais preferivelmente entre cerca de 70% e cerca de 90% em peso e muito preferivelmente de cerca de 70 a cerca de 80% em peso; um teor em ligante dependente do pH entre 5% e 40%, preferivelmente entre 5% e 25%, e mais preferivelmente entre 5% e 15%; com o restante da forma de dosagem compreendendo ligantes independentes do pH, cargas, e outros excipientes opcionais. Mostram-se a seguir na Tabela 2 algumas formulações de libertação controlada preferidas deste invento.

Tabela 2

Ingrediente	Gama de pesos (%)	Gama de pesos preferida (%)	Gama de pesos mais preferida (%)
Ingrediente activo	0-95	70-90	75
Celulose microcristalina (carga)	1-35	5-15	10,6
Copolímero de ácido metacrílico	1-35	5-12,5	10,0
Hidróxido de sódio	0,1-1,0	0,2-0,6	0,4
Hidroxipropilmetylcelulose	0,5-5,0	1-3	2,0
Estearato de magnésio	0,5-5,0	1-3	2,0

As formulações de libertação prolongada deste invento são preparadas como se segue: composto e ligante dependente do pH e quaisquer excipientes opcionais são misturados intimamente (formulados a seco). A mistura formulada a seco é depois granulada na presença de uma solução aquosa de uma base forte que é pulverizada no pó formulado. O granulado é seco, peneirado, misturado com lubrificantes opcionais (tais como talco ou estearato de magnésio), e prensado em comprimidos. Soluções aquosas preferidas de bases fortes são soluções de hidróxidos de metal alcalino, tais como hidróxido de sódio ou potássio, preferivelmente hidróxido de sódio, em água (opcionalmente contendo até 25% de solventes miscíveis com água tais como álcoois inferiores).

Os comprimidos resultantes podem ser revestidos com um agente de formação de película opcional, para identificação,

para mascarar o sabor e para melhorar a facilidade de engolir. O agente de formação de película estará presente tipicamente numa quantidade na gama entre 2% e 4% do peso de comprimido. Agentes de formação de película adequados são bem conhecidos na especialidade e incluem hidroxipropilmetylcelulose, copolímeros de metacrilato catiónicos (copolímeros de metacrilato de dimetilaminoetilo/metacrilato de metilbutilo - Eudragit® E-Röhm. Pharma), e outros. Estes agentes de formação de película podem conter opcionalmente corantes, plastificantes e outros ingredientes suplementares.

Os comprimidos prensados têm preferivelmente uma dureza suficiente para suportar uma compressão de 8 kP. O tamanho do comprimido dependerá principalmente da quantidade de composto no comprimido. Os comprimidos incluirão de 300 a 1100 mg de composto base livre. Preferivelmente, os comprimidos incluirão quantidades de composto base livre na gama de 400-600 mg, 650-850 mg, e 900-1100 mg.

De modo a influenciar a velocidade de dissolução, controla-se o tempo durante o qual o pó contendo composto é misturado a húmido. Preferivelmente, o tempo total de mistura do pó, i.e. o tempo durante o qual o pó está exposto a solução de hidróxido sódio, variará de 1 a 10 minutos e preferivelmente de 2 a 5 minutos. Após granulação, as partículas são removidas do granulador e colocadas num secador de leito fluidizado para secagem a cerca de 60°C.

Constatou-se que estes métodos produzem formulações de libertação prolongada que proporcionam níveis de pico no plasma mais baixos e ainda assim concentrações eficazes de composto no plasma durante até 12 horas e mais após administração, quando o composto é utilizado como a sua base livre, em vez de como o sal de dicloridrato farmaceuticamente mais comum ou outro sal ou éster. A utilização de base livre proporciona pelo menos uma vantagem: A proporção de composto no comprimido pode ser aumentada, uma vez que o peso molecular da base livre é apenas 85% do peso molecular do dicloridrato. Deste modo, consegue-se a entrega de uma quantidade eficaz de composto limitando ao mesmo tempo o tamanho físico da unidade de dosagem.

Utilidade e ensaio

O método é eficaz no tratamento de condições que respondem à inibição concorrente de canais I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio. Estas condições incluem TV, como exemplificado por taquicardia ventricular idiopática, fibrilhação ventricular, síndroma de pré-excitacão e Torsade de Pointes.

O ensaio de actividade é conduzido conforme a seguir descrito nos Exemplos, e por método evidentes para um perito na especialidade.

Os Exemplos que se seguem servem para ilustrar este invento. Pretende-se que os Exemplos mostrem como preparar e utilizar os compostos deste invento. Nos Exemplos, todas as temperaturas estão em graus centígrados.

Os exemplos seguintes servem para ilustrar a preparação de formulações farmacêuticas representativas contendo um composto de Fórmula I.

Exemplo 1

Preparam-se cápsulas de gelatina dura contendo os ingredientes seguintes:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade (mg/cápsula)</u>
Ingrediente activo	30,0
Amido	305,0
Estearato de magnésio	5,0

Misturam-se os ingredientes anteriores e utilizam-se para encher cápsulas de gelatina dura.

Exemplo 2

Prepara-se uma fórmula de comprimido utilizando os ingredientes abaixo:

<u>Ingrediente</u>	<u>(mg/comprimido)</u>
Ingrediente activo	25,0
Celulose, microcristalina	200,0
Dióxido de silício coloidal	10,0
Ácido esteárico	5,0

Misturam-se os componentes e comprimem-se para formar comprimidos.

Exemplo 3

Prepara-se uma formulação para inalador de pó seco contendo os componentes seguintes:

<u>Ingrediente</u>	<u>Peso %</u>
Ingrediente activo	5
Lactose	95

Mistura-se o ingrediente com a lactose e adiciona-se a mistura a um dispositivo de inalação de pó seco.

Exemplo 4

Preparam-se comprimidos, cada um contendo 30 mg de ingrediente activo, como se segue:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade (mg/comprimido)</u>
Ingrediente activo	30,0 mg
Amido	45,0 mg
Celulose microcristalina	35,0 mg
Polivinilpirrolidona (como solução a 10% em água esterilizada)	4,0 mg
Carboximetilamido sódico	4,5 mg
Estearato de magnésio	0,5 mg
<u>Talco</u>	<u>1,0 mg</u>
Total	120 mg

Fazem-se passar o ingrediente activo, amido e celulose através de um peneiro mesh N.º20 U.S. e misturam-se exaustivamente. Mistura-se a solução de polivinilpirrolidona com os pós resultantes, que se fazem depois passar através de um peneiro mesh 16 U.S. Secam-se os grânulos assim produzidos a uma temperatura de 50°C a 60°C e fazem-se passar através de um peneiro mesh 16 U.S. Juntam-se depois o carboximetilamido sódico, estearato de magnésio e talco, previamente passados através de um peneiro mesh N.º 30 U.S., aos grânulos que, após mistura, são prensados numa máquina de comprimidos para produzir comprimidos pesando cada um 120 mg.

Exemplo 5

Produzem-se supositórios, cada um contendo 25 mg de ingrediente activo como se segue:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
Ingrediente activo	25 mg
Glicéridos de ácido gordo saturado	até 2 000 mg

Faz-se passar o ingrediente activo através de um peneiro mesh N.º 60 U.S. e suspende-se nos glicéridos de ácido gordo saturado previamente derretidos utilizando o mínimo de calor necessário. Verte-se depois a mistura num molde para supositórios de capacidade nominal 2,0 g e deixa-se arrefecer.

Exemplo 6

Preparam-se suspensões, cada uma contendo 50 mg de ingrediente activo por dose de 5,0 mL como se segue:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
Ingrediente activo	50,0 mg
Goma de xantano	4,0 mg
Carboximetilcelulose sódica (11%)	
Celulose microcristalina (89%)	50,0 mg
Sacarose	1,75 g
Benzoato de sódio	10,0 mg
Aroma e corante	q.v.
Água purificada	até 5,0 mL

Misturam-se o ingrediente activo, sacarose e goma de xantano, fazem-se passar através de um peneiro mesh N.º 10 U.S., e depois misturam-se com uma solução previamente preparada da celulose microcristalina e de carboximetilcelulose sódica em água. Diluem-se o benzoato de sódio, aroma e corante com alguma da água e adicionam-se com agitação. Adiciona-se depois água suficiente para produzir o volume requerido.

Exemplo 7

Pode-se preparar uma formulação subcutânea como se segue:

<u>Ingrediente</u>	<u>Quantidade</u>
Ingrediente activo	5,0 mg
Óleo de milho	1,0 mL

Exemplo 8

Prepara-se uma preparação injectável possuindo a composição seguinte:

<u>Ingredientes</u>	<u>Quantidade</u>
Ingrediente activo	2,0 mg/ml
Manitol, USP	50 mg/ml
Ácido glucónico, USP	q.s. (pH 5-6)
água (destilada, estéril)	q.s. até 1,0 mL
Azoto gasoso, NF	q.s.

Exemplo 9

Prepara-se uma preparação tópica com a composição seguinte:

<u>Ingredientes</u>	<u>gramas</u>
Ingrediente activo	0,2-10
Span 60	2,0
Tween 60	2,0
Óleo mineral	5,0
Vaselina	0,10
Metilparabeno	0,15
Propilparabeno	0,05
BHA (hidroxianisole butilado)	0,01
Água	q.s. até 100

Combinam-se todos os ingredientes anteriores, excepto a água, e aquece-se até 60°C com agitação. Adiciona-se depois uma quantidade suficiente de água a 60°C com agitação vigorosa para emulsionar os ingredientes, e depois adiciona-se água q.s. 100 g.

Os exemplos seguintes demonstram a utilidade dos compostos do invento.

Exemplo 10

I. Efeitos electrofisiológicos de ranolazina em miócitos isolados, tecidos e preparações de fatia perfundida arterialmente a partir de ventrículo esquerdo canino

A. Materiais e Métodos

Cães pesando 20-25 kg foram anticoagulados com heparina (180 IU/kg) e anestesiados com pentobarbital (30-35 mg/kg, i.v.). Abriu-se o tórax através de uma toracotomia esquerda, excisou-se o coração e colocou-se numa solução cardioplégica fria ($[K^+]_0 = 8 \text{ mmol/L}$, 4°C). Todos os protocolos estavam em conformidade com as linhas de orientação estabelecidas pelo Institutional Animal Care and Use Committee.

1. Estudos voltage clamp em miócitos isolados de ventrículo canino

Isolaram-se miócitos por dissociação enzimática a partir de uma secção em forma de fatia da parede livre ventricular esquerda alimentada pela artéria coronária circunflexa esquerda. Utilizaram-se neste estudo células das regiões do epicárdio e do miocárdio médio do ventrículo esquerdo.

A solução de Tyrode utilizada na dissociação continha (em mM): NaCl 135, KCl 5,4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0 ou 0,5, glucose 10, NaH₂PO₄ 0,33, ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanossulfónico (HEPES) 10, e ajustou-se o pH a 7,4 com NaOH.

Registaram-se a corrente de potássio rectificadora para o interior (I_{K1}), a corrente de potássio rectificadora retardada lenta (I_{KS}) e a corrente de potássio rectificadora retardada rápida (I_{Kr}) a 37°C utilizando uma configuração de *voltage clamp* de célula inteira convencional. Na Tabela 3 resumem-se as composições das soluções externa e de pipeta utilizadas para isolar correntes iónicas específicas.

Tabela 3

Soluções externas		Solução de pipeta
I_{Kr} e I_{K1} (mM)	I_{Ks} (mM)	I_{Ks} , I_{Kr} e I_{K1} (mM)
glucose 11	glucose 11	KCl 20
KCl 4	KCl 4	K-Aspartato 125
MgSO ₄ 1,2	MgCl ₂ 1,8	MgCl ₂ 1
CaCl ₂ 2	CaCl ₂ 1,8	EGTA 10
NaCl 132	NaCl 145 NaH ₂ PO ₄ 1	MgATP 5
HEPES 20	HEPES 10	HEPES 5
pH 7,4 com NaOH	pH 7,4 com NaOH	pH 7,1 com KOH

A I_{K1} foi medida utilizando uma solução externa contendo ouabaína 3 μ M e nifedipina 5 μ M para bloquear a bomba de sódio-potássio e a corrente de cálcio do tipo L ($I_{Ca,L}$) respectivamente. A I_{Ks} foi medida na presença de E-4031 5 μ M e nifedipina 5 μ M para bloquear I_{Kr} e I_{Ca} . Estava presente nifedipina 5 μ M na solução externa quando a I_{Kr} estava a ser registada.

Colocaram-se os miócitos isolados numa câmara de 0,5 ml de temperatura controlada (Medical Systems, Greenvale, NY) na platina de um microscópio invertido e superfundiram-se com um caudal de 2 ml/min. Utilizou-se um microtubo de distribuição de quartzo de oito tubuladuras (ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, NY) colocado a 100 μ m da célula para aplicar ranolazina a concentrações de (em μ M): 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10 e 100,0. Operou-se um amplificador Axopatch 1D (Axon Instruments, Foster City, CA) no modo *voltage clamp* para registar as correntes. Filtraram-se as correntes de célula inteira com um filtro Bessel de passagem baixa 3-polar a 5 kHz, digitalizaram-se entre 2-5 kHz (Digidata 1200A, Axon Instruments) e armazenaram-se num computador. Utilizou-se o suporte lógico de aquisição e análise Clampex 7 (Axon Instruments) para registar e analisar as correntes iónicas. A resistência da ponta da pipeta era 1,0-2,0 M Ω e a resistência do selante era superior a 5 G Ω . A compensação electrónica de resistência em série foi em média 76%. As voltagens apresentadas no texto foram corrigidas para os potenciais de ponta de eléctrodo de adesivo. O selante entre a membrana celular e a pipeta de adesivo foi inicialmente formado em solução externa contendo CaCl₂ 1 mM. Utilizou-se uma ponte de ágar-KCl 3 M entre o eléctrodo de terra de Ag/AgCl e a

solução externa para evitar o desenvolvimento de um potencial de terra quando se muda para a solução experimental.

A I_{Ks} foi induzida por despolarização até 40 mV durante 3 s a partir de um potencial de repouso de -50 mV seguida por um passo de repolarização até 0 mV (4,5 s). A corrente de cauda dependente do tempo induzida pela repolarização foi denominada I_{Ks} . Repetiu-se este protocolo 5 vezes com intervalos de 20 s. A I_{to} não foi bloqueada, mas teve pouca influência na nossa medição de I_{Ks} por causa da sua inactivação rápida e completa. Todas as medições foram obtidas 5-12 min após ruptura do adesivo dado que não se observa qualquer redução significativa de I_{Ks} durante este intervalo.

A I_{Kr} foi medida como a corrente de cauda dependente do tempo induzida para um potencial de -40 mV após um impulso de despolarização curto de 250 ms até 30 mV. Os resultados são apresentados como a média \pm S.E.M.. A I_{K1} foi registada durante passos de voltagem de 900 ms aplicados a partir de um potencial de repouso de -40 mV até potenciais de teste desde -100 mV até 0 mV, e foi caracterizada como a média de 5 ms da corrente de estado estacionário no final do impulso de teste.

2. Estudos de potencial de acção em tecidos da região M e de epicárdio de ventrículo canino isolado

Isolaram-se preparações de células de epicárdio e de miocárdio médio (M) (tiras de aproximadamente $1 \times 0,5 \times 0,15$ cm) a partir do ventrículo esquerdo. Colocaram-se as fatias de tecido num banho de tecidos (volume de 5 ml com um caudal de 12 ml/min) e deixaram-se equilibrar durante pelo menos 4 horas enquanto eram superfundidas com uma solução oxigenada de Tyrode ($pH = 7,35$, $t = 37 \pm 0,5^\circ C$) e ritmadas (*paced*) para uma duração de ciclo básico (BCL) de 2 Hz utilizando estimulação de campo. A composição da solução de Tyrode era (em mM): NaCl 129, KCl 4, NaH_2PO_4 0,9, $NaHCO_3$ 20, $CaCl_2$ 1,8, $MgSO_4$ 0,5 e D-glucose 5,5.

Registros do potencial de acção: Registaram-se os potenciais transmembranares utilizando microeléctrodos de vidro padrão cheios com KCl 2,7 M (resistência DC 10 a 20 $M\Omega$) ligados a um sistema de amplificação de impedância de elevado sinal de entrada (World Precision Instruments, Sarasota, FL,

E.U.A.). Exibiram-se os sinais amplificados em osciloscópios Tektronix (Beaverton, OR, E.U.A.) e amplificaram-se (amplificadores programáveis modelo 1903-4 [Cambridge Electronic Designs (C.E.D.), Cambridge, Inglaterra]), digitalizaram-se (sistema AD/DA modelo 1401 [C.E.D.]), analisaram-se (módulo de aquisição e análise Spike 2 [C.E.D.]) e armazenaram-se em suporte magnético.

Protocolos de estudo: Os potenciais de acção foram registados a partir de preparações de células epicárdicas e M. Obtiveram-se regtos de controlo após um período de equilíbrio de 4-6 horas. Os efeitos de ranolazina foram determinados para concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 μM , com os regtos iniciados 30 minutos após a adição de cada concentração do fármaco. Determinaram-se as acções de ranolazina de dependência da frequência por registo dos potenciais de acção transmembranar para durações de ciclo de *pacing* básico (BCL) de 300, 500, 800, 1000, 2000, 5000 ms. Apresentam-se os resultados registados para BCL de 500 e 2000 ms.

Mediram-se os parâmetros do potencial de acção seguintes:

- 1) Duração do potencial de acção para 50% e 90% de repolarização
- 2) Amplitude
- 3) Ultrapassagem (*overshoot*)
- 4) Potencial de membrana em repouso
- 5) Velocidade de aumento do disparo do potencial de acção (V_{\max})

Registou-se a V_{\max} sob condições de controlo e na presença de 10 e 100 μM de ranolazina. Mediú-se a V_{\max} para uma BCL de 500 ms. Porque é conhecido que K^+ extracelular baixo promove o prolongamento de APD induzida por fármaco e a pós-despolarização precoce, realizaram-se dois conjuntos separados de experiências, um para $[\text{K}^+]_0$ normal (4 mM) e o outro com $[\text{K}^+]_0$ baixa (2 mM).

3. Estudos de potencial de acção em preparações de fatia de ventrículo canino esquerdo perfundida arterialmente

Dissecaram-se fatias de ventrículo esquerdo transmural com dimensões de aproximadamente 12 mm×35 mm×12 mm a partir da região anterior média a basal da parede ventricular esquerda e um ramo diagonal da artéria coronária descendente anterior esquerda foi canulado para entregar a solução de perfusão (solução de Tyrode). A composição da solução de Tyrode era (em mM): NaCl 129, KCl 4, NaH₂PO₄ 0,9, NaHCO₃ 20, CaCl₂ 1,8, MgSO₄ 0,5 e D-glucose 5,5; pH = 7,4. Foi realizado um conjunto separado de experiências utilizando solução de Tyrode contendo KCl 2 mM.

Registaram-se potenciais de acção transmembranar a partir de regiões epicárdicas (EPI) e subendocárdicas (M) utilizando microeléctrodos flutuantes. Registou-se um pseudo-electrocardiograma (ECG) transmural utilizando dois eléctrodos K-Agar (1,1 mm, i.d.) colocados a aprox. 1 cm das superfícies epicárdicas (+) e endocárdicas (-) da preparação e ao longo do mesmo eixo como os registos transmembranares.

Deixaram-se as fatias ventriculares equilibrar na câmara durante 2 horas enquanto eram ritmadas (*paced*) para durações de ciclo básico de 2000 ms utilizando eléctrodos bipolares de prata em contacto com a superfície endocárdica. Ajustou-se um caudal constante antes da isquemia até atingir uma pressão de perfusão de 40-50 mmHg. Manteve-se a temperatura a 37±0,5°C por aquecimento da solução de perfusão e de uma câmara de água contígua que rodeava a câmara de tecido com o mesmo banho de aquecimento/circulação. A parte de cima descoberta da câmara de tecido foi coberta em cada experiência até ~75% da sua superfície com folhas de plástico para prevenir adicionalmente perda de calor; os restantes 25% foram mantidos descobertos para posicionar e manobrar os eléctrodos de ECG e os microeléctrodos flutuantes. As preparações foram totalmente imersas na solução extracelular ao longo do curso da experiência.

O intervalo QT foi definido como o intervalo de tempo entre a deflexão inicial do complexo QRS e o ponto no qual uma tangente desenhada até à porção mais elevada da parte terminal da onda T atravessa a linha isoeléctrica.

B. Protocolos de estudo

Série Experimental 1: Para determinar as alterações em tempo de repolarização (duração do potencial de acção a 50 e 90% de repolarização [APD₅₀ e APD₉₀, respectivamente] e o intervalo QT [ECG]) bem como a vulnerabilidade dos tecidos a arritmogénese após perfusão das preparações com ranolazina para concentrações na gama de 1 a 100 µM. [K⁺]₀ = 4 mM.

Registaram-se os potenciais de acção transmembranar a partir das regiões epicárdica (Epi) e subendocárdica (região M) utilizando microeléctrodos de vidro flutuantes. Concorrentemente registrou-se um ECG transmural.

a. Estimulação em estado estacionário: Fez-se variar a duração de ciclo básico (BCL) de 300 a 2000 ms para examinar as alterações dependentes da frequência no tempo de repolarização (APD e ECG) para as concentrações de ranolazina seguintes: 1, 5, 10, 50 e 100 µM.

b. Estimulação eléctrica programada (PES): Aplicou-se estimulação prematura à superfície epicárdica antes e após cada concentração de fármaco numa tentativa para induzir arritmias. Aplicaram-se impulsos individuais (S2) uma vez a cada quinto ou décimo batimento básico (S1) para durações de ciclo de 2000 ms. O intervalo de acoplamento S1-S2 foi progressivamente reduzido até se encontrar a refractividade (os estímulos S2 tiveram uma duração de 2-3 ms com uma intensidade igual a 3-5 vezes o limiar diastólico).

Série Experimental 2: Para determinar as alterações em tempo de repolarização (duração do potencial de acção para 50 e 90% de repolarização [APD₅₀ e APD₉₀, respectivamente] e o intervalo QT [ECG]) bem como a vulnerabilidade da preparação a arritmogénese após perfusão das preparações com ranolazina para concentrações na gama de 1 a 100 µM. [K⁺]₀ = 2 mM.

a. Estimulação em estado estacionário: Realizada para durações de ciclo básico (BCL) de 500 e 2000.

b. Estimulação eléctrica programada (PES): Ver acima.

Fármacos: Diluiu-se dicloridrato de ranolazina em água destilada a 100% como uma solução de reserva 50 mM. O fármaco

foi preparado de fresco para cada experiência.

Estatística: A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de um factor com medidas repetidas seguida por um teste de Bonferroni.

Exemplo 11

Efeito de ranolazina sobre I_{Kr} , I_{Ks} e I_{K1}

A ranolazina inibiu I_{Kr} e I_{Ks} de um modo dependente da concentração, mas não alterou I_{K1} . A I_{Kr} foi medida como a corrente de cauda dependente do tempo para -40 mV, após um impulso de activação de 250 ms até 30 mV. A Figura 3A mostra as correntes registadas em solução de controlo e após ranolazina 50 μ M. A I_{Kr} foi quase completamente bloqueada por esta concentração de ranolazina. A Figura 3B mostra a relação concentração-resposta para inibição da corrente de cauda I_{Kr} , com uma IC_{50} de 11,5 μ M.

A I_{Ks} foi induzida por um passo de 3 s até +40 mV e medida como a corrente de cauda de pico dependente do tempo após recuo para 0 mV. Na Figura 4A mostram-se correntes registadas sob condições de controlo, após ranolazina 100 μ M, e após lavagem do fármaco. A ranolazina (100 μ M) eliminou grandemente a corrente de cauda registada a 0 mV e este efeito foi completamente revertido após lavagem. Na Figura 4B ilustra-se a relação concentração-resposta para inibição da corrente de cauda de I_{Ks} , indicando uma IC_{50} de 13,4 μ M.

A corrente rectificadora para o interior, I_{K1} , foi registada utilizando técnicas de voltage clamp de adesivo perfurado. A Figura 5A mostra I_{K1} registada para voltagens entre -100 e 0 mV, incrementadas em passos de 10 mV, sob condições de controlo (painel esquerdo) e na presença de ranolazina 100 μ M. Nesta experiência e em cinco experiências similares, a ranolazina não produziu qualquer alteração na corrente rectificadora para o interior. O painel B representa graficamente resultados compostos ilustrando as relações corrente-voltagem construídas a partir da corrente média medida no final de cada impulso de teste.

Exemplo 12Estudos do potencial de acção em tecidos isolados de ventrículo canino

A ranolazina produziu uma redução dependente da concentração tanto de APD₅₀ como de APD₉₀ em preparações de células M para $[K^+]_0 = 4$ mM e BCL = 2000 ms (Fig. 6). Nalgumas preparações, a ranolazina produz um efeito bifásico, prolongando a APD para concentrações baixas e reduzindo a APD para concentrações elevadas (Fig. 4A). A repolarização epicárdica foi menos afectada pelo fármaco, mostrando uma tendência no sentido do prolongamento da APD. A dispersão de repolarização transmural foi reduzida para concentrações moderadas de ranolazina e praticamente eliminada para concentrações mais elevadas.

Para uma BCL de 500 ms, a ranolazina causou um prolongamento de APD dependente da concentração em tecidos epicárdicos e uma redução em preparações de células M. Para uma concentração de 100 μ M, a APD epicárdica excedeu a das células M. Como resultado, a dispersão de repolarização transmural foi reduzida ou eliminada. Para a concentração mais elevada de ranolazina (100 μ M), o gradiente de repolarização transmural foi revertido. É digno de nota que a ranolazina induziu um prolongamento dependente da utilização de APD₉₀ em preparações epicárdicas, i.e., o prolongamento foi maior para frequências mais rápidas (Figuras 6 e 7).

Para avaliar as acções de ranolazina na I_{Na} , mediu-se a velocidade de aumento do disparo do potencial de acção (V_{max}). A ranolazina causou uma redução de V_{max} . Este efeito foi modesto (n.s.) para 10 μ M, mas mais substancial com ranolazina 100 μ M (Figura 8).

Para concentrações até 50 μ M, a ranolazina produziu pouco ou nenhum efeito sobre amplitude, ultrapassagem e potencial de membrana em repouso em preparações de células M (Tabela 4).

Tabela 4
 Ranolazina (em μM)
 BCL = 500 ms

	Controlo	1,0	5,0	10,0	50,0	100,0
Amplitude	107±14	109±9	114±8	113±9	104±7	91±19*
RMP	-86±5	-86±3	-86±3	-86±2	-86±5	-86±7
Ultrapassagem	21±13	23±10	27±7	25±8	19±3	9±13

Resultados expressos como a média±SD, n=5 para todas, *-p < 0,05 vs. controlo

Para a dose mais elevada testada (100 μM), a ranolazina causou uma diminuição em amplitude da fase 0. A ultrapassagem do potencial de acção bem como um potencial de membrana em repouso foram reduzidos, ainda que estes resultados não atingissem significância estatística.

Em preparações epicárdicas, a ranolazina produziu pouca ou nenhuma alteração em potencial de membrana em repouso, ultrapassagem e amplitude da fase 0 (Tabela 5).

Tabela 5
 Ranolazina (em μM)
 BCL = 500 ms

	Controlo	1,0	5,0	10,0	50,0	100,0
Amplitude	95±3	93±5	101±2	94±5	86±12	93±3
RMP	-84±3	-84±4	-89±1	-88±2	-86±1	-85±3
Ultrapassagem	11±2	10±4	12±3	8±4	0±11	8±4

Resultados expressos como a média±SD, n=4 para todas, excepto para ranolazina 100,0 μM (n=2). Nas restantes duas preparações epicárdicas, a ranolazina 100,00 μM produziu um prolongamento de APD excessivo, resultando em repolarização alternante e/ou respostas 2:1.

Na presença de $[K^+]_0$ baixa e de velocidades lentas (BCL = 2000 ms), a ranolazina não causou qualquer alteração significativa em APD₉₀ da célula M, mas uma redução de APD₅₀ dependente da concentração (Figura 9). Em contraste, no epicárdio o fármaco produziu pouca alteração em APD₅₀, mas um prolongamento de APD₉₀ dependente da concentração. A dispersão de repolarização transmural foi diminuída de modo importante.

Para uma BCL de 500 ms, a ranolazina causou pouca alteração em repolarização da célula M, mas um prolongamento proeminente de APD₉₀ dependente da concentração no epicárdio (Figura 10).

Exemplo 13

Estudos de potencial de acção em preparações de fatia de ventrículo esquerdo canino perfundida arterialmente

Cada painel na Figura 11 mostra um ECG e potenciais de acção transmembranar registados a partir do miocárdio médio (região M) e epicárdio (Epi) da preparação de fatia de ventrículo esquerdo canino perfundida arterialmente para uma duração de ciclo básico (BCL) de 2000 ms na ausência e presença de ranolazina (1-100 μ M). Os efeitos do fármaco foram estudados com solução de perfusão coronária contendo KCl quer 4 mM (painéis à esquerda) quer 2 mM (painéis à direita).

Na presença de KCl 4 mM, a ranolazina não alterou significativamente a APD₉₀, mas reduziu significativamente a APD₅₀ para concentrações elevadas do fármaco (50 e 100 μ M). Em contraste, na presença de KCl 2 mM, a ranolazina prolongou significativamente a APD₉₀ para concentrações de 5-100 μ M, mas não alterou significativamente a APD₅₀ para qualquer concentração (Tabela 6).

A ranolazina prolongou a APD₉₀ de epicárdio mais do que de células M para $[K^+]$ ₀ de 4 mM. Como consequência, a dispersão de repolarização transmural foi reduzida, ainda que este resultado não atingisse a significância. Para uma $[K^+]$ ₀ de 2 mM, a ranolazina prolongou a APD₉₀ de células M mais do que de células de epicárdio, resultando num aumento em dispersão de repolarização transmural, o que também não conseguiu atingir a significância (Tabela 7).

A Figura 12 mostra resultados compósitos do efeito dependente da concentração de ranolazina na APD₉₀ e no intervalo QT (painéis de cima) e na APD₅₀ (painéis de baixo). Com uma $[K^+]$ ₀ de 4 mM, QT e APD₉₀ foram pouco afectados para qualquer concentração de fármaco; a APD₅₀ foi significativamente reduzida para concentrações de 50 e 100 μ M. Com uma $[K^+]$ ₀ de 2 mM, QT e APD₉₀ das células M foram ligeiramente prolongados para concentrações de ranolazina superiores a 5 μ M, enquanto que a APD₅₀ foi pouco afectada.

Tabela 6

Fatia de ventrículo esquerdo canino: $[KCl]_0$ 4 mM, BCL=2000							
	Epicárdio		Região M				
Concentração	APD ₅₀ ±SE	APD ₉₀ ±SE	APD ₅₀ ±SE	APD ₉₀ ±SE	QT _{final}	T _{pico} - T _{final}	TDR
Controlo	164±21	209,3±15,76	204,5±13,9	250±13,93	261,1±15,76	3,25±2,56	43±6
1 µM	176,3±12,25	213,8±13,28	203,3±9,621	254,3±9,15	263,5±10,56	34,5±3,202	26,75±8,045
5 µM	176,5±11,85	219±12,12	207,5±8,627	258,3±11,08	274,5±13,73	37,75±4,09	36±2,449
10 µM	170,5±12,03	216,5±13,41	199±9,083	260,3±12,66	277,8±14,99*	39,25±5,54	30,75±10,46
50 µM	159,5±12,82*	218±15,91	187,8±11,21*	257,5±15,47	279,3±17,21*	41,25±8,37	32,5±6,278
100 µM	152,5±14,44*	220,5±18,26	169±10,5*	247,8±15,32	284,5±14,39*	40,5±4,94	23,75±2,689

*p<0,05 vs. controlo n≤4

Tabela 7

Fatia de ventrículo esquerdo canino: $[KCl]_0$ 2 mM, BCL=2000							
	Epicárdio		Região M				
Concentração	APD ₅₀ ±SE	APD ₉₀ ±SE	APD ₅₀ ±SE	APD ₉₀ ±SE	QT _{final}	T _{pico} - T _{final}	TDR
Controlo	167±5,548	220±5,568	195,3±3,283	254,3±0,882	283±2,08	24±12,57	16±9,238
1 µM	173±2	232±5,508	210,7±13,53	290,3±12,72	311±9,5	35±4,70	28,33±11,46
5 µM	183,5±1,5	252,5±10,5	205,7±7,881	289,7±2,848*	319±4,58	33±1,33	15±7
10 µM	190±2*	265,5±16,5	208,3±3,48	305,3±4,978*	329±2,33	36±4,09	23,5±1,5
50 µM	179±1	276,5±18,5*	214,3±6,333	325,5±5,5*	343±2,84	41±6,35	35,5±3,5
100 µM	167,5±0,5	293,5±21,5*	187,7±4,978	345±14,36*	376±4,48	55±1,00	35±11

*p<0,05 vs. controlo n≤4

A Tabela 8 realça o facto de não se observar o desenvolvimento espontâneo de arritmias Torsade de Pointes, nem de estas poderem ser induzidas por estimulação eléctrica programada sob quaisquer dos protocolos envolvendo a preparação de fatia de ventrículo esquerdo canino. Não se observaram quaisquer arritmias sob condições de controlo ou após qualquer concentração de ranolazina.

Tabela 8

Torsade de Pointes induzida por ranolazina

	Espontânea	Induzida por estimulação
Ranolazina (1-100 µM), 4 mM $[K^+]_0$	0/4	0/4
Ranolazina (1-100 µM), 2 mM $[K^+]_0$	0/3	0/3

Nenhuma das pós-despolarizações precoces ou tardia foi observada em qualquer das preparações de tecido ou de fatia pré-tratadas com qualquer concentração de ranolazina. De facto, a ranolazina provou ser eficaz na supressão de EAD induzidas por exposição de preparações de células M a outros bloqueadores de I_{Kr} tais como d-sotalol, conforme ilustrado na Figura 13. O D-sotalol produziu um prolongamento de repolarização notável e induziu EAD nas preparações de

células M. Dependente da concentração, a ranolazina reduziu o potencial de acção e aboliu as EAD. Observou-se um efeito similar de ranolazina (5-20 μM) em suprimir a actividade de EAD e reduzir a APD em 4/4 preparações de células M.

Exemplo 14

II. Efeitos electrofisiológicos de ranolazina em I_{Na} tardia, I_{Ca} , I_{to} e $I_{\text{Na-Ca}}$ em miócitos isolados de ventrículo esquerdo canino

A. Materiais e Métodos

1. Estudos Voltage Clamp em miócitos isolados de ventrículo canino

A cães rafeiros machos adultos administraram-se 180 IU/kg de heparina (sal de sódio) e anestesiaram-se com 35 mg/kg i.v. de pentobarbital de sódio, e removeram-se rapidamente os seus corações e colocaram-se em solução de Tyrode. Obtiveram-se miócitos individuais por dissociação enzimática a partir de uma secção em forma de fatia da parede livre ventricular alimentada pela artéria coronária circunflexa esquerda. Utilizaram-se células das regiões do epicárdio e do miocárdio médio do ventrículo esquerdo. Todos os procedimentos estavam em conformidade com as linhas de orientação estabelecidas pelo Institutional Animal Care and Use Committee.

A solução de Tyrode utilizada na dissociação continha (mM): NaCl 135, KCl 5,4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0 ou 0,5, glucose 10, NaH₂PO₄ 0,33, ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanossulfónico (HEPES) 10, e ajustou-se o pH a 7,4 com NaOH.

Registaram-se a corrente de cálcio do tipo L (I_{Ca}), a corrente transiente para o exterior (*transient outward*) (I_{to}) e a corrente de permuta sódio-cálcio ($I_{\text{Na-Ca}}$) a 37°C utilizando eléctrodos de adesivo padrão. Nas Tabelas 9 e 10, mostram-se as composições das soluções externa e de pipeta, respectivamente. A I_{Na} tardia foi registada utilizando técnicas de adesivo perfurado.

Tabela 9
Soluções externas

I_{NaCa} , $I_{Na,tardia}$ e I_{Ca} Células inteiras/Adesivo perf. (mM)	I_{to} Células inteiras (mM)
glucose 10	glucose 10
-	KCl 4
MgCl ₂ 1	MgCl ₂ 1
CaCl ₂ 2	CaCl ₂ 2
Na-metanossulfonato 140	N-metil-D-glucamina-Cl 140
HEPES 10	HEPES 10
pH 7,4 com ácido metanossulfônico	pH 7,4 com HCl

Tabela 10
Soluções internas

$I_{Na,tardia}$	I_{Ca}	I_{NaCa}	I_{to}
Adesivo perf. (mM)	Células inteiras (mM)	Células inteiras (mM)	Células inteiras (mM)
Cs-aspartato 135	Cs-aspartato 140	Cs-aspartato 140	K-aspartato 130
CaCl ₂ 0,010	-	-	KCl 20
NaOH 10	NaOH 10	NaOH 10	-
MgCl ₂ 1	MgCl ₂ 1	MgCl ₂ 1	MgCl ₂ 1
-	MgATP 5	MgATP 5	MgATP 5
HEPES 10	HEPES 10	HEPES 10	HEPES 10
-	EGTA 10	EGTA 0,1	EGTA 5
pH 7,1 com CsOH	pH 7,1 com CsOH	pH 7,1 com CsOH	pH 7,1 com KOH

Colocaram-se as células dissociadas numa câmara de 0,5 ml de temperatura controlada (Medical Systems, Greenvale, NY) na platina de um microscópio invertido e superfundiram-se com 2 ml/min. Utilizou-se um microtubo de distribuição de quartzo de dez tubuladuras (ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, NY) colocado a 100 μm da célula para aplicar ranolazina, tetrodotoxina (TTX) ou cádmio. Operou-se um amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) no modo *voltage clamp* para registar as correntes a 37°C. Filtraram-se as correntes de célula inteira com um filtro Bessel de passagem baixa 4-polar a 5 kHz, digitalizaram-se entre 2-5 kHz (Digidata 1200A, Axon Instruments) e armazenaram-se num computador. Utilizou-se o suporte lógico pClamp 8.2 (Axon Instruments) para registar e analisar as correntes iónicas. A resistência da ponta da pipeta era 1,0-1,5 M Ω e a resistência do selante era superior a 5 G Ω . A compensação electrónica de resistência em série foi em média 76%. As voltagens apresentadas foram corrigidas para os potenciais de ponta de eléctrodo de adesivo. O selante entre

a membrana celular e a pipeta de adesivo foi inicialmente formado em solução de Tyrode contendo CaCl_2 1 mM. Utilizou-se uma ponte de ágar-KCl 3 M entre o eléctrodo de terra de Ag/AgCl e a solução externa para evitar o desenvolvimento de um potencial de terra quando se muda para a solução experimental.

A tetrodotoxina (TTX) foi preparada em água e diluída 1:100 para uma concentração final de 10 μM em solução externa. A ranolazina foi preparada em água numa concentração de 50 mM e diluída em solução externa até concentrações finais na gama de 1-800 μM .

A I_{Ca} foi definida como a corrente de pico para o interior (*peak inward*) menos a corrente no final do impulso de teste. A solução externa continha TTX 10 μM para bloquear o componente de estado estacionário de I_{Na} tardia. Repousaram-se as células durante 20 segundos a -90 mV antes de se suscitar um gradiente de 800 ms até -60 mV e um passo de 15 ms até -50 mV para inactivar canais de sódio e manter o controlo de voltagem, imediatamente seguido por um passo de 500 ms até 0 mV para registar I_{Ca} em soluções de controlo. Repetiu-se este protocolo 5 vezes com uma frequência de 0,5 Hz para cada uma das concentrações do fármaco. Mediram-se os efeitos em estado estacionário da ranolazina como a alteração muito reduzida em I_{Ca} durante o 5.º impulso do trem. As alterações em I_{Ca} foram representadas graficamente em função da concentração de fármaco numa escala semi-logarítmica e ajustou-se a uma equação logarítmica.

A I_{Na} tardia foi definida como a corrente média sensível a TTX nos 5 ms finais do impulso de teste até -30 mV. A perda transiente de controlo de voltagem que ocorreu no início do impulso de 500 ms não afectou as correntes medidas no final do impulso³. Utilizou-se um trem de impulsos de 500 ms repetidos com uma frequência de 1 Hz para determinar o bloqueio de estado estacionário. A redução de I_{Na} tardia durante o 10.º impulso foi representada graficamente em função da concentração de fármaco numa escala semi-logarítmica e ajustou-se a uma equação logarítmica.

A I_{to} foi registada na presença de CdCl_2 300 μM para bloquear a I_{Ca} , e foi definida como a corrente de pico para o exterior menos a corrente em estado estacionário no final do impulso de teste. O potencial de repouso era -80 mV e

aplicou-se um impulso de 5 ms até -50 mV antes de se suscitem impulsos de 100 ms até -10, 0 e 10 mV, que foram repetidos com uma frequência de 0,1 Hz. Os efeitos de ranolazina foram avaliados 4 min após adição de cada concentração de fármaco. Os resultados não foram representados graficamente como uma função logarítmica dado que a ranolazina teve um efeito mínimo na I_{to} . Em vez disso, apresentam-se todos os resultados como os valores médiosterro padrão. Utilizou-se um teste t de Student bilateral para determinar diferenças entre médias.

Para provocar I_{Na-Ca} através da corrente transiente de cálcio normal, um impulso de 3 ms até -50 mV foi seguido por um passo de 5 ms até 0 mV para activar I_{Ca} e uma transiente de cálcio. Este protocolo em dois passos foi imediatamente seguido por um impulso até -80 mV para registar I_{Na-Ca} . A I_{Na-Ca} foi quantificada como a carga total transportada (pA x ms). Os protocolos de voltage clamp foram precedidos por um trem de dez impulsos até 20 mV entregue com uma frequência de 0,5 Hz seguindo-se um repouso de 6 s para manter a carga de cálcio da SR. A redução de I_{Na-Ca} foi representada graficamente em função da concentração de fármaco numa escala semi-logarítmica e ajustou-se a uma equação logarítmica.

Exemplo 15

A Figura 14A mostra correntes sensíveis a TTX em solução de controlo e 4 min após adição de ranolazina 20 μM à solução externa. A Figura 14B mostra os resultados resumo de experiências similares nas quais se adicionou ranolazina (5-50 μM) à solução externa. Metade da inibição de I_{Na} tardia ocorreu para uma concentração de fármaco de 21 μM .

O efeito de ranolazina na I_{to} foi determinado para potenciais de teste de -10, 0 e 10 mV. A I_{to} era bastante resistente a inibição por ranolazina. A Figura 15 mostra correntes registadas em solução de controlo (painel esquerdo) e 4 min após adição de ranolazina 50 μM . O fármaco reduziu a I_{to} de pico em menos de 10%.

Numa concentração de 50 μM , a ranolazina reduziu a I_{to} em $10 \pm 2\%$ para 10 mV (6 células, $p < 0,001$). Os efeitos de ranolazina para -10 e 0 mV não atingiram significância. Numa concentração de 100 μM a ranolazina reduziu a I_{to} em $16 \pm 3\%$ e

$17 \pm 4\%$ para potenciais de teste de 0 e 10 mV, respectivamente (7 células, $p < 0,001$). A ranolazina não teve qualquer efeito para concentrações de 10 μM (9 células) e 20 μM (9 células) para qualquer das voltagens de teste. Os resultados apresentados na Figura 16 foram normalizados para cada corrente de controlo e estão resumidos na Figura 17.

O painel de cima da Figura 18 mostra traçados sobrepostos de $I_{\text{Na}-\text{Ca}}$ em solução de controlo, 4 min após adição de ranolazina 100 μM , e após retorno à solução de controlo. O painel inferior da Figura 18 mostra a curva concentração-resposta obtida a partir de 3-14 células. A IC_{50} para ranolazina inibir $I_{\text{Na}-\text{Ca}}$ é 91 μM .

A Figura 19 mostra as curvas concentração-resposta para I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Ca} , I_{Na} tardia e $I_{\text{Na}-\text{Ca}}$ num único gráfico. A inibição de I_{to} para a concentração mais elevada testada (100 μM) foi insuficiente para desenvolver uma curva completa. I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardia mostraram sensibilidades similares à ranolazina.

Exemplo 16

III. Efeitos electrofisiológicos de ranolazina em fibras Purkinje caninas isoladas

A. Materiais e Métodos

Cães pesando 20-25 kg foram anticoagulados com heparina (180 IU/kg) e anestesiados com pentobarbital (30-35 mg/kg, i.v.). Abriu-se o tórax através de uma toracotomia esquerda, excisou-se o coração e colocou-se numa solução cardioplégica fria ($[K^+]_0 = 8 \text{ mmol/L}$, 4°C). Isolaram-se fibras Purkinje soltas a partir dos ventrículos esquerdo e direito. Colocaram-se as preparações num banho de tecidos (volume de 5 ml com um caudal de 12 ml/min) e deixaram-se equilibrar durante pelo menos 30 min enquanto eram superfundidas com uma solução oxigenada de Tyrode ($\text{pH} = 7,35$, $t = 37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e ritmadas (*paced*) para uma duração de ciclo básico (BCL) de 1 Hz utilizando estimulação pontual. A composição da solução de Tyrode era a seguinte (em mM): NaCl 129, KCl 4, NaH_2PO_4 0,9, NaHCO_3 20, CaCl_2 1,8, MgSO_4 0,5 e D-glucose 5,5.

Registros do potencial de acção: Registaram-se os potenciais transmembranares utilizando microeléctrodos de

vidro padrão cheios com KCl 2,7 M (resistência DC 10 a 20 MΩ) ligados a um sistema de amplificação de impedância de elevado sinal de entrada (World Precision Instruments, Sarasota, FL, E.U.A.). Exibiram-se os sinais amplificados em osciloscópios Tektronix (Beaverton, OR, E.U.A.) e amplificaram-se (amplificadores programáveis modelo 1903-4 [Cambridge Electronic Designs (C.E.D.), Cambridge, Inglaterra]), digitalizaram-se (sistema AD/DA modelo 1401 [C.E.D.]), analisaram-se (módulo de aquisição e análise Spike 2 [C.E.D.]) e armazenaram-se em suporte magnético (computador pessoal).

B. Protocolos de estudo

Obtiveram-se registos de controlo após um período de equilíbrio de 30 min. Avaliaram-se concentrações crescentes de ranolazina (1, 5, 10, 50 e 100 μM), com os registos iniciados 20 minutos após a adição de cada concentração do fármaco. Avaliaram-se as acções de ranolazina dependentes da frequência por registo dos potenciais de acção para durações de ciclo básico (BCL) de 300, 500, 800, 1000, 2000 e 5000 ms. Neste exemplo apresentam-se apenas BCL de 500 e 2000 ms como representativas de frequências de *pacing* relativamente rápidas e lentas.

Mediram-se os parâmetros do potencial de acção seguintes:

- a. Duração do potencial de acção para 50% (APD_{50}) e 90% (APD_{90}) de repolarização
- b. Amplitude
- c. Ultrapassagem (*overshoot*)
- d. Potencial de membrana em repouso
- e. Velocidade de aumento do disparo do potencial de acção (V_{max})

Porque é conhecido que K^+ extracelular baixo promove o prolongamento de APD induzido por fármaco e a pós-despolarização precoce, determinámos os efeitos de ranolazina na presença de $[K^+]_0$ normal (4 mM) e baixa (3 mM). Na fase final, avaliamos os efeitos de ranolazina nas EAD induzidas por d-sotalol (100 μM), um bloqueador de I_{Kr} razoavelmente específico.

Diluiu-se dicloridrato de ranolazina em água destilada a 100% como uma solução de reserva 50 mM. O fármaco foi preparado de fresco para cada experiência.

Estatística: A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de um factor com medidas repetidas seguida por um teste de Bonferroni.

Exemplo 17

Concentração normal de K⁺ extracelular (4 mM)

A ranolazina (1-100 µM) produziu efeitos dependentes da concentração e da frequência na repolarização em fibras Purkinje (Fig. 20). Baixas concentrações de ranolazina (1-10 µM) ou não produziram qualquer efeito ou produziram uma redução relativamente pequena de APD. Concentrações elevadas de ranolazina (50 e 100 µM) reduziram significativamente APD₅₀ para frequências tanto rápidas como lentas. Em contraste, a APD₉₀ foi nitidamente reduzida para frequências de *pacing* lentas mas não para rápidas (Fig. 20). Não se observou qualquer sinal de EAD para qualquer concentração do fármaco.

Para avaliar o efeito de ranolazina na I_{Na}, determinámos o efeito do fármaco na velocidade de elevação do disparo do potencial de acção (V_{max}). A ranolazina causou uma redução significativa de V_{max} para concentrações de 50 e 100 µM (Fig. 21), indicando inibição de I_{Na} pelo fármaco.

Em concentrações de 1-50 µM, a ranolazina produziu pouco ou nenhum efeito na amplitude, ultrapassagem ou potencial de membrana em repouso (Tabela 11).

Tabela 11

Efeitos de ranolazina na amplitude da fase 0, potencial de membrana em repouso (RMP), e ultrapassagem de potencial de acção em fibras Purkinje na presença de [K⁺]₀ normal

Ranolazina (em µM)

	Controlo	1,0	5,0	10,0	50,0	100,0
Amplitude	122±5	120±9	124±3	122±7	117±7	106±12*
RMP	-91±1	-90±2	-90±2	-90±3	-89±3	-87±3*
Ultrapassagem	32±4	32±7	34±7	32±6	28±7	19±11*

[K⁺]₀ = 4,0 mM; BCL = 500 ms

Os resultados estão expressos como a média±DP, n = 7, *p<0,05 vs. controlo.

Para a concentração mais elevada testada (100 μM), a ranolazina causou uma redução estatisticamente significativa de amplitude da fase 0 e de ultrapassagem, consistente com o efeito do fármaco para reduzir V_{\max} e I_{Na} .

Concentração baixa de K^+ extracelular (3 mM)

A diminuição de K^+ extracelular não modificou substancialmente os efeitos de ranolazina. As diferenças mais óbvias incluem a tendência do fármaco para prolongar a APD₉₀ para concentrações moderadas e a indução de uma menor redução de APD pela concentração mais elevada do fármaco para uma BCL de 2000 ms (Figura 22, Tabela 12).

Tabela 12

Efeitos de ranolazina na amplitude da fase 0, potencial de membrana em repouso (RMP), e ultrapassagem de potencial de acção em fibras Purkinje na presença de $[\text{K}^+]_0$ baixa
Ranolazina (em μM)

	Controlo	1,0	5,0	10,0	50,0	100,0
Amplitude	130±9	132±6	130±5	128±4	121±7*	114±7*
RMP	-92±1	-92±1	-92±1	-92±1	-92±1	-90±2
Ultrapassagem	38±9	40±5	38±4	37±4	29±6*	24±7*

$[\text{K}^+]_0 = 3,0 \text{ mM}$; BCL = 500 ms

Os resultados estão expressos como a média±DP, n = 5, *p<0,05 vs. controlo.

Concentrações superiores a 5-10 μM reduziram significativamente a APD₅₀. Tal como com o nível mais elevado de $[\text{K}^+]_0$, a amplitude da fase 0 e a ultrapassagem do potencial de acção foram significativamente reduzidas por concentrações elevadas de ranolazina (50 e 100 μM). Nunca se observaram EAD.

Supressão por ranolazina de EAD induzidas por d-sotalol

O bloqueador de I_{Kr} específico d-sotalol (100 μM) induziu a actividade de EAD em 4 de 6 preparações de fibras Purkinje. Numa concentração tão baixa quanto 5 μM , a ranolazina aboliu prontamente as EAD induzidas por d-sotalol em 4 de 4 preparações de fibras Purkinje (Figura 23). Níveis mais elevados de ranolazina (10 μM) produziram uma maior redução do potencial de acção.

Exemplo 18

IV. Efeitos de ranolazina no prolongamento QT e na indução de arritmia em cão anestesiado: comparação com sotalol

A. Materiais e métodos

Pré-trataram-se cães com Atravet (0,07 mg/kg sc) e depois 15 minutos mais tarde anestesiaram-se com cetamina (5,3 mg/kg iv) e valium (0,25 mg/kg iv) seguidos de isoflurano (1-2%), entubaram-se e submeteram-se a ventilação mecânica. Submeteram-se depois a bloqueio AV com ablação por radiofrequência. Realizou-se uma esternotomia mediana e inseriram-se cateteres numa artéria femoral para registo da pressão sanguínea (PS) e em ambas as veias femorais para perfusão de fármacos de teste. Inseriram-se eléctrodos bipolares em ambos os ventrículos para determinação da estimulação programada de períodos refractários (técnica extraestímulo), bem como para avaliação do intervalo QT e da duração QRS para várias durações de ciclo básico (BCL). A TdP foi induzida por desafios de fenilefrina, que foram administrados como doses bólus intravenosas de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/kg. Após cada dose, o ECG foi monitorizado continuamente para detectar arritmias. A BP subiu sempre após a fenilefrina, e deixou-se tempo suficiente (pelo menos 10 minutos) para a BP normalizar antes de administrar a dose seguinte fenilefrina. Avaliaram-se os efeitos do fármaco de teste de acordo com os protocolos abaixo.

Os resultados são apresentados como a média±E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas com um teste t de Student. Considerou-se uma probabilidade bilateral de <0,05 para indicar a significância estatística. Nas Tabelas de resultados, *indica P<0,05, **P<0,01.

B. Desenho do estudo (protocolos)

O fármaco de teste foi perfundido como: Grupo 1 (5 cães): Administrhou-se sotalol iv para uma dose de carga de 8 mg/kg e uma dose de manutenção de 4 mg/kg/h. Grupo 2 (6 cães): Cinco cães receberam ranolazina como uma carga de 0,5 mg/kg iv seguida por uma primeira, uma segunda e uma terceira perfusão iv contínua de respectivamente 1,0, 3,0 e 15 mg/kg/h. Um cão recebeu ranolazina como uma carga de

1,5 mg/kg iv seguida por perfusões de 15 e 30 mg/kg/h. Vinte minutos após início da perfusão de manutenção (para sotalol) ou 30 minutos após início de cada caudal de perfusão iv (para ranolazina) obtiveram-se medições electrofisiológicas (ERP ventricular direito e esquerdo, QT e QRS) para BCL de 300, 400, 600 e 1000 ms. Administraram-se depois os desafios com fenilefrina, com todas as doses administradas para cada caudal de perfusão de fármaco, e monitorizaram-se quaisquer arritmias.

Exemplo 19

A Tabela 13 resume os efeitos pró-arritmias (bigeminia, trigeminia, torsades de pointes e torsades de pointes degenerando para fibrilhação ventricular) de sotalol no modelo.

Tabela 13

Ocorrência de arritmia no grupo de sotalol

ID	Sot 8+4	PE10	PE20	PE30	PE40	PE50
Sot1	-	-	-	-bigeminia -trigeminia	-tdp 30 batimentos CL-206,9 -tdp 16 batimentos CL-194,7 -tdp FV -tdp 7 batimentos CL-230 -tdp FV morte	
Sot2	-S1=1000, S2=275 TV 4 batimentos CL=186,7 -S1=1000, S2=270 TV 4 batimentos CL=173,7 -S1-1000, S2=265 tdp 21 batimentos CL=144 -S1=300, S2=230 tdp FV -tdp FV	-TV mono tdp VF morte				

Sot3	-	-tdp 13 batimentos CL=201,7	-bigeminia -trigeminia	-bigeminia -trigeminia	-TV mono 5 batimentos CL=250 -tdp 21 batimentos CL=195 -tdp FV -tdp FV -tdp FV morte	
Sot4	-S1=1000, S2=235 TV 7 batimentos CL=137	-	-bigeminia	-bigeminia	-bigeminia	-trigeminia -TV mono 19 batimentos CL=300 -tdp FV -tdp FV morte
Sot5	-	-	-	-tdp FV morte		

TV = taquicardia ventricular, FV = fibrilhação ventricular, mono = monomórfico, tdp = torsade de pointes, CL = duração de ciclo, sot = sotalol, PE10, 20, 30, 40, 50 = fenilefrina para 10, 20, 30, 40, 50 µg/kg respectivamente.

Dois de cinco cães tiveram pró-arritmia sem desafio com fenilefrina, e todos os 5 tiveram pró-arritmia após desafio com fenilefrina. Todos os cães morreram eventualmente de torsade de pointes degenerando em fibrilhação ventricular induzida pela combinação de perfusão de sotalol e de um bólus de fenilefrina. O sotalol aumentou o período refractário efectivo ventricular direito (RV) e ventricular esquerdo (LV) de um modo reversível dependente da utilização (Tabela 14 e Figuras 24 A e B). O sotalol aumentou o intervalo QT de um modo dependente do utilização incontestavelmente reversível e não afectou a duração de QRS (Tabela 15 e Figuras 25 A e B).

Tabela 14

Efeitos de sotalol no ERP ventricular esquerdo e direito (ms)

BCL	ERP RV médio	
	CTL	sot 8+4
1000	206,00±8,86	255,50±9,56**
600	191,00±7,1	223,50±9,07**
400	174,00±7,85	195,67±7,53**
300	162,00±6,82	181,33±8,21**

BCL	ERP LV médio	
	CTL	sot 8+4
1000	252,50±17,5	286,25±16,25*
600	227,50±12,5	262,50±27,5*
400	202,50±15	226,25±21,25
300	182,50±10	201,25±18,75

BCL = Duração de ciclo básico

CTL = Controlo

* p<0,05

** p<0,01

Sot 8+4 = dose de carga de sotalol IV de 8 mg/kg

+ dose de manutenção de 0 mg/kg/h

Tabela 15
Efeitos nos intervalos QT e QRS (ms)

BCL	QT CTL	QT sot 8+4	BCL	SE CTL	SE sot8+4
1000	332,70±77,00	440,93**±76,93	1000	26,7±2,37	14,06±5,39
600	309,85±73,60	354,67**±74,73	600	21,33±2,50	15,54±3,11
400	262,73±74,53	299,14*±73,53	400	17,37±2,38	16,75±3,76
300	238,40±74,07	266,40*±74,07	300	16,95±1,86	13,11±3,68

Estão disponíveis resultados para 5 cães que receberam o protocolo padrão de perfusão de ranolazina. O cão com dose elevada morreu por falha da bomba durante a perfusão de 30 mg/kg/h, sem arritmias ventriculares e o estudo electrofisiológico deste cão não pode ser realizado. A Tabela 16 resume a ocorrência de arritmia na presença de ranolazina, sozinha e em combinação com bólus de fenilefrina (10-50 µg/kg) de acordo com protocolo idêntico como para o sotalol acima. Não conseguimos induzir qualquer torsades de pointes e/ou fibrilhação ventricular durante a perfusão de ranolazina com ou sem bólus de fenilefrina.

Tabela 16

Ocorrência de arritmia no grupo de ranolazina			
ID	Ran 0,5+1	Rano3	Rano15
Rano1	PE10-	PE10-	PE10-
			PE20-
	PE20-	PE20, IDV rápido, 16 batimentos, CL=709,3	PE30-
	PE30, 55 min inf., IDV rápido, 12 batimentos, CL=512,7	PE30, 56 min inf., IDV rápido, 16 batimentos, CL=309,3	PE50, IDV rápido, 5 batimentos, CL=575, IDV rápido, 18 batimentos, CL=529,4
Rano2	PE10-	PE10-	PE10-
	PE20-		PE20-
	PE30-	PE20-	PE30-
	PE40-		PE40-
	PE50 bigeminia	PE30-	PE50-
Rano3	PE10-	PE10-	PE10-
	PE20-	PE20-	PE20-
	PE30-	PE30-	PE30-
	PE40-	PE40-	PE40-
	PE50-	PE50-	PE50-

Ocorrência de arritmia no grupo de ranolazina			
ID	Ran 0,5+1	Rano3	Rano15
Rano4	PE10 IDV rápido, 37 batimentos, CL=633,9	PE10- pE20-	PE10-
	PE20-	PE30-	PE20-
	PE30-	PE40-	PE30-
	PE40-	PE50-	PE40-
Rano6	PE10-	S1=300, S2=180, TV 13 batimentos, CL=266,7	PE10-
	PE20-	PE10-	PE20-
	PE30-	PE20- PE30-	PE30- PE40-
	PE40-	PE40-	PE50-
		PE50-	

Rano = ranolazina, TV = taquicardia ventricular, IDV = batimento de fuga idioventricular, CL = duração de ciclo, PE = fenilefrina, inf. = perfusão

A ranolazina aumentou ligeiramente o ERP (aumentos médios não superiores a cerca de 10%), sem dependência de utilização reversa (Tabela 17 A e B e Figuras 26 e 27). Os intervalos QT foram aumentados modestamente (o aumento máximo foi aproximadamente 10%) mas não significativamente, com efeitos máximos de 3 mg/kg por hora e uma diminuição para a dose mais elevada (Tabela 18 A e B e Figura 28 e 29).

Tabela 17A

Efeitos de ranolazina no ERP ventricular direito e esquerdo (ms)

ERP-RV médio+SE				
BCL	CTL	0,5+1	3	15
1000	240,20±9,9	254,00*±9,31	249,50±6,19	253,16±7,77
600	218,50±8,93	227,50±8,87	224,50±4,83	229,50±6,19
400	194,00±6,83	201,50±6,45	199,66±3,75	206,50±5,79
300	175,00±5,25	182,84±6,67	181,00±2,32	185,00±5,76

Tabela 17B

Efeitos de ranolazina no ERP ventricular direito e esquerdo (ms)

ERP-LV médio+SE				
BCL	CTL	0,5+1	3	15
1000	252,16±14,13	259,38±18,18	265,43±19,42	260,43±19,32
600	226,16±11,29	233,13±12,43	238,13±13,25	237,50±14,11
400	198,50±9,7	204,38±11,01	211,45±9,2	215,00±10,05
300	180,50±7,18	185,00±8,1	189,38±8,32	196,88*±7,53

Tabela 18A

Efeitos de ranolazina no intervalo QT (ms) :

BCL	CTL	QT médio ± SE		
		0,5+1	3	15
1000	348,40±9,07	352,52±9,05	384,02±13,9	369,80±11,6
600	318,20±8,58	323,50±7,74	345,00±10,04	336,34±11,43
400	285,40±6,02	286,50±5,76	306,46±10,38	302,18±9,33
300	263,60±6,61	266,16±6,36	272,72±6,09	274,82±6,48

Tabela 18B

Efeitos de ranolazina no intervalo QRS

BCL	CTL	QT médio ± SE		
		0,5+1	3	15
1000	72,10±2,96	72,51±3,35	74,24±2,9	78,50±2,6
600	70,90±3,27	71,68±2,94	73,72±2,29	74,84*±2,56
400	71,37±3,53	72,36±3,39	73,18±2,57	76,82±3,06
300	70,65±3,52	73,60±2,8	73,26±2,33	78,48*±2,8

Exemplo 20

Efeitos de ranolazina na I_{Na} tardia durante a *voltage clamp* de potencial de acção

A cães rafeiros machos adultos administraram-se 180 IU/kg de heparina (sal de sódio) e anestesiaram-se com 35 mg/kg i.v. de pentobarbital de sódio, e removeram-se rapidamente os seus corações e colocaram-se em solução de Tyrode. Obtiveram-se miócitos individuais por dissociação enzimática a partir de uma secção em forma de fatia da parede livre ventricular alimentada pela artéria coronária circunflexa esquerda. Utilizaram-se células da região do miocárdio médio do ventrículo esquerdo. Todos os procedimentos estavam em conformidade com as linhas de orientação estabelecidas pelo Institutional Animal Care and Use Committee.

A solução de Tyrode utilizada na dissociação continha (mM) : NaCl 135, KCl 5,4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0 ou 0,5, glucose 10, NaH₂PO₄ 0,33, ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanossulfónico (HEPES) 10, e ajustou-se o pH a 7,4 com NaOH. Na Tabela 19 resumem-se as composições das soluções interna e externa.

Tabela 19

Solução externa	Solução interna
$I_{Na, \text{ tardia}}$ Célula inteira (mM)	$I_{Na, \text{ tardia}}$ (mM)
glucose 10	Cs-aspartato 135
MgCl ₂ 1	MgCl ₂ 1
	NaOH 10
CaCl ₂ 2	EGTA 10
Na-metanossulfonato 150	Mg-ATP 5
HEPES 10	HEPES 10
pH 7,4 com ácido metanossulfónico	pH 7,1 com CsOH

A I_{Na} tardia foi registada a 37°C utilizando eléctrodos de adesivo padrão. Colocaram-se as células dissociadas numa câmara de 0,5 ml de temperatura controlada (Medical Systems, Greenvale, NY) na platina de um microscópio invertido e superfundiram-se com 2 ml/min. Utilizou-se um microtubo de distribuição de quartzo de dez tubuladuras (ALA Scientific Instruments Inc., Westbury, NY) colocado a 100 µm da célula para aplicar ranolazina e tetrodotoxina (TTX). Utilizou-se um aquecedor em linha (Harvard/Wamer, Holliston, MA) para manter as temperaturas das soluções dentro do tubo de distribuição de quartzo. Operou-se um amplificador Axopatch 700A (Axon Instruments, Foster City, CA) no modo *voltage clamp* para registar as correntes a 37°C. Filtraram-se as correntes de célula inteira com um filtro Bessel de passagem baixa 4-polar a 5 kHz, digitalizaram-se entre 2-5 kHz (Digidata 1200A, Axon Instruments) e armazenaram-se num computador. Utilizou-se o suporte lógico pClamp 8.2 (Axon Instruments) para registar e analisar as correntes iónicas. A resistência da ponta da pipeta era 1,0-1,5 MΩ e a resistência do selante era superior a 5 GΩ. A compensação electrónica de resistência em série foi em média 76%. As voltagens apresentadas foram corrigidas para os potenciais de ponta de eléctrodo de adesivo. O selante entre a membrana celular e a pipeta de adesivo foi inicialmente formado em solução de Tyrode contendo CaCl₂ 1 mM. Utilizou-se uma ponte de ágar-KCl 3 M entre o eléctrodo de terra de Ag/AgCl e a solução externa para evitar o desenvolvimento de um potencial de terra quando se muda para a solução experimental.

A tetrodotoxina (TTX) foi preparada em água e diluída 1:100 para uma concentração final de 10 µM em solução externa. O dicloridrato de ranolazina foi preparado em água

numa concentração de 50 mM e diluído em solução externa até concentrações finais na gama de 1-50 μ M.

A $I_{Na,tardia}$ foi registada durante um trem de 30 impulsos para frequências de repetição de 300 e 2000 ms. As correntes durante os últimos 5 impulsos dos trens são ponderadas para reduzir o ruído, e a I_{Na} tardia foi definida como a corrente sensível a TTX. Repetiram-se os protocolos em solução isenta de fármaco, 2 a 4 minutos após adição de ranolazina, e imediatamente após se adicionar TTX 10 μ M para bloquear completamente a $I_{Na,tardia}$.

Utilizaram-se os potenciais de acção, em vez dos impulsos quadrados para a $I_{Na,tardia}$ de *voltage clamp*. Para uma BCL de 300 ms, efectuaram-se medições a meio caminho através do plateau para uma voltagem de 13 mV e durante a repolarização da fase 3 para uma voltagem de -28 mV. Para uma BCL de 2000 ms, as medições foram efectuadas em posições similares para voltagens de 20 mV e -28 mV. A redução de I_{Na} tardia foi representada graficamente em função da concentração de fármaco numa escala semi-logarítmica e ajustou-se a uma equação logarítmica.

A Figura 30 mostra correntes sensíveis a TTX em solução de controlo e 3 min após adição de ranolazina 20 μ M à solução externa. A célula foi pulsada a cada 2000 ms para 30 impulsos. Esta Figura mostra que as correntes de plateau eram mais sensíveis a ranolazina do que a corrente de sódio tardia registada no *clamp* de potencial de acção. A inibição foi mais elevada para 20 mV, mas alguma corrente sensível a TTX permaneceu a -28 mV na presença de ranolazina.

A Figura 31 mostra os resultados resumidos de experiências similares nas quais se adicionou ranolazina (1-50 μ M) à solução externa. Metade da inibição de I_{Na} tardia ocorreu para concentrações de fármaco de 5,9 μ M e 20,8 μ M, respectivamente. A Figura 32 mostra que a inibição era mais potente durante o plateau, mesmo quando as células foram pulsadas a cada 300 ms.

A Figura 33 mostra os resultados compostos de experiências similares nas quais se adicionou ranolazina à solução externa. Metade da inibição de I_{Na} tardia ocorreu para concentrações de fármaco de 20,8 μ M e 11,5 μ M quando

pulsadas para durações de ciclo básico de 2000 ms e 300 ms, respectivamente.

Exemplo 21

Efeitos de ranolazina na duração do potencial de acção de miócitos ventriculares de cobaia

Isolamento de miócitos ventriculares

Isolaram-se miócitos ventriculares individuais a partir de corações de cobaias machos adultos (Harlan). Em resumo, perfundiram-se os corações com soluções mornas (35°C) e oxigenadas pela ordem seguinte: 1) solução de Tyrode contendo (em mmol/L) NaCl 140, KCl 4,6, CaCl₂ 1,8, MgSO₄ 1,1, glucose 10 e HEPES 5, pH 7,4, durante 5 minutos; 2) solução isenta de Ca²⁺ contendo (em mmol/L) NaCl 100, KCl 30, MgSO₄ 2, glucose 10, HEPES 5, taurina 20 e piruvato 5, pH 7,4, durante 5 minutos; e 3) solução isenta de Ca²⁺ contendo colagenase (120 unidades/ml) e albumina (2 mg/ml), durante 20 minutos. No final da perfusão, removeram-se os ventrículos, trituraram-se e agitaram-se suavemente durante 10 minutos em solução #3. Colheram-se as células a partir da suspensão de células.

Medição da duração do potencial de acção

Colocaram-se os miócitos dentro de uma câmara de registo e superfundiram-se com solução de Tyrode a 35°C . Os fármacos foram aplicados através da solução de superfusão. Mediram-se os potenciais de acção utilizando microeléctrodos de vidro cheios com uma solução contendo (em mmol/L) K-aspartato 120, KCl 20, MgCl₂ 1, Na₂ATP 4, Na₃GTP 0,1, glucose 10, EGTA 1 e HEPES 10 (pH 7,2). A resistência do microeléctrodo era 1-3 MΩ. Para efectuar as medições electrofisiológicas, utilizaram-se um amplificador Axopatch-200, uma interface DigiData-1200A e o suporte lógico pCLAMP6. Foram induzidos potenciais de acção por impulsos de despolarização de 5 ms aplicados para várias frequências como indicado. A duração do potencial de acção foi medida para 50% (APD₅₀) e 90% (APD₉₀) de repolarização. As medições foram efectuadas quando a resposta a um fármaco atingiu um máximo estável.

Protocolo experimental

1) Os miócitos ventriculares foram estimulados electricamente para uma frequência de 0,5, 1 ou 2 Hz. Cada mióctio foi tratado com 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ de ranolazina. O efeito da ranolazina na duração do potencial de acção para cada frequência de *pacing* foi determinada a partir de 4 miócitos.

2) Os potenciais de acção foram induzidos para uma frequência de 0,25 Hz, e examinou-se o efeito de ranolazina (10 $\mu\text{mol/L}$) na duração do potencial de acção na presença de 5 $\mu\text{mol/L}$ de quinidina. As experiências foram realizadas com 4 miócitos.

Análise estatística

Os resultados estão expressos como a média \pm SEM. Utilizou-se o teste t de Student emparelhado para análise estatística de resultados emparelhados, e aplicou-se a ANOVA de um factor de medidas repetidas seguida por um teste de Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações. Um valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Efeito de ranolazina para várias frequências de pacing

Na ausência de fármaco, as APD₅₀ e APD₉₀ medidas para frequências de estimulação de 0,5 (n=4), 1 (n=4) e 2 (n=4) Hz foram 250 \pm 20, 221 \pm 18 e 208 \pm 9 ms, e 284 \pm 22, 251 \pm 20 e 245 \pm 9 ms, respectivamente. Assim, o aumento da frequência de *pacing* resultou numa diminuição dependente da frequência da duração do potencial de acção. Independentemente da frequência de *pacing*, a ranolazina causou uma diminuição moderada e dependente da concentração tanto de APD₅₀ como de APD₉₀. A Figura 34 mostra que a ranolazina para 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ diminuiu a duração do potencial de acção de miócitos estimulados para 0,5, 1 e 2 Hz. A diminuição da duração do potencial de acção causada por ranolazina era parcialmente reversível após lavagem do fármaco.

A Figura 35 mostra os resultados obtidos a partir de um único mióctio ritmado primeiro a 2 Hz, e depois a 0,5 Hz. Para as duas frequências de ritmo (*pacing*), a ranolazina (30 $\mu\text{mol/L}$) causou uma diminuição similar da duração do

potencial de acção. Na Figura 36 apresentam-se comparações de APD₅₀ e APD₉₀ medidas na ausência e na presença de 3, 10 e 30 µmol/L de ranolazina para frequências de *pacing* de 0,5, 1 e 2 Hz. A diminuição de APD₅₀ e APD₉₀ por ranolazina para várias frequências de *pacing* está normalizada como percentagem do controlo, e é apresentada na Figura 37.

Efeito de ranolazina na presença de quinidina

A Figura 38A mostra que a quinidina (5 µmol/L) aumentou a duração do potencial de acção de um miócito ritmado a 0,25 Hz. A ranolazina (10 µmol/L) mostrou ter atenuado o efeito de quinidina.

Para além de prolongar a duração do potencial de acção, a quinidina é conhecida por induzir pós-despolarizações precoces (EAD), actividade provocada e torsade de pointes. Como se mostra nas Figuras 39 e 40, a quinidina (2,5 µmol/L) induziu EAD e actividade provocada. Constatou-se que a ranolazina (10 µmol/L) era eficaz na supressão de EAD (Figura 39) e de actividade provocada (Figura 40) induzidas por quinidina.

Exemplo 22

Após os procedimentos e protocolos do Exemplo 21, os miócitos ventriculares de cobaia foram estimulados electricamente na presença de ranolazina quer sozinhos quer na presença de ATX II [uma toxina de anémona do mar conhecida por mimetizar a síndrome LQT3, retardando a inactivação do canal de Na⁺ a partir do estado aberto e aumentando desse modo a corrente de Na⁺ (I_{Na}) de pico e tardia de cardiomiócitos]. A ATXII é conhecida por induzir pós-despolarizações precoces (EAD), actividade provocada e taquicardia ventricular.

Constatou-se que a ATXII (10-40 nmol/L) aumentou nitidamente a duração de potenciais de acção medidos para 50% de repolarização (APD₅₀) de 273±9 ms para 1,154±61 ms (n=20, p<0,001) como se mostra na Figura 41, e induziu EAD em todas as células. Observaram-se frequentemente EAD múltiplas e despolarização sustida resultante. Para uma concentração tão baixa quanto 1 µmol/L, a ranolazina aboliu efectivamente EAD e actividade provocada induzidas por ATXII. O prolongamento

da APD₅₀ causado por ATXII foi significativamente ($p<0,001$) atenuado por ranolazina para concentrações de 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, em $60\pm4\%$ ($n=7$), $80\pm2\%$ ($n=7$), $86\pm2\%$ ($n=12$) e $99\pm1\%$ ($n=8$), como se mostra nas Figuras 42, 43, 44, 45 e 46. Estas Figuras ilustram 5 experiências diferentes.

Exemplo 23

Utilizou-se o modelo de coração isolado de cobaia perfundido com tampão K-H para estudar o efeito da ranolazina no prolongamento da duração de MAP (potencial de acção monofásico), EAD e taquiarritmia ventricular (TV) induzidas por ATXII.

Constatou-se que a ATXII (10-20 nM) prolongava MAPD₉₀ em 6% em 4 corações sem arritmia ventricular rápida. A ATXII induziu nitidamente EAD e TV polimórfica em 10/14 corações isolados de cobaia. Para 5, 10 e 30 μM , a ranolazina suprimiu significativamente EAD e TV, TV prolongada, na presença de ATXII. O efeito protector de ranolazina era reversível após lavagem da ranolazina. Estes resultados são apresentados nas Figuras 47 a 50.

A Figura 47 mostra o MAP e o ECG para controlo, ATXII (20 nM) e ATXII (20 nM) mais ranolazina (10 μM). Esta Figura mostra que a ranolazina reduziu a EAD e o prolongamento MAP induzidos por ATXII.

Figura 48 mostra o MAP e o ECG para TV induzida por ATXII (20 nM), quer TV espontânea, quer TV induzida por *pacing*.

A Figura 49 mostra que a ranolazina reduziu a TV induzida por ATXII. Esta Figura mostra o MAP e o ECG tanto para ATXII (20 nM) sozinho como para ATXII (20 nM) mais ranolazina (30 μM).

A Figura 50 mostra que a ranolazina (10 μM) reverteu EAD e ΔMAP induzidos por ATXII.

Exemplo 24

Para determinar se a ranolazina suprimia ou não 1) EAD e actividade desencadeada (TA) e 2) taquicardia ventricular

(TV) induzidas por ATX-II, utilizaram-se miócitos ventriculares e corações isolados de cobaia, respectivamente.

Os potenciais de acção foram registados utilizando a técnica de eléctrodo de adesivo de célula inteira. Registaram-se potenciais de acção monofásicos ventriculares e electrocardiogramas a partir de corações isolados. A ATX-II (10-20 nmol/L) aumentou a APD medida para 50% de repolarização (APD_{50}) de 271 ± 7 ms para $1,148 \pm 49$ ms ($n=24$, $p<0,001$), induziu EAD em todas as células. Observaram-se frequentemente EAD múltiplas e despolarizações prolongadas. Para concentrações $\geq 1 \mu\text{mol/L}$, a ranolazina aboliu EAD e TA induzidas por ATX-II. O prolongamento da APD_{50} causado por ATX-II foi significativamente ($p<0,001$) reduzido por ranolazina para concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{mol/L}$ em $29 \pm 1\%$ ($n=5$), $47 \pm 1\%$ ($n=5$), $63 \pm 3\%$ ($n=11$), $79 \pm 1\%$ ($n=10$), $86 \pm 2\%$ ($n=12$) e $99 \pm 1\%$ ($n=8$), respectivamente. A ranolazina (10 $\mu\text{mol/L}$) suprimiu também EAD e TA induzidas por 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de quinidina ($n=2$). A ATX-II (10-20 nmol/L) causou EAD e TV em 10 de 14 corações isolados; as EAD induzidas por ATX-II foram significativamente reduzidas e as TV foram terminadas por 5-30 $\mu\text{mol/L}$ de ranolazina.

Exemplo 25

Para determinar se um aumento de ATX-II (que mimetiza a mutação SCN5A) da $I_{Na,(L)}$ facilita ou não os efeitos de E-4031 e 293B (bloqueadores do canal de potássio dos componentes rápido e lento do rectificador retardada (I_K)) para prolongar a APD e para induzir as EAD, e se a ranolazina reverte ou não os efeitos de ATX-II e os bloqueadores de K^+ , utilizaram-se miócitos ventriculares e corações isolados de cobaia.

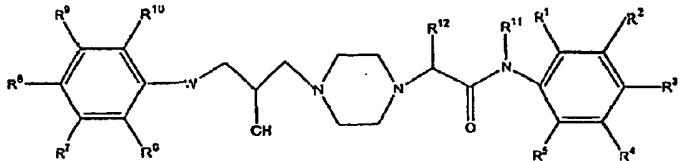
Mediu-se a APD ventricular de miócitos e corações isolados de cobaia, respectivamente, para 50% (APD_{50}) e 90% ($MAPD_{90}$) de repolarização. Para uma concentração baixa, a ATX-II (3 nmol/L) aumentou apenas ligeiramente a APD_{50} em $6 \pm 2\%$. Contudo, quando aplicada quer com E-4031 quer com 293B, a ATX-II potenciou grandemente os efeitos destes bloqueadores de K^+ em prolongar a APD. Na ausência e na presença de ATX-II, a APD_{50} foi aumentada em $11 \pm 2\%$ e $104 \pm 41\%$ por E-4031 (1 $\mu\text{mol/L}$), em $40 \pm 7\%$ e $202 \pm 59\%$ por 293B (30 $\mu\text{mol/L}$), respectivamente. Além disso, E-4031 e 293B induziram EAD na

presença, mas não na ausência, de ATX-II. A ranolazina (10 $\mu\text{mol/L}$) extinguiu completamente as EAD e reverteu significativamente o prolongamento da APD₅₀ em cerca de 70% na presença de ATX-II mais qualquer um de E-4031 ou 293B. ATX-II (7 nmol/L), E-4031 (1 $\mu\text{mol/L}$) e 293B (1 $\mu\text{mol/L}$) sozinhos aumentaram a MAPD₉₀ em $32 \pm 0,1\%$, $30,1 \pm 0,1\%$ e $6,3 \pm 0,2\%$, respectivamente. Quando aplicados com ATX-II, E-4031 e 293B aumentaram a MAPD₉₀ em $127,1 \pm 0,4\%$ e $31,6 \pm 0,1\%$, respectivamente. A ranolazina (10 $\mu\text{mol/L}$) diminuiu significativamente a MAPD₉₀ em $24,5 \pm 0,1\%$ na presença de ATX-II mais E-4031 e em $8,3 \pm 0,1\%$ na presença de ATX-II mais 293B.

Lisboa, 2010-08-06

REIVINDICAÇÕES

1. Composto seleccionado do grupo que consiste em:
um composto de Fórmula I:



Fórmula I

onde:

R¹, R², R³, R⁴ e R⁵ são cada um independentemente hidrogénio, alquilo inferior, alcoxi inferior, ciano, trifluorometilo, halo, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, ou alquilamido opcionalmente N-substituído, desde que quando R¹ é metilo, R⁴ não seja metilo; ou R² e R³ em conjunto formam -OCH₂O-;

R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ e R¹⁰ são cada um independentemente hidrogénio, acilo inferior, aminocarbonilmetilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, trifluorometilo, halo, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, ou di(alquilo inferior)amino; ou

R⁶ e R⁷ em conjunto formam -CH=CH-CH=CH-; ou

R⁷ e R⁸ em conjunto formam -O-CH₂O-;

R¹¹ e R¹² são cada um independentemente hidrogénio ou alquilo inferior; e

W é oxigénio ou enxofre;

onde alquilo inferior se refere a uma cadeia de hidrocarboneto saturado não ramificada de 1-4 carbonos e acilo inferior se refere ao grupo RC(O)A, onde R é alquilo inferior e A representa o ponto de ligação,

um isómero de um composto de fórmula I, e um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis de um composto de Fórmula I ou de um seu isómero,

para utilização na supressão de pós-despolarizações precoces (EAD) num mamífero.

2. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é ranolazina, denominada N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxy)propil]-

1-piperazinoacetamida, ou um seu isómero, ou um sal farmaceuticamente aceitável de ranolazina ou do seu isómero.

3. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1, para administração em níveis de dose que inibem os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio mas que não inibem os canais de cálcio.

4. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 2, que é ranolazina na forma de um sal farmaceuticamente aceitável.

5. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 4, onde o sal farmaceuticamente aceitável é o sal dicloridrato.

6. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 2, que é ranolazina na forma da base livre.

7. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é para administração compreendendo um nível de dose que inibe os canais de iões I_{Na} tardio.

8. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é para administração compreendendo um nível de dose que inibe os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio.

9. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é para administração compreendendo um nível de dose que inibe os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio mas não inibe os canais de cálcio.

10. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1, que é para administração de um modo que proporciona níveis no plasma do composto de Fórmula I de pelo menos 350 ± 30 ng/mL durante pelo menos 12 horas.

11. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1 que é para administração numa formulação de libertação prolongada que mantém concentrações no plasma do composto inferiores a um máximo de 4000 ng/mL, preferivelmente entre cerca de 350 e cerca de 4000 ng/mL, durante pelo menos 12 horas.

12. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1 que é para administração numa formulação que contém entre cerca de 10 mg e 700 mg do referido composto.

13. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 12 que é ranolazina ou um seu isómero, ou um sal farmaceuticamente aceitável de ranolazina ou do seu isómero.

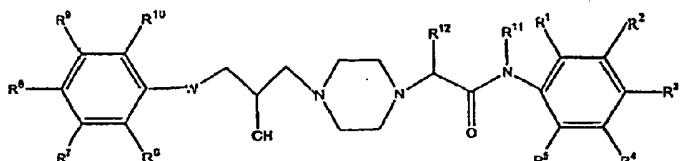
14. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1 que é para administração numa formulação que proporciona um nível de dose de cerca de 1 a cerca de 30 micromoles por litro de formulação.

15. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 14, onde a referida formulação proporciona um nível de dose de cerca de 1 a cerca de 10 micromoles por litro de formulação.

16. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1 que é para administração por bólus ou por uma composição de liberação prolongada.

17. Composto para utilização de acordo com a reivindicação 1 que é para administração intravenosa.

18. Utilização de um composto de Fórmula I:



Fórmula I

onde:

R¹, R², R³, R⁴ e R⁵ são cada um independentemente hidrogénio, alquilo inferior, alcoxi inferior, ciano, trifluorometilo, halo, alquistio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, ou alquilamido opcionalmente N-substituído, desde que quando R¹ é metilo, R⁴ não seja metilo; ou R² e R³ em conjunto formam -OCH₂O-;

R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ e R¹⁰ são cada um independentemente hidrogénio, acilo inferior, aminocarbonilmetilo, ciano, alquilo inferior,

alcoxi inferior, trifluorometilo, halo, alquiltio inferior, alquilsulfinilo inferior, alquilsulfonilo inferior, ou di(alquil inferior)amino; ou

R⁶ e R⁷ em conjunto formam -CH=CH-CH=CH-; ou

R⁷ e R⁸ em conjunto formam -O-CH₂O-;

R¹¹ e R¹² são cada um independentemente hidrogénio ou alquilo inferior; e

W é oxigénio ou enxofre;

onde alquilo inferior se refere a uma cadeia de hidrocarboneto saturado não ramificada de 1-4 carbonos e acilo inferior se refere ao grupo RC(O)A, onde R é alquilo inferior e A representa o ponto de ligação,

ou um seu isómero, ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis de um composto de Fórmula I ou do seu isómero,

para a preparação de uma composição farmacêutica para supressão de EAD num mamífero.

19. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde o composto de Fórmula I é ranolazina, denominada N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxy)propil]-1-piperazinoacetamida, ou um seu isómero, ou um sal farmaceuticamente aceitável de ranolazina ou do seu isómero.

20. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é para administração do composto de Fórmula I em níveis de dose que inibem os canais de iões I_{Kr}, I_{Ks} e I_{Na} tardio mas que não inibem os canais de cálcio.

21. Utilização de acordo com a reivindicação 19, onde a ranolazina está na forma de um sal farmaceuticamente aceitável.

22. Utilização de acordo com a reivindicação 21, onde o sal farmaceuticamente aceitável é o sal dicloridrato.

23. Utilização de acordo com a reivindicação 19, onde a ranolazina está na forma da base livre.

24. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é para administração do composto de Fórmula I que comprehende um nível de dose que inibe os canais de iões I_{Na} tardio.

25. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é para administração do composto de Fórmula I que compreende um nível de dose que inibe os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio.

26. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é para administração do composto de Fórmula I que compreende um nível de dose que inibe os canais de iões I_{Kr} , I_{Ks} e I_{Na} tardio mas não inibe os canais de cálcio.

27. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é para administração do composto de Fórmula I de um modo que proporciona níveis no plasma do composto de Fórmula I de pelo menos 350 ± 30 ng/mL durante pelo menos 12 horas.

28. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é uma formulação de liberação prolongada que mantém concentrações no plasma do composto inferiores a um máximo de 4000 ng/mL, preferivelmente entre cerca de 350 e cerca de 4000 ng /mL, durante pelo menos 12 horas.

29. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica contém entre cerca de 10 mg e 700 mg do referido composto.

30. Utilização de acordo com a reivindicação 29, onde o composto de Fórmula I é ranolazina ou um seu isómero, ou um sal farmaceuticamente aceitável de ranolazina ou do seu isómero.

31. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica proporciona um nível de dose de cerca de 1 a cerca de 30 micromoles por litro de composição farmacêutica.

32. Utilização de acordo com a reivindicação 31, onde a composição farmacêutica proporciona um nível de dose de cerca de 1 a cerca de 10 micromoles por litro de composição farmacêutica.

33. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é para ser administrada por bólus ou por uma composição de libertação prolongada.

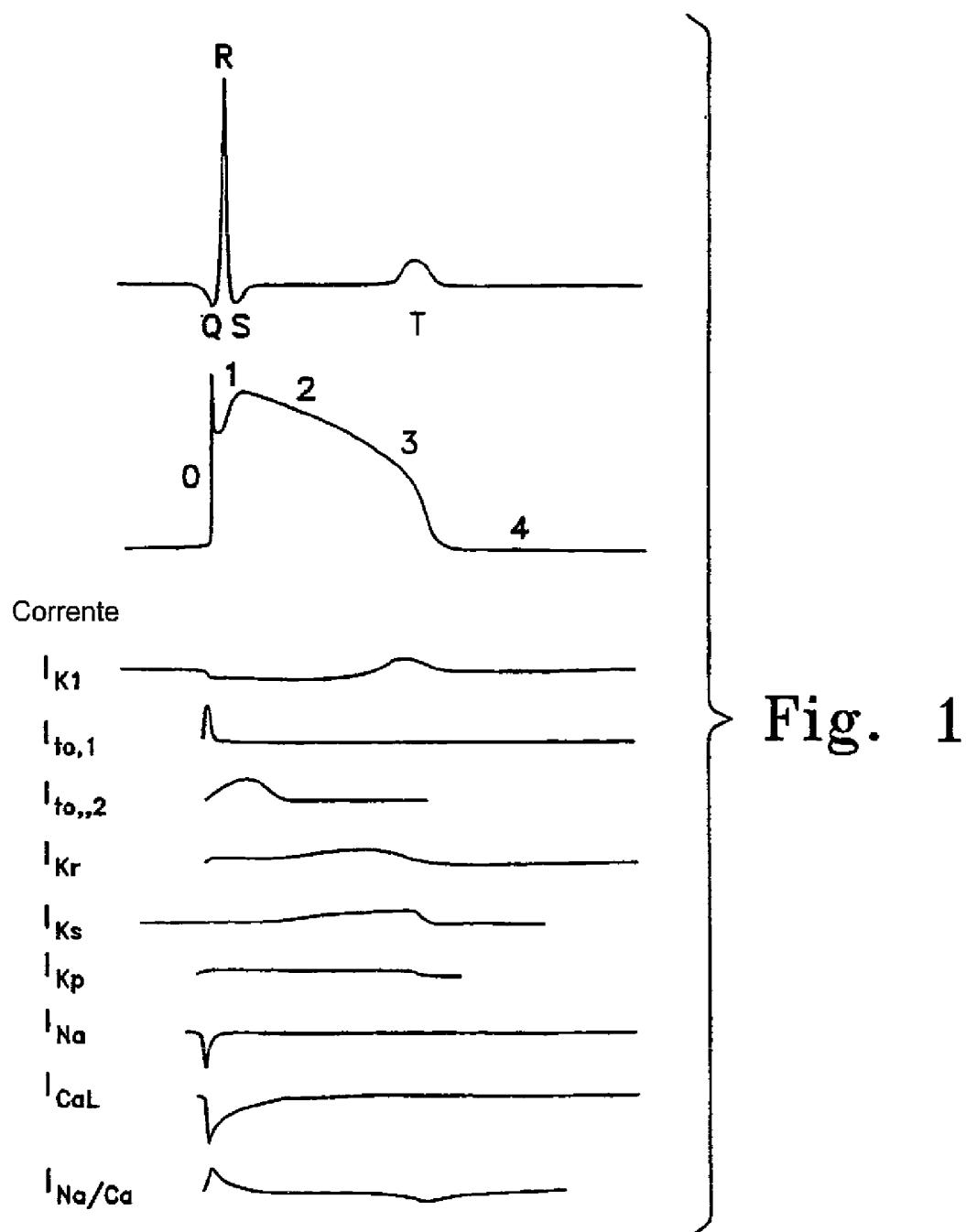
34. Utilização de acordo com a reivindicação 18, onde a composição farmacêutica é para ser administrada intravenosamente.

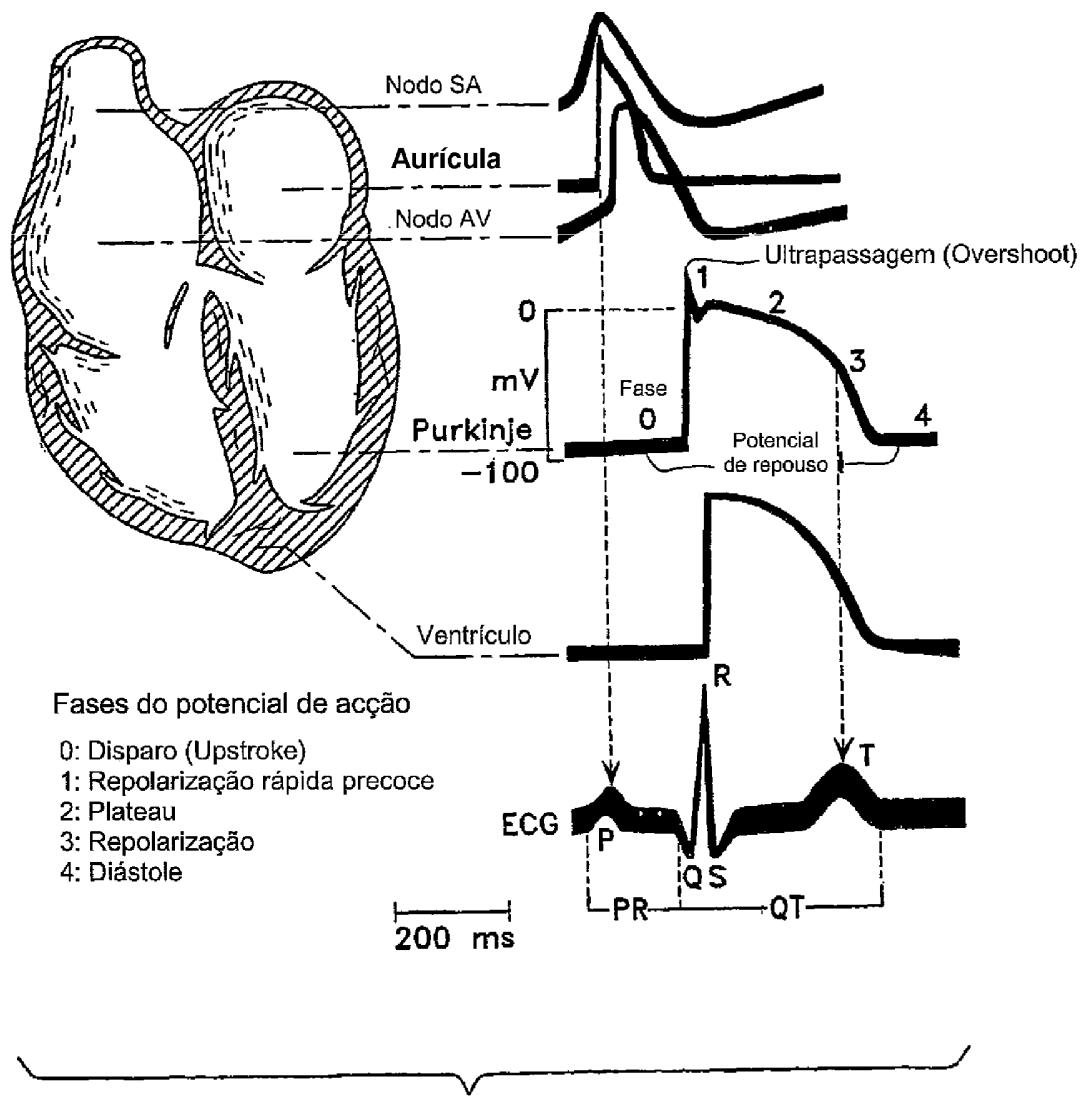
Lisboa, 2010-08-06

RESUMO

"Utilização de ranolazina para a preparação de um medicamento para o tratamento de pós-despolarizações precoces (EAD)"

São proporcionados métodos para tratamento de arritmias incluindo taquicardias, tais como taquicardia ventricular idiopática, fibrilhação ventricular e Torsade de Pointes (TdP) de um modo que minimiza efeitos colaterais indesejáveis.





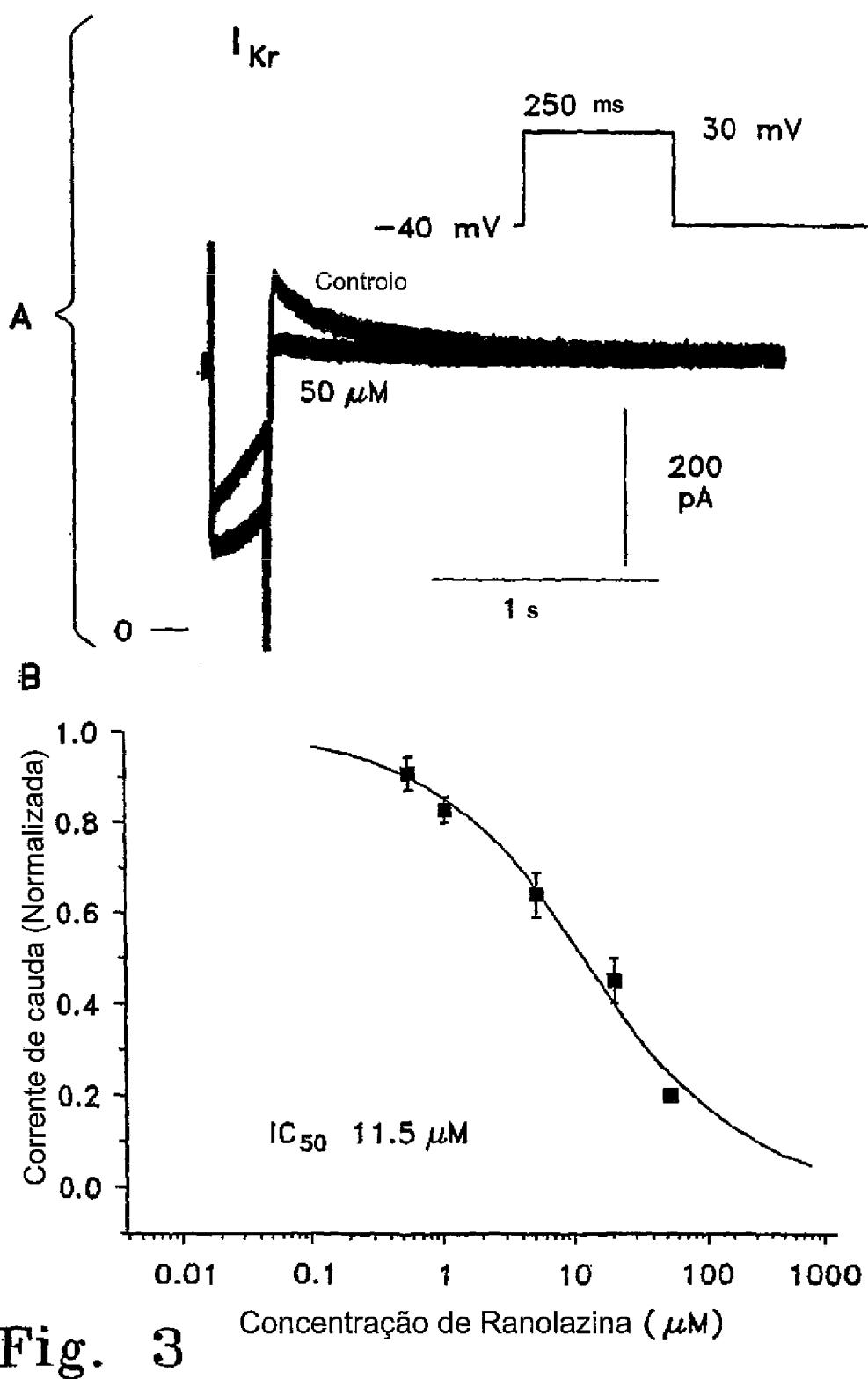


Fig. 3

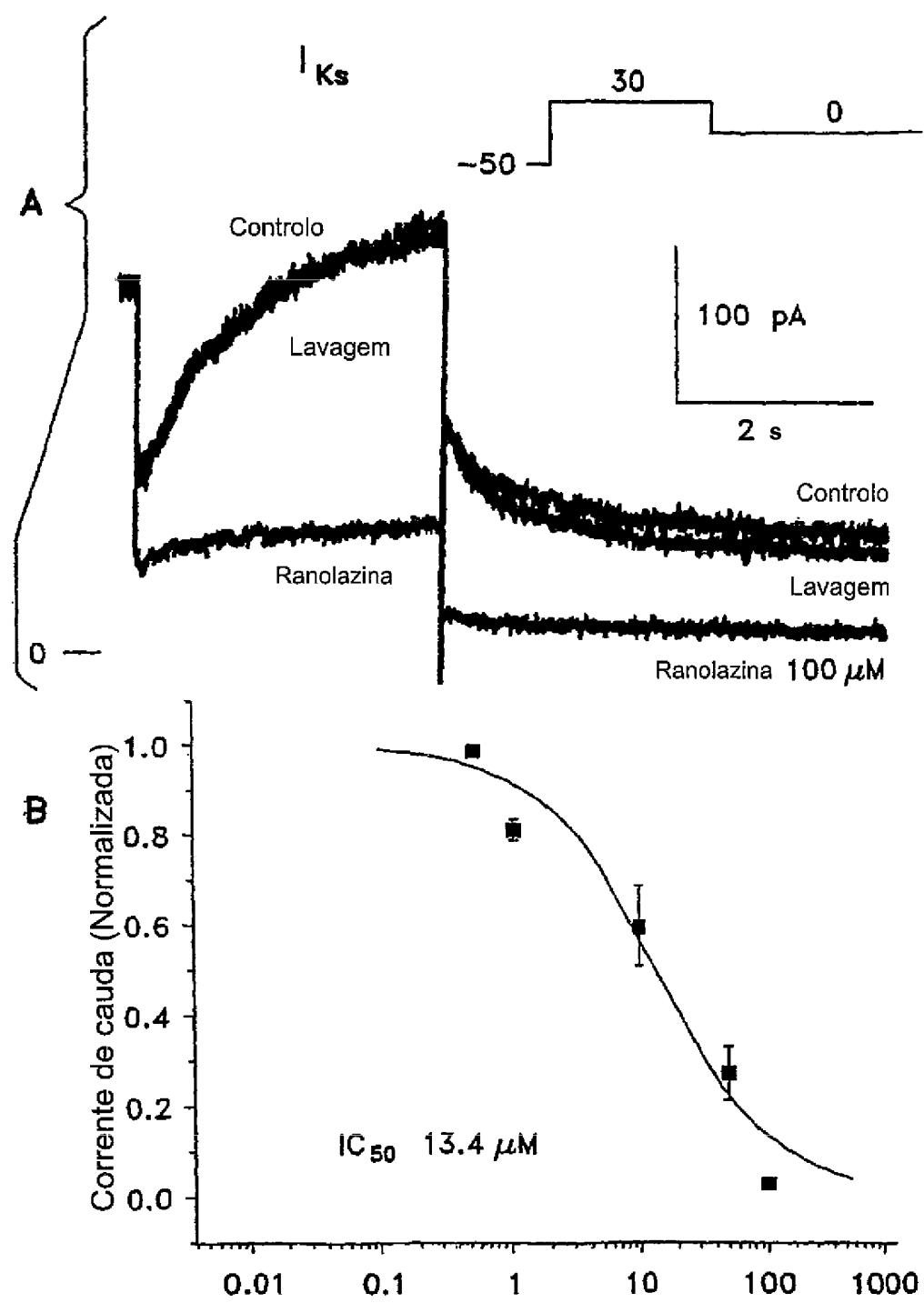


Fig. 4 Concentração de Ranolazina (μ M)

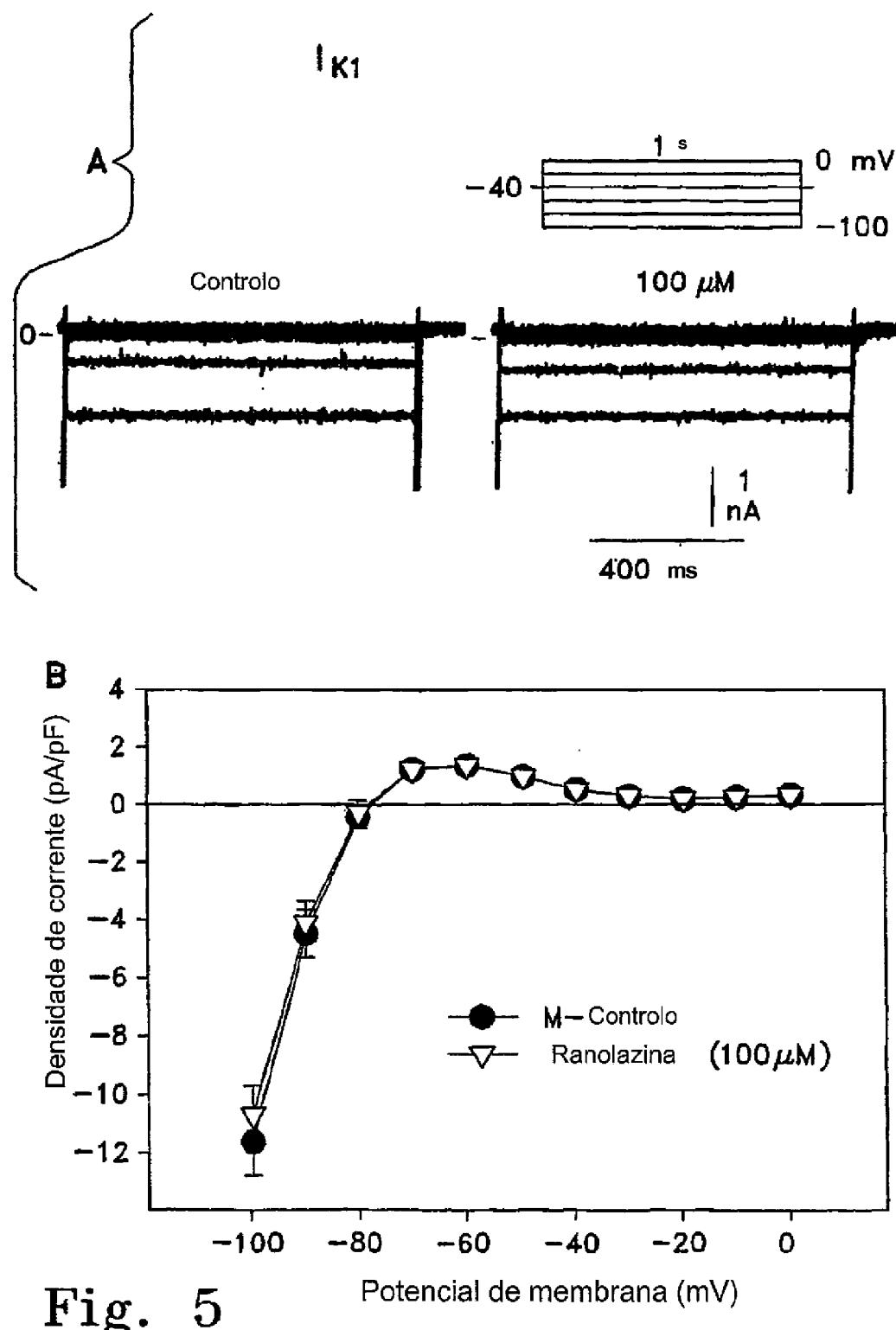


Fig. 5

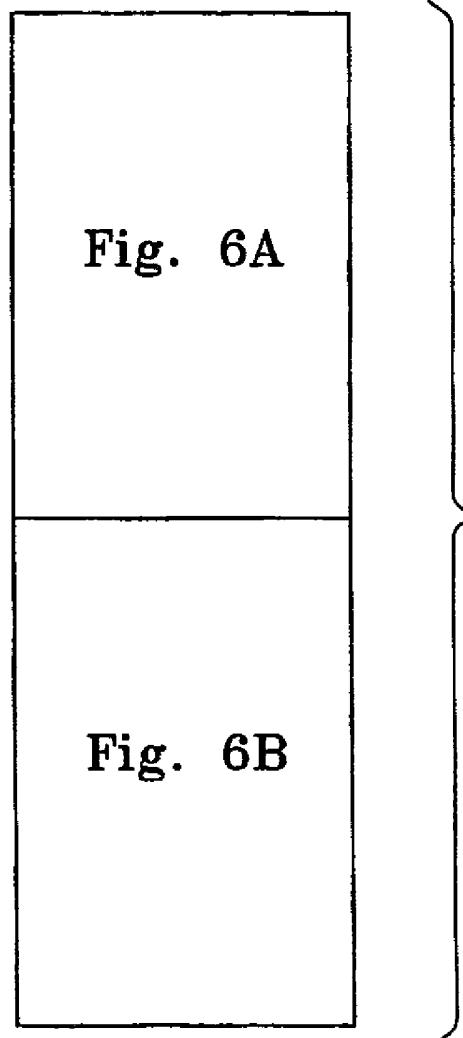


Fig. 6

BCL = 2000 ms , $[K^+]_o = 4 \text{ mM}$

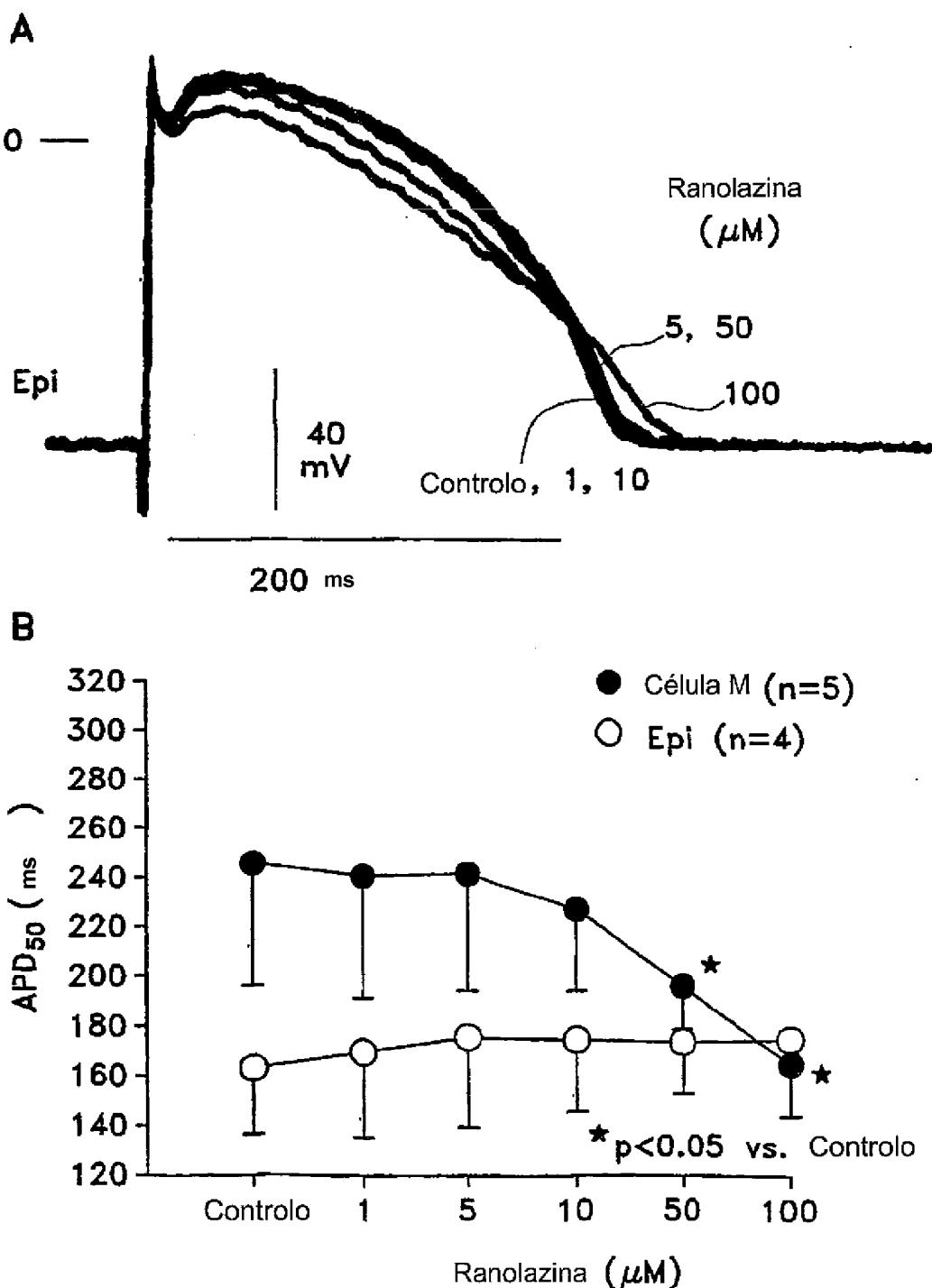


Fig. 6A

BCL = 2000 ms , $[K^+]_o = 4 \text{ mM}$

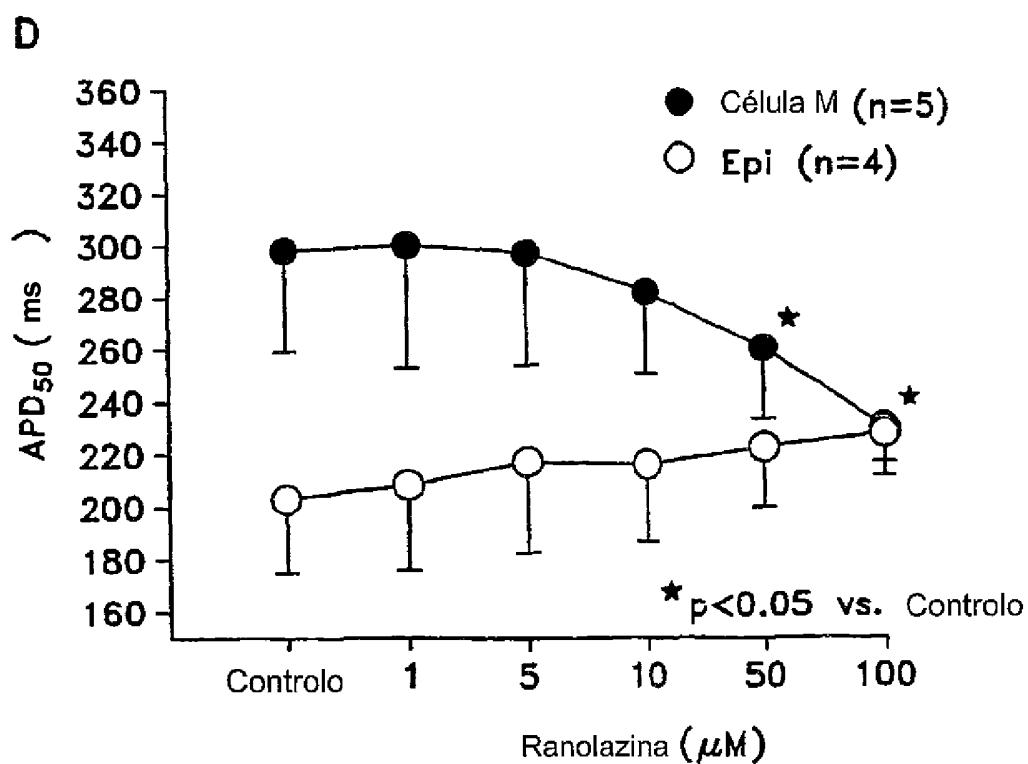
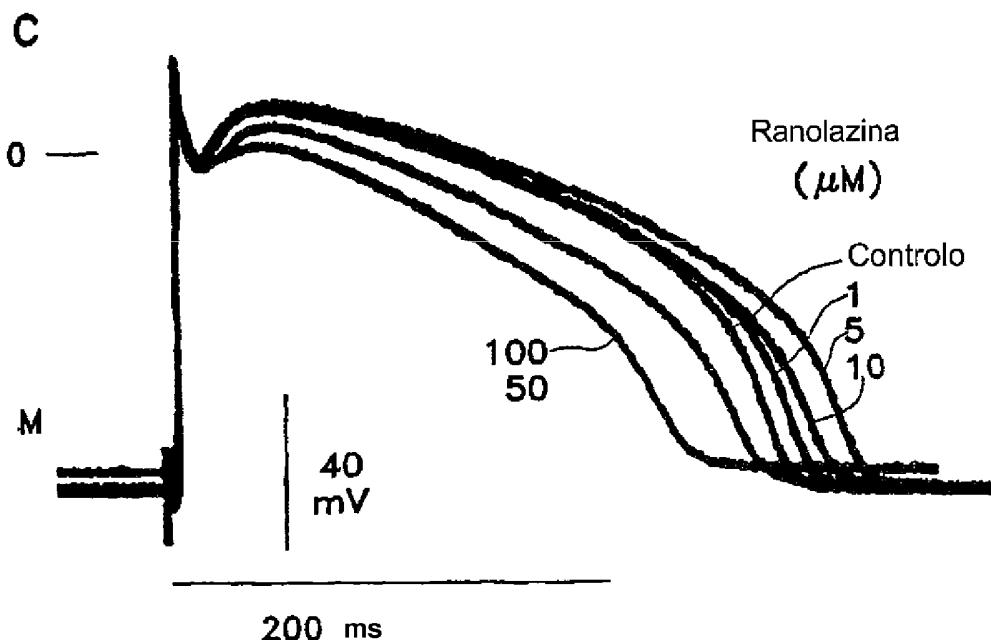


Fig. 6B

$BCL = 500 \text{ ms}$, $[K^+]_o = 4 \text{ mM}$

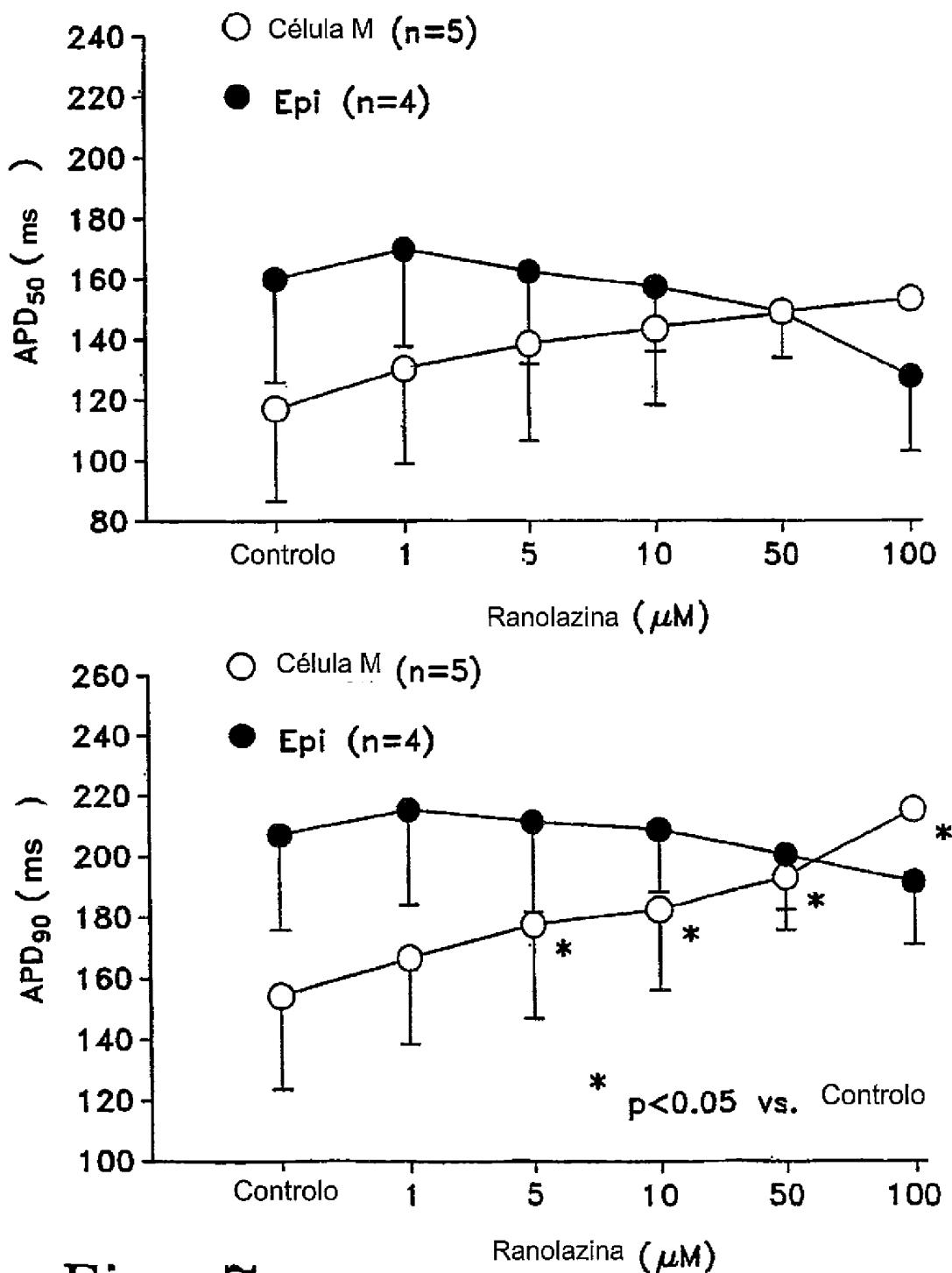


Fig. 7

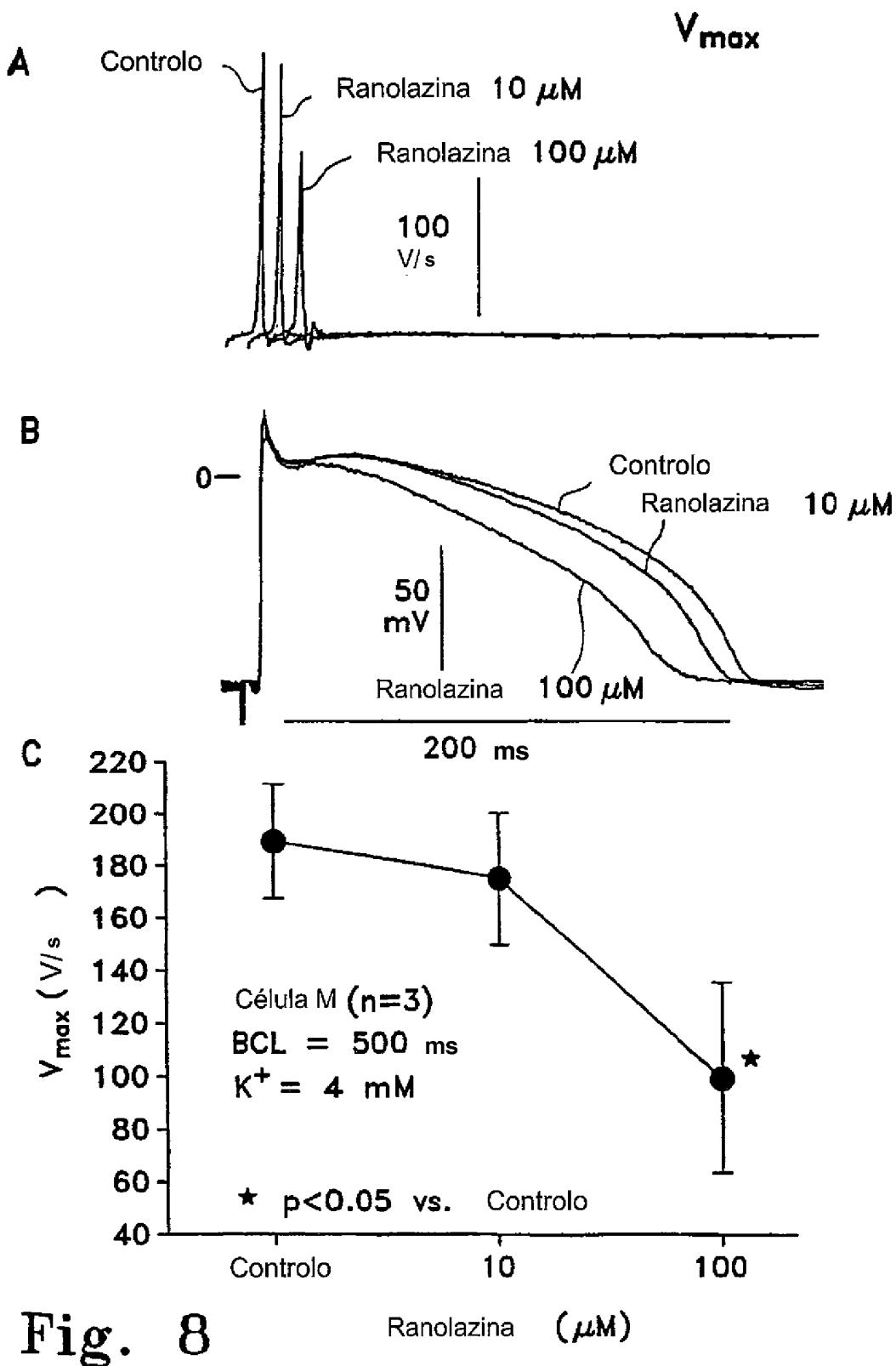


Fig. 8

Fig. 9A

Fig. 9B

Fig. 9

BCL = 2000 ms , $[K^+]_o = 2 \text{ mM}$

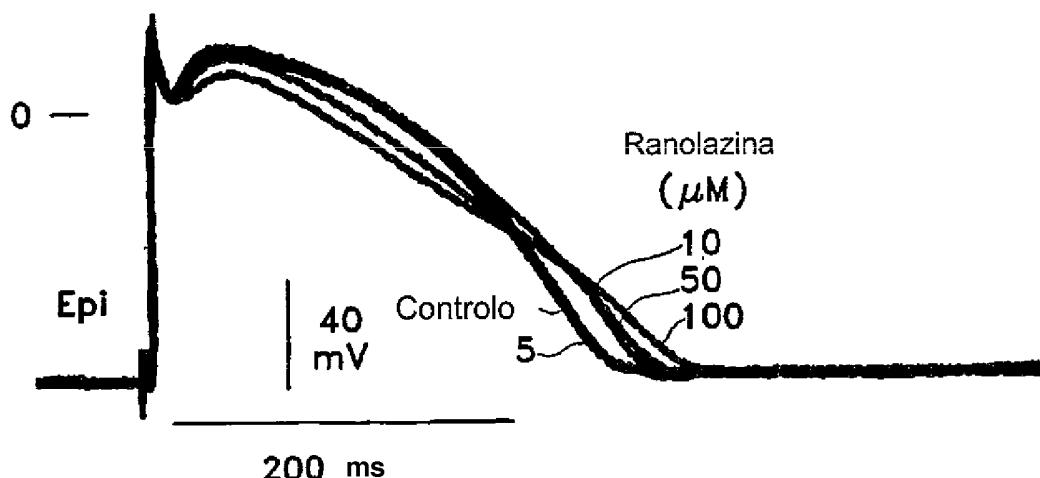
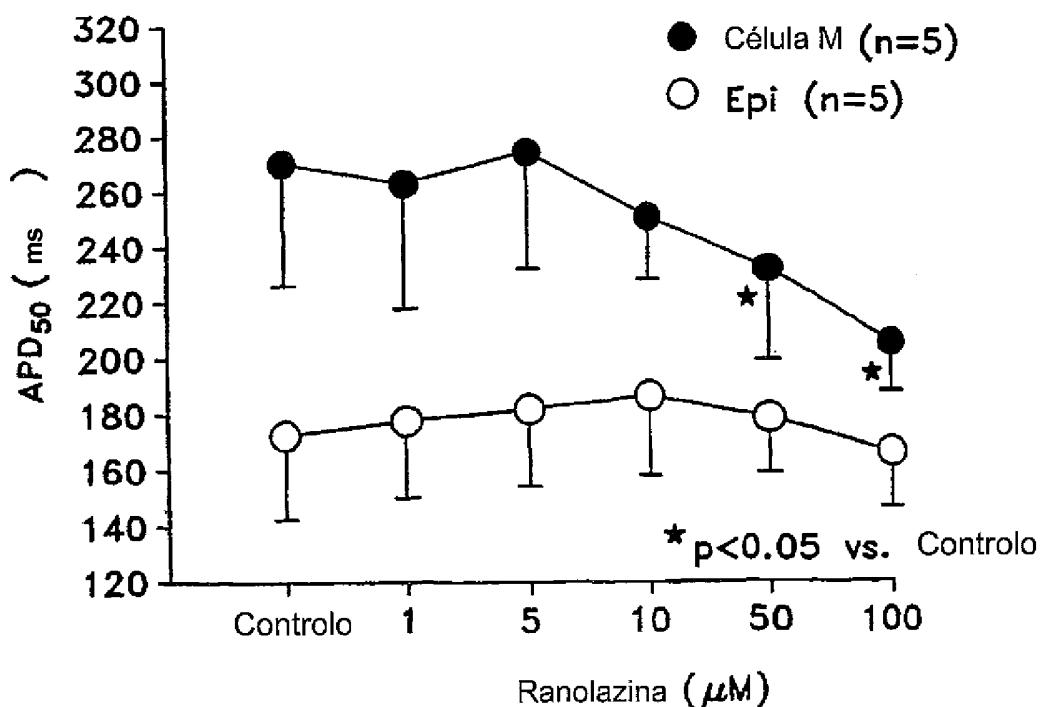
a**B**

Fig. 9A

BCL = 2000 ms , $[K^+]_o = 2$ mM

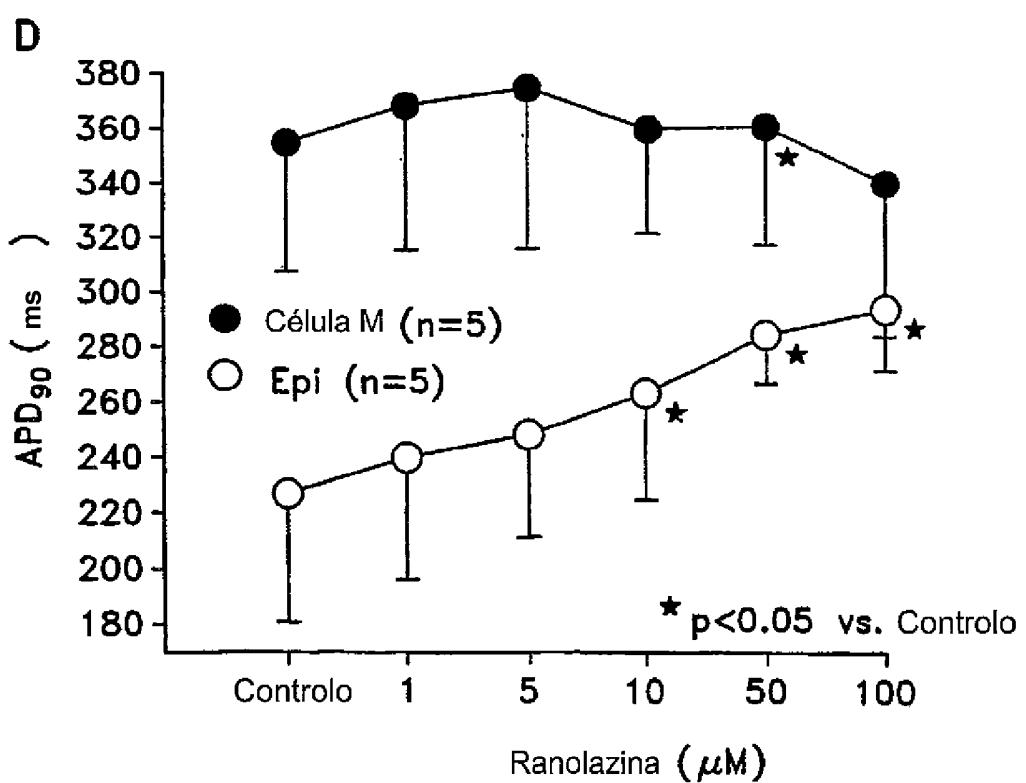
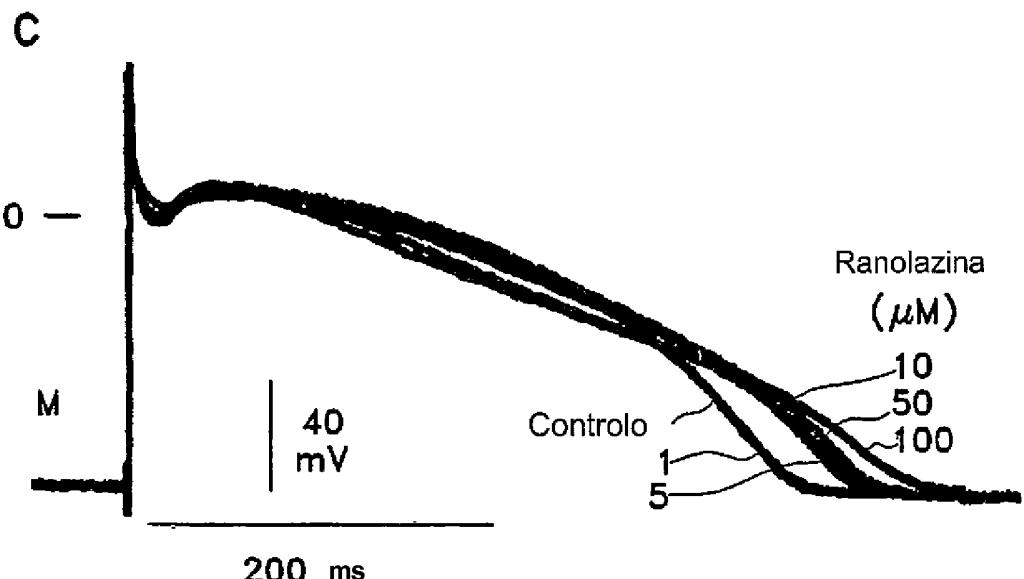


Fig. 9B

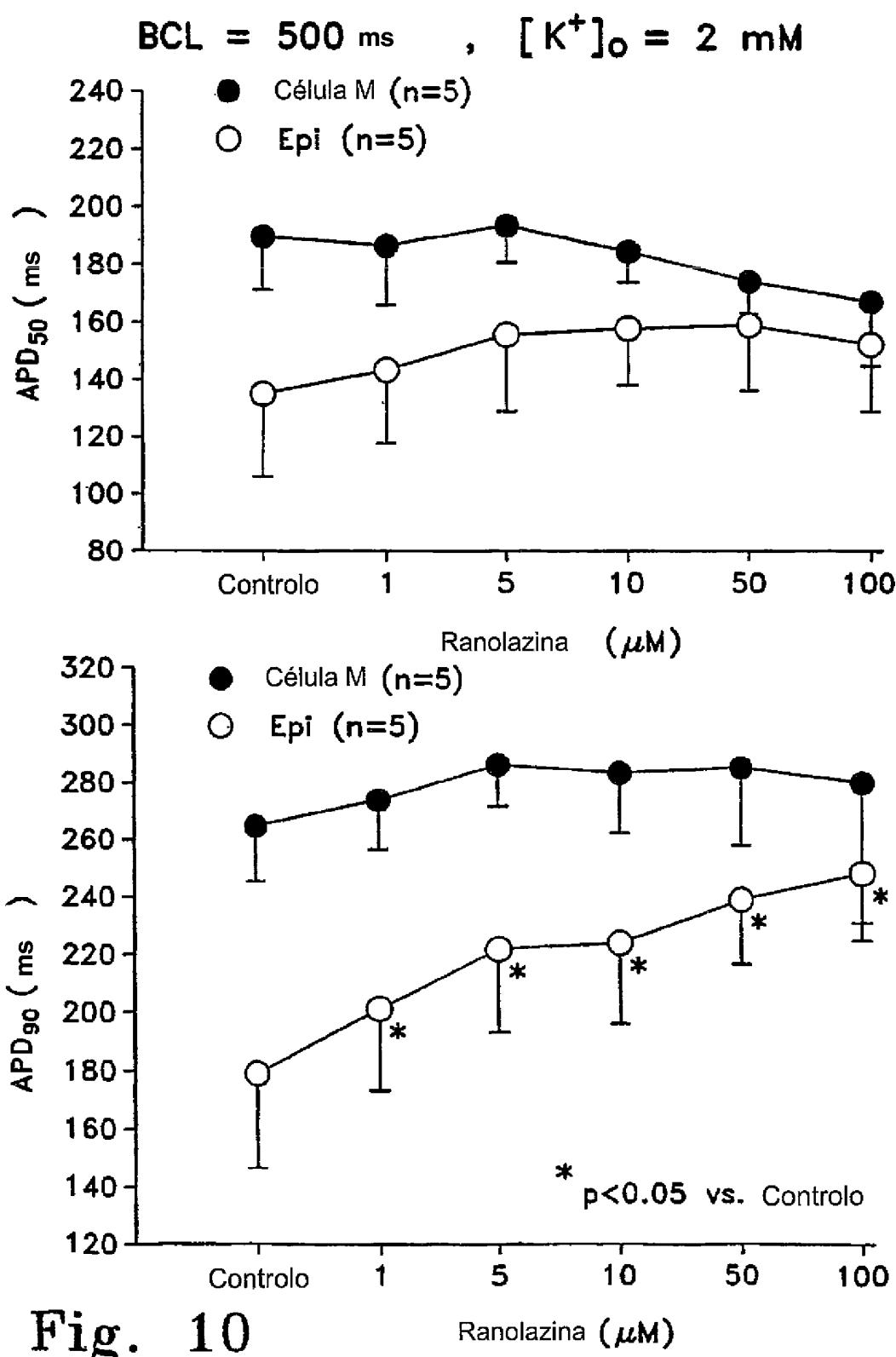


Fig. 11A Fig. 11B



Fig. 11

Fatia LV (parede anterior) BCL-2000 ms

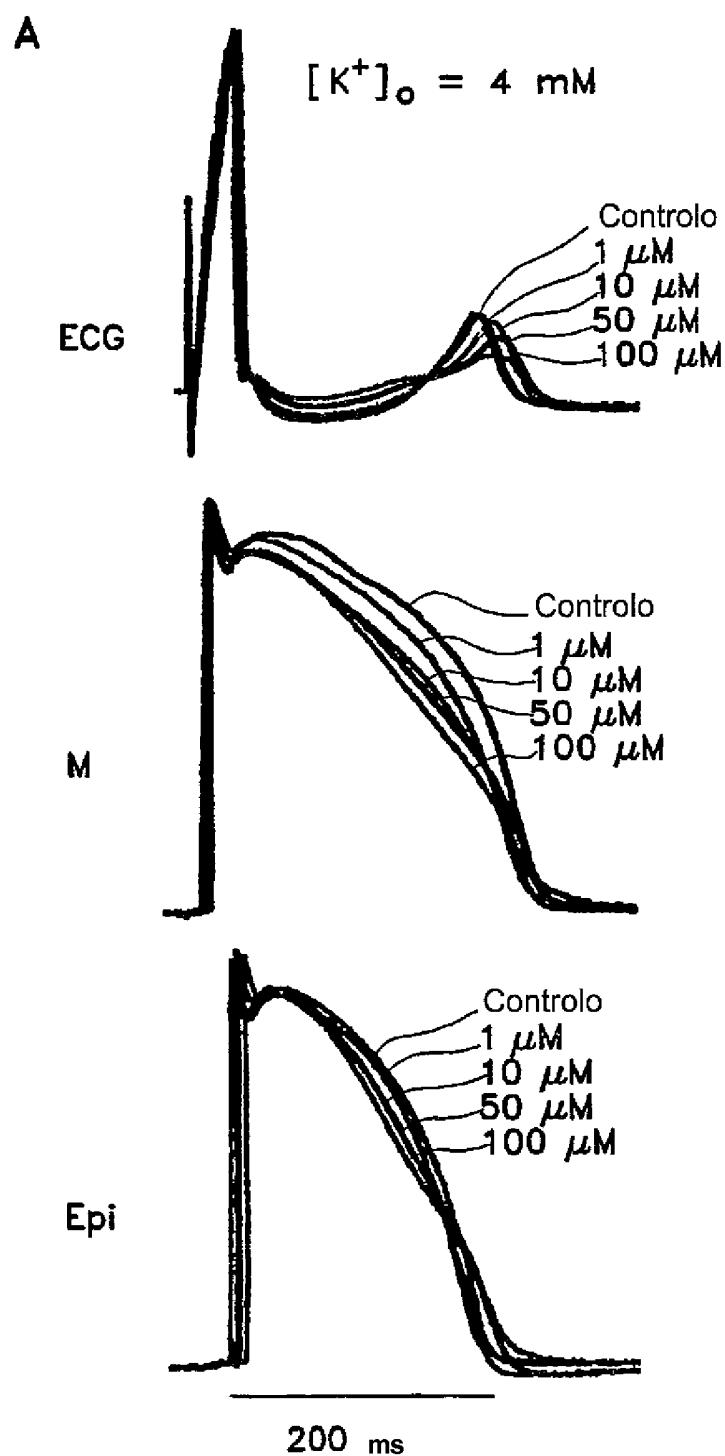


Fig. 11A

Fatia LV (parede anterior) BCL-2000 ms

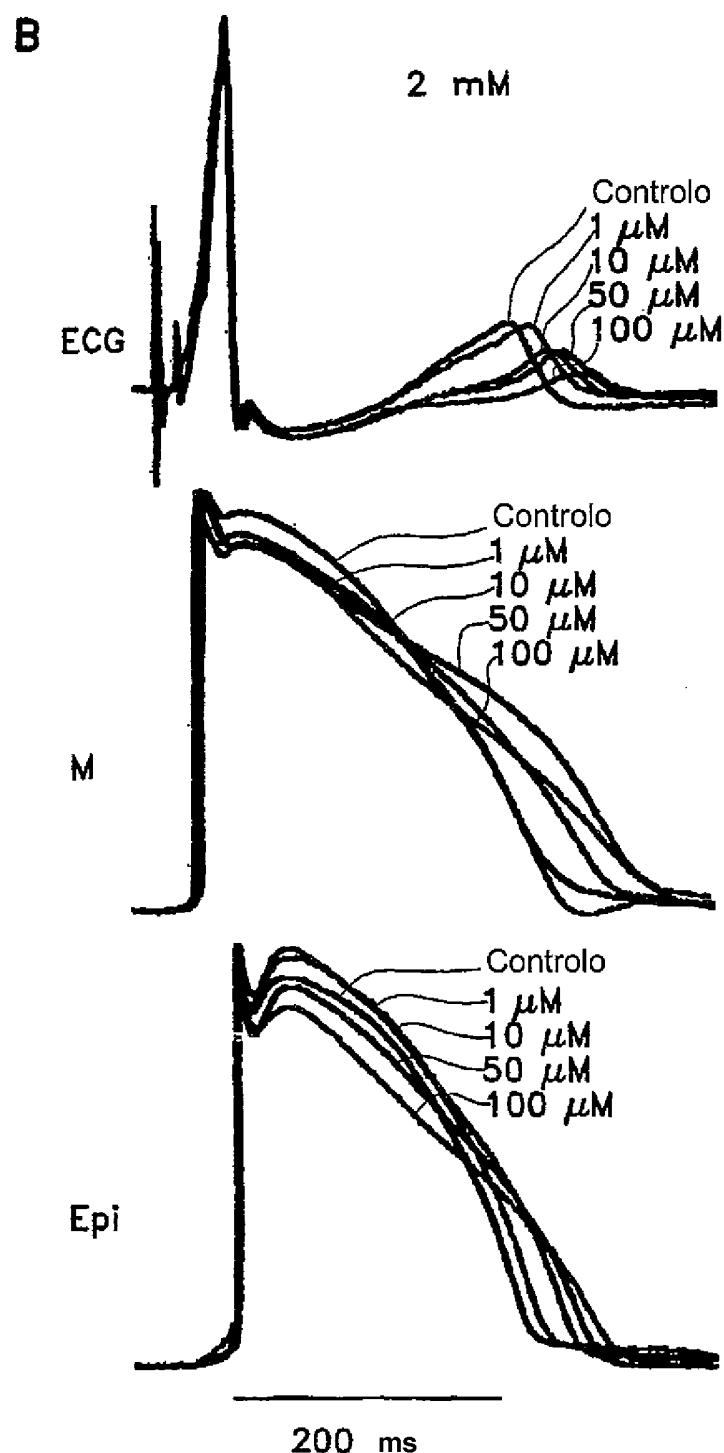
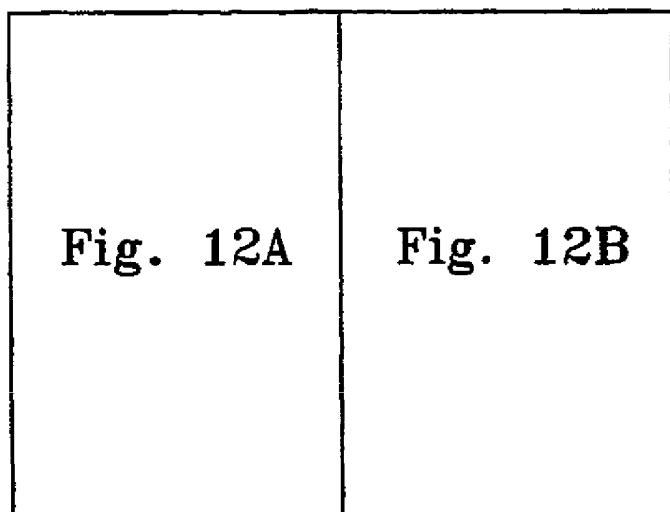


Fig. 11B



A horizontal brace or bracket is positioned below the two panels, indicating they are part of a single figure. The text "Fig. 12" is centered below the panels.

Fig. 12

Fatia LV (parede anterior) BCL-2000 ms

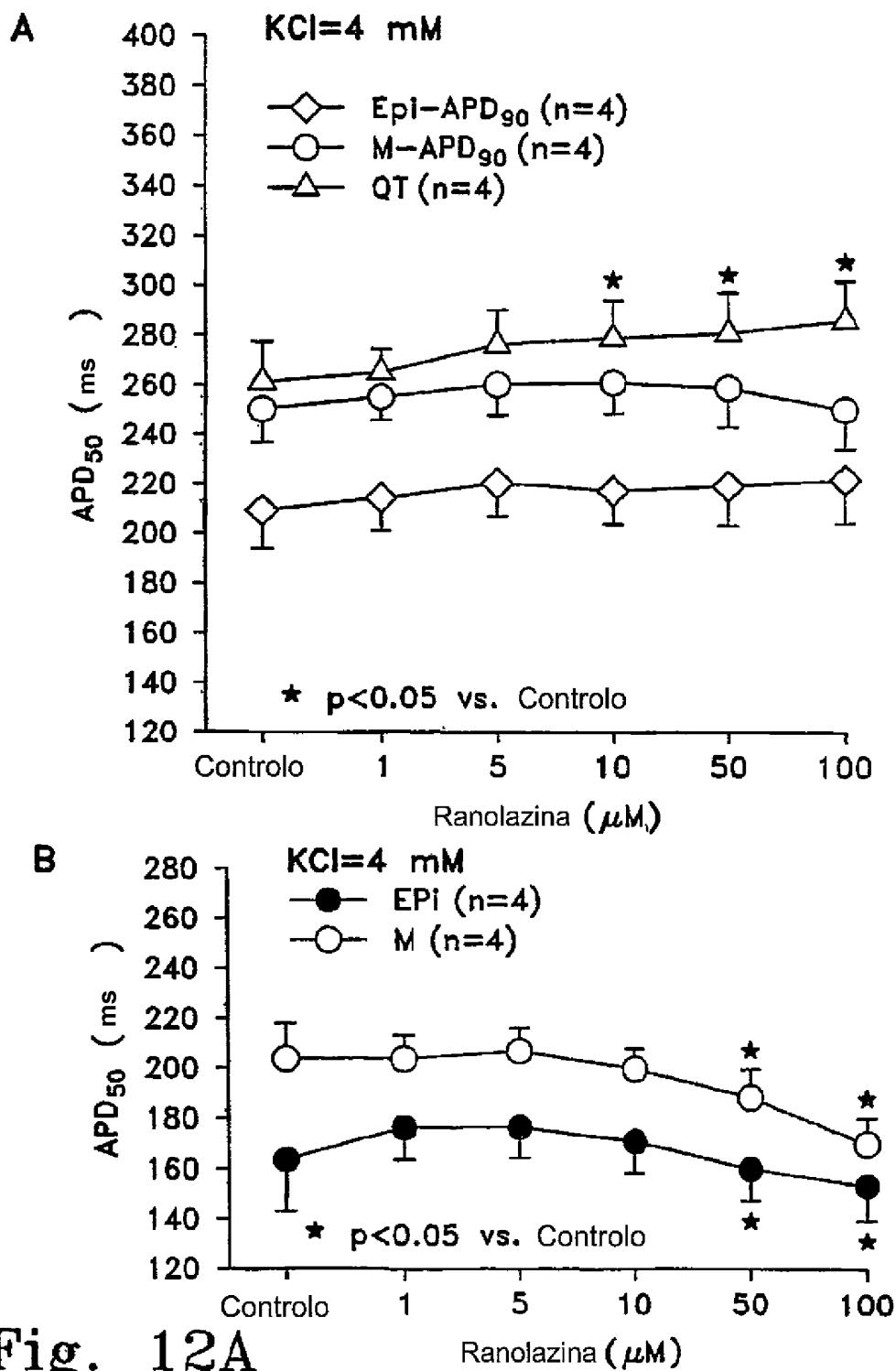


Fig. 12A

Fatia LV (parede anterior) BCL-2000 ms

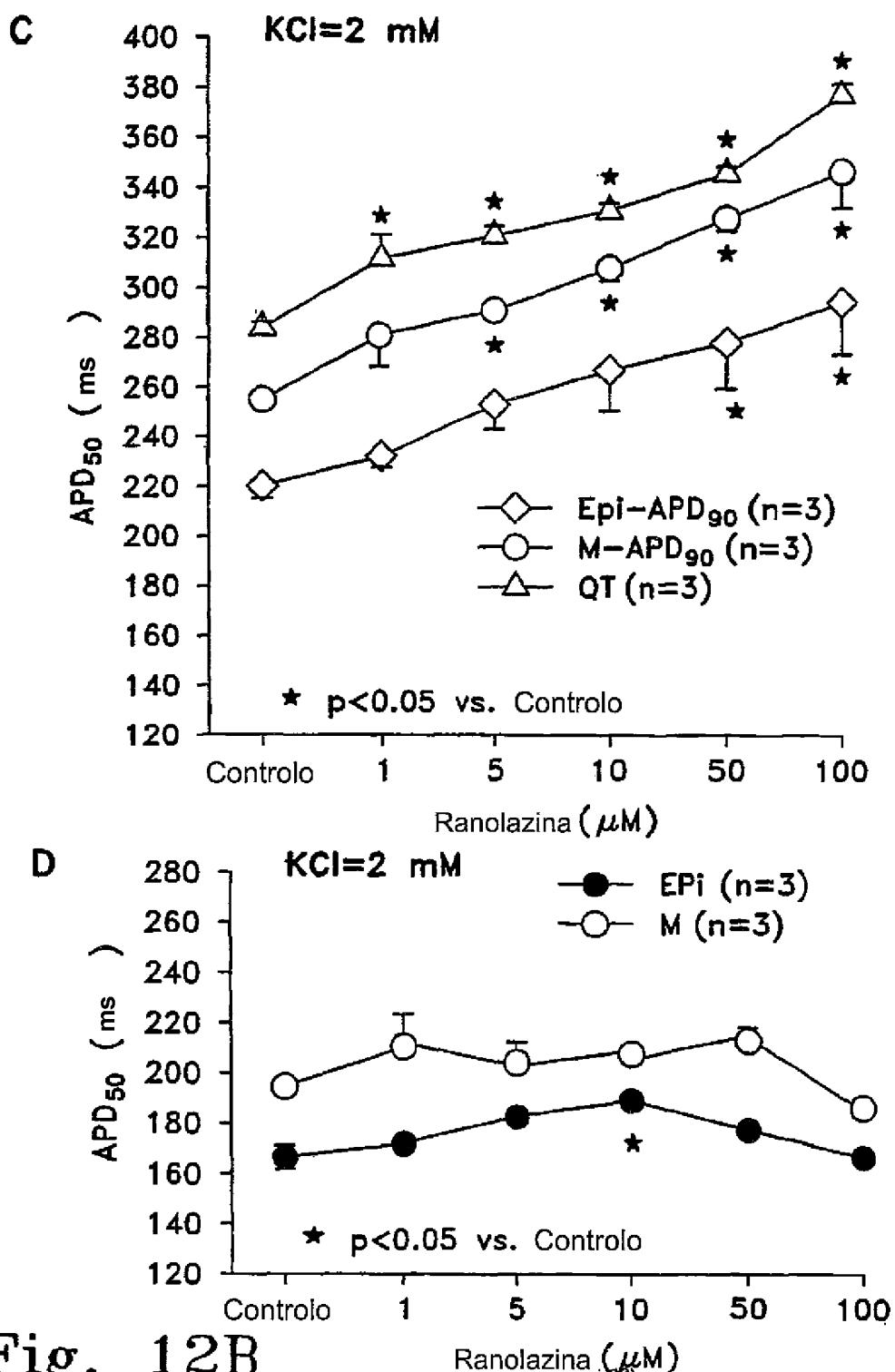


Fig. 12B

Supressão de EAD por ranolazina

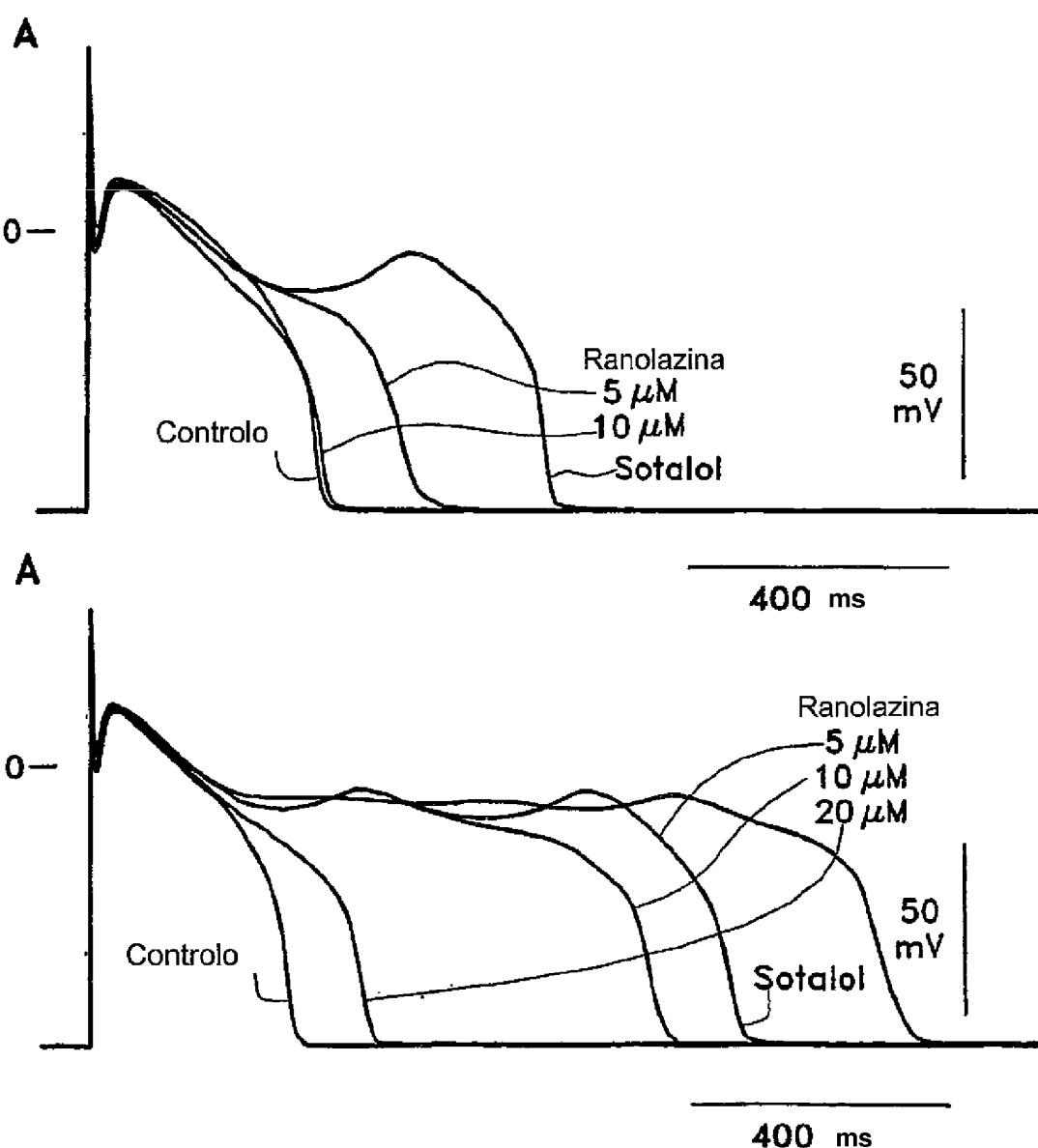


Fig. 13

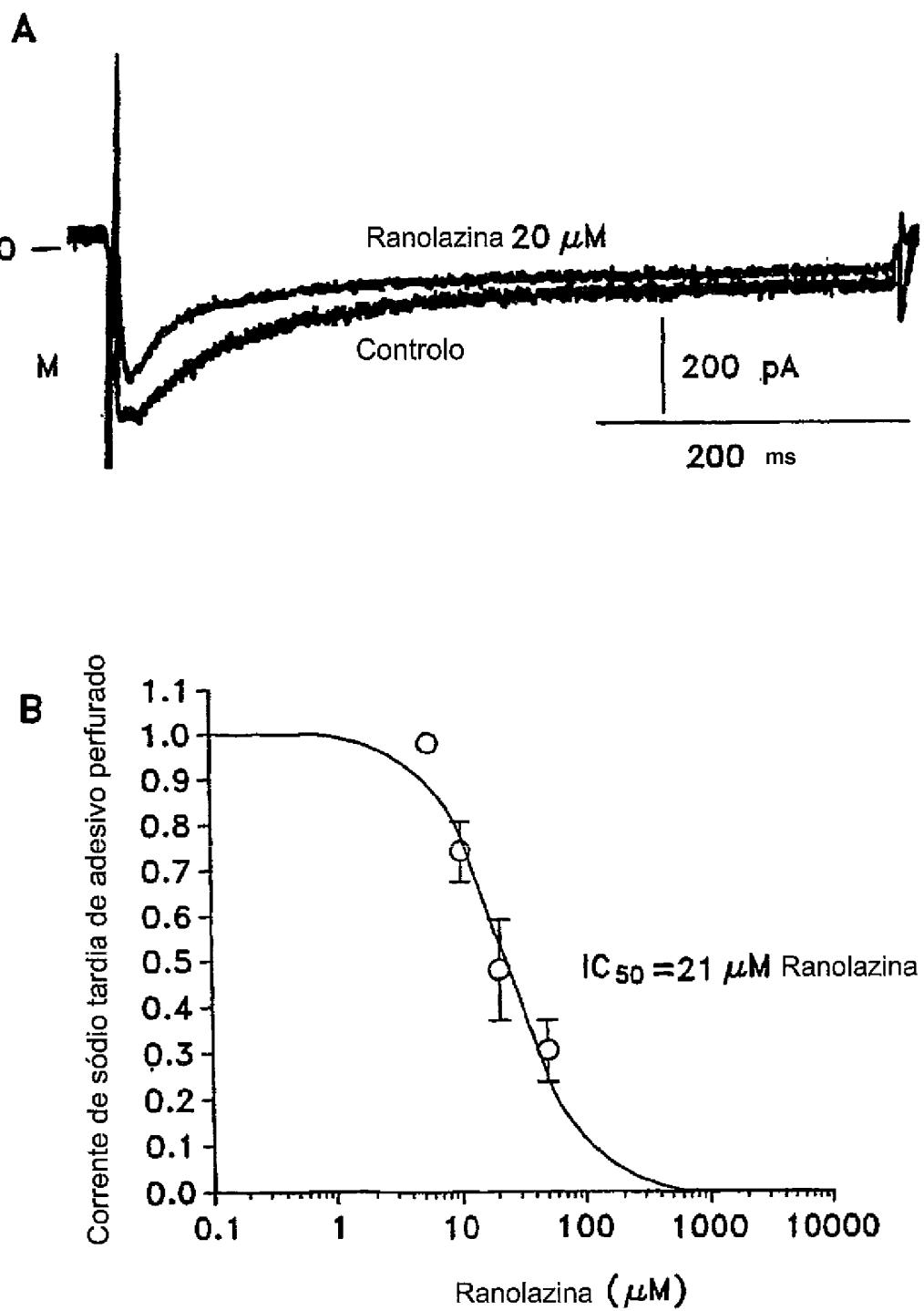


Fig. 14

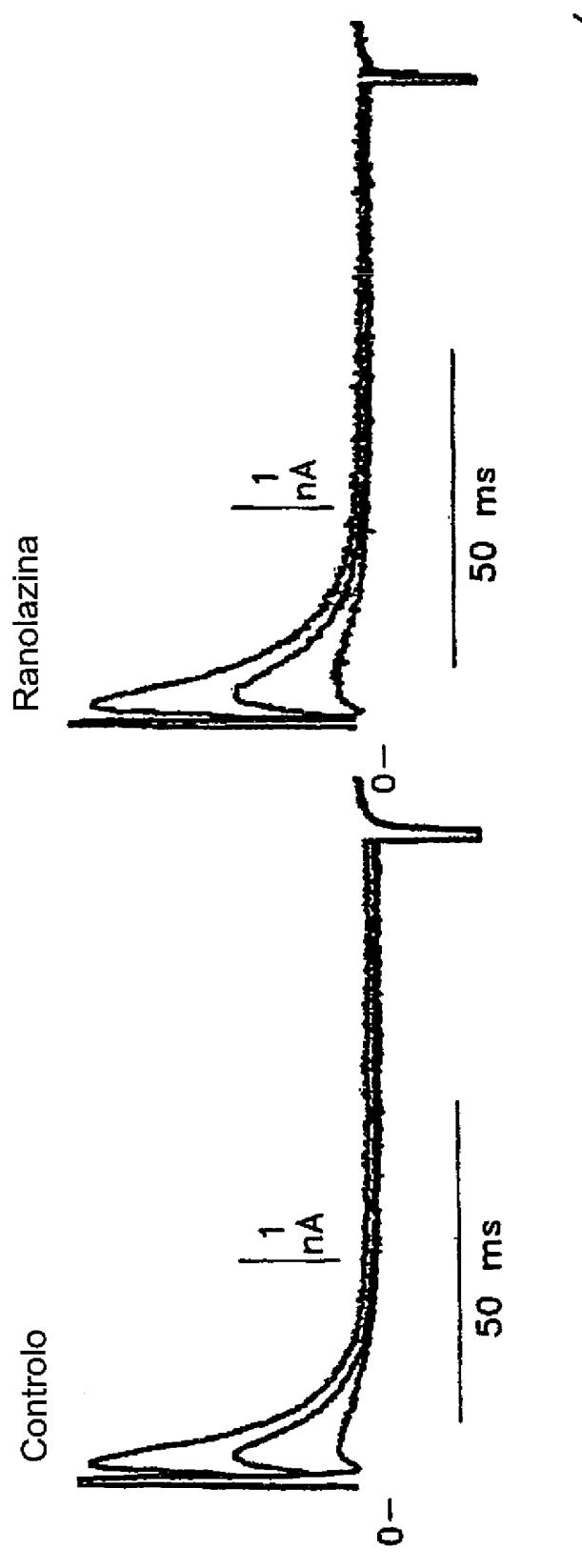
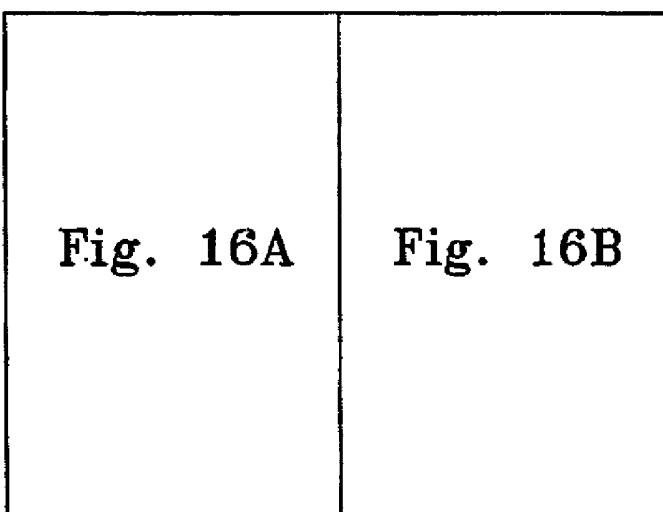
Efeitos de ranolazina na I_{to} 

Fig. 15



A horizontal brace or bracket is positioned below the two figures, indicating they are part of a single figure set.

Fig. 16

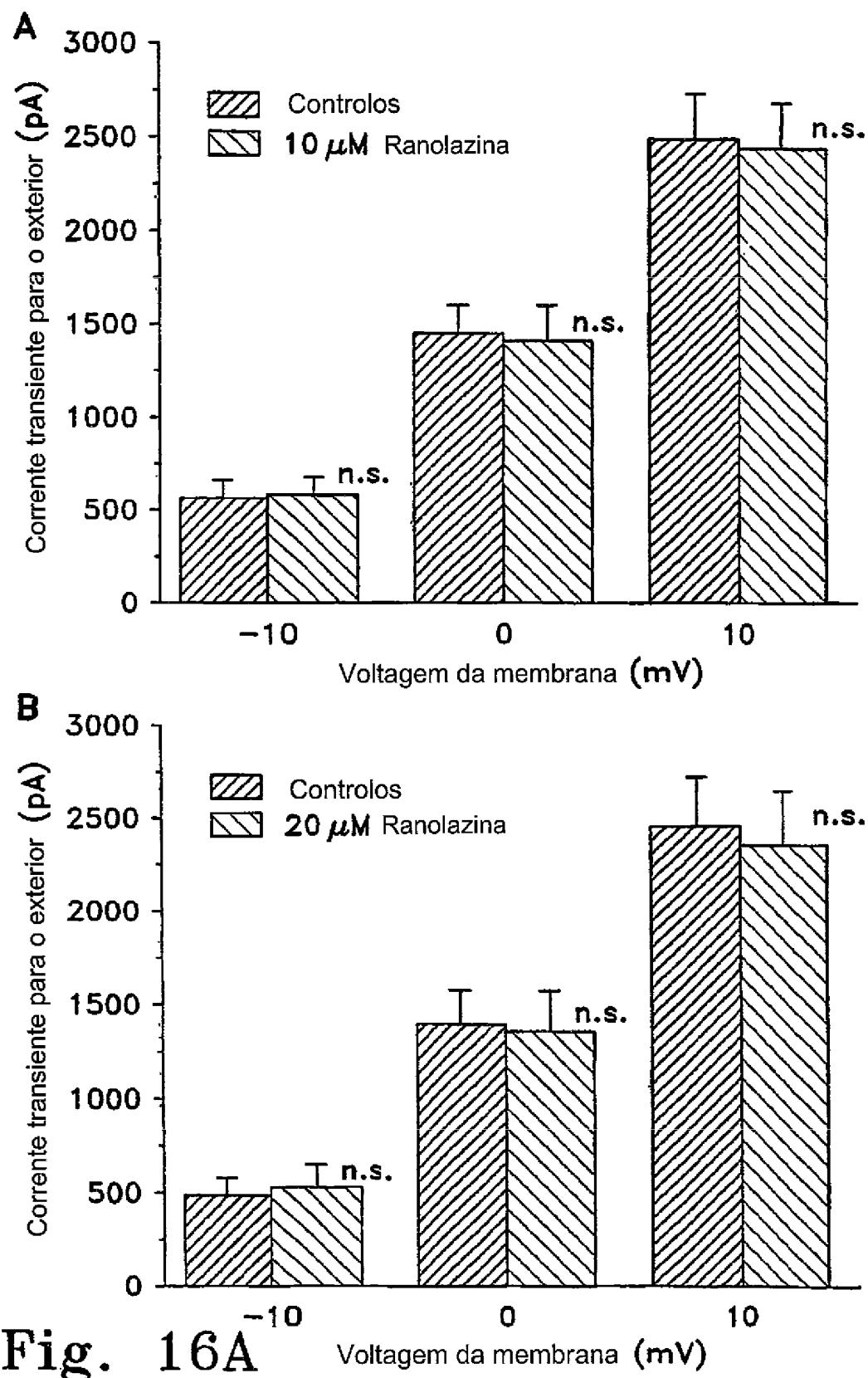


Fig. 16A

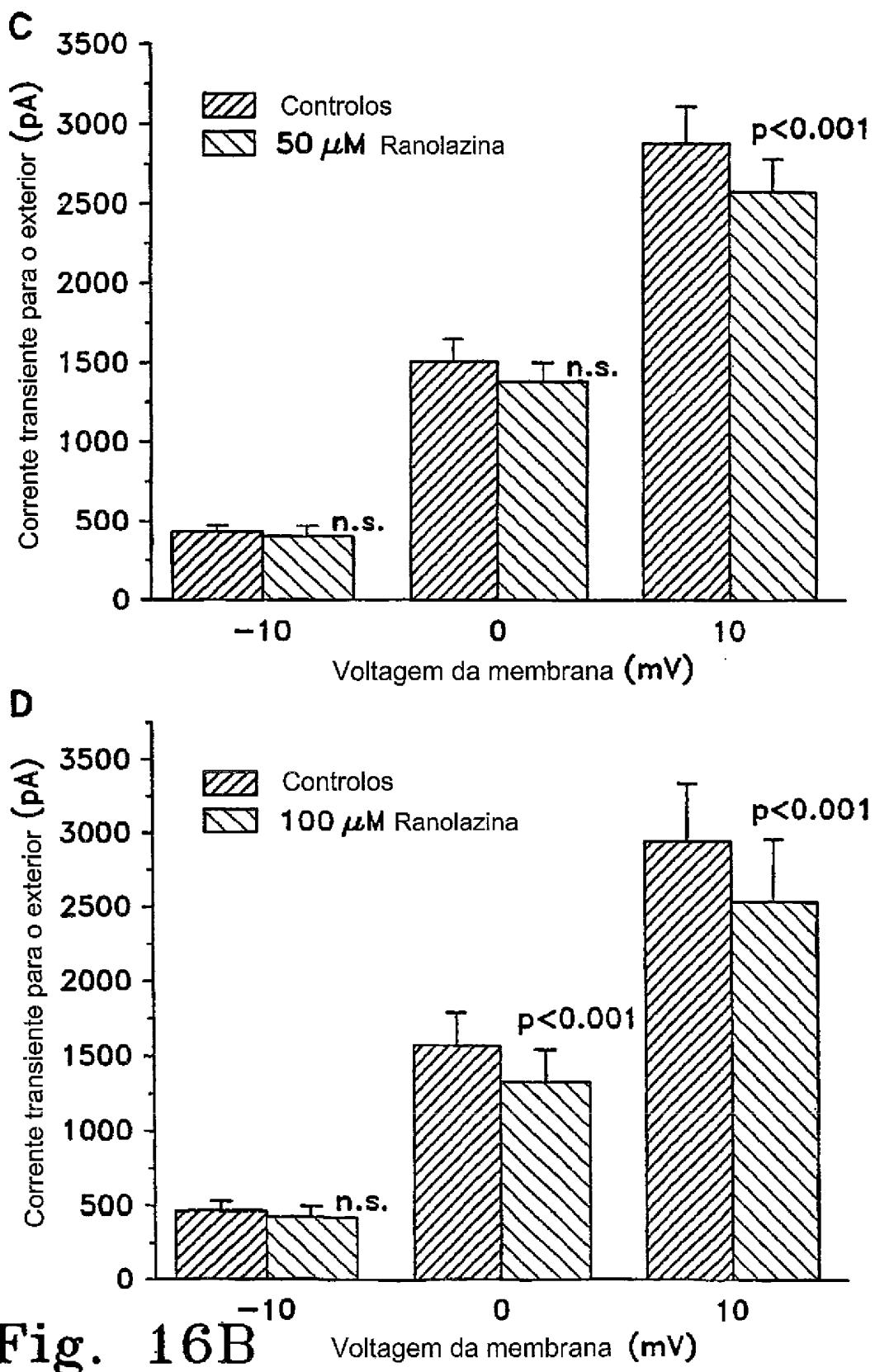


Fig. 16B

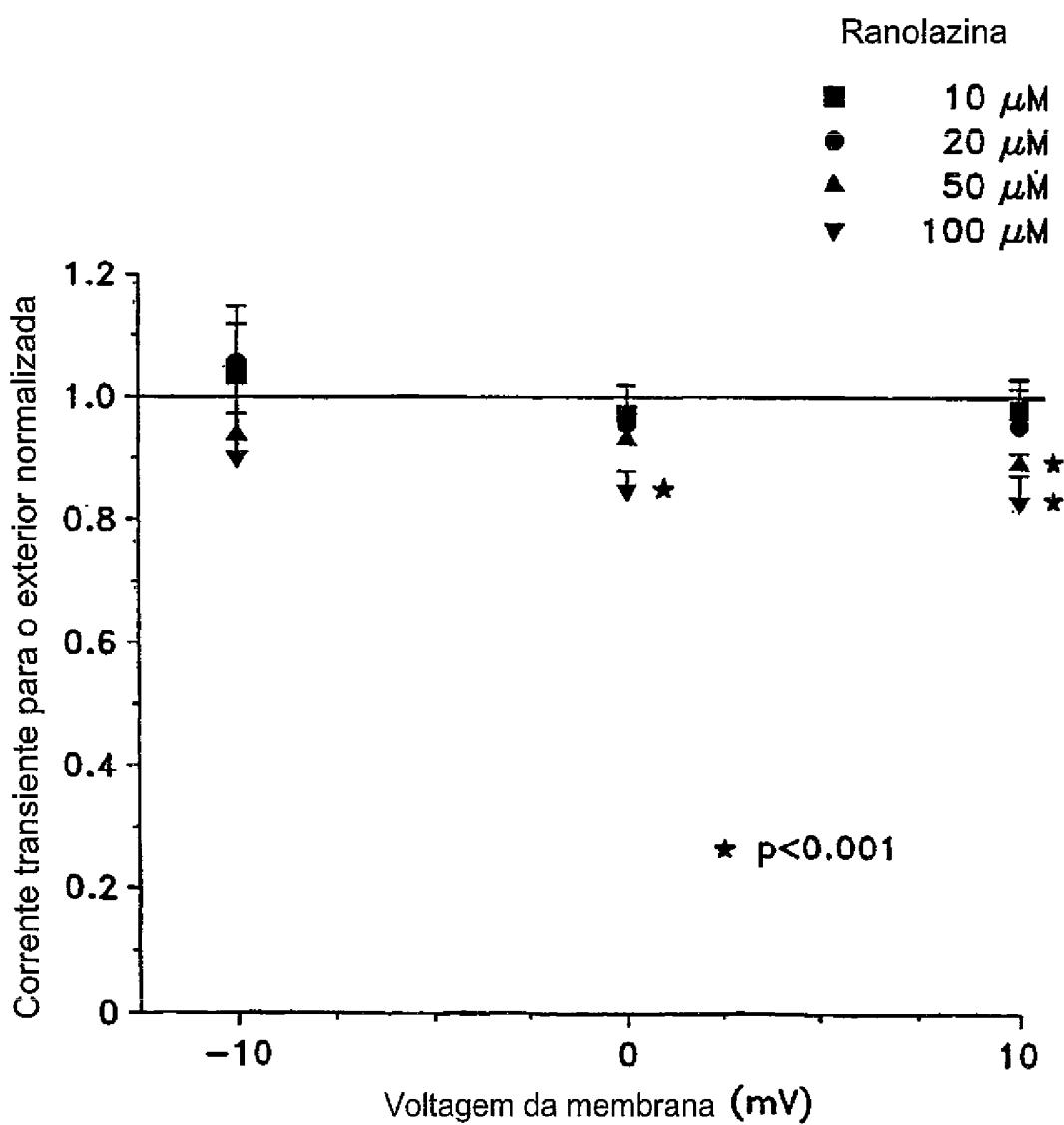
Efeitos de ranolazina na I_{to1} 

Fig. 17

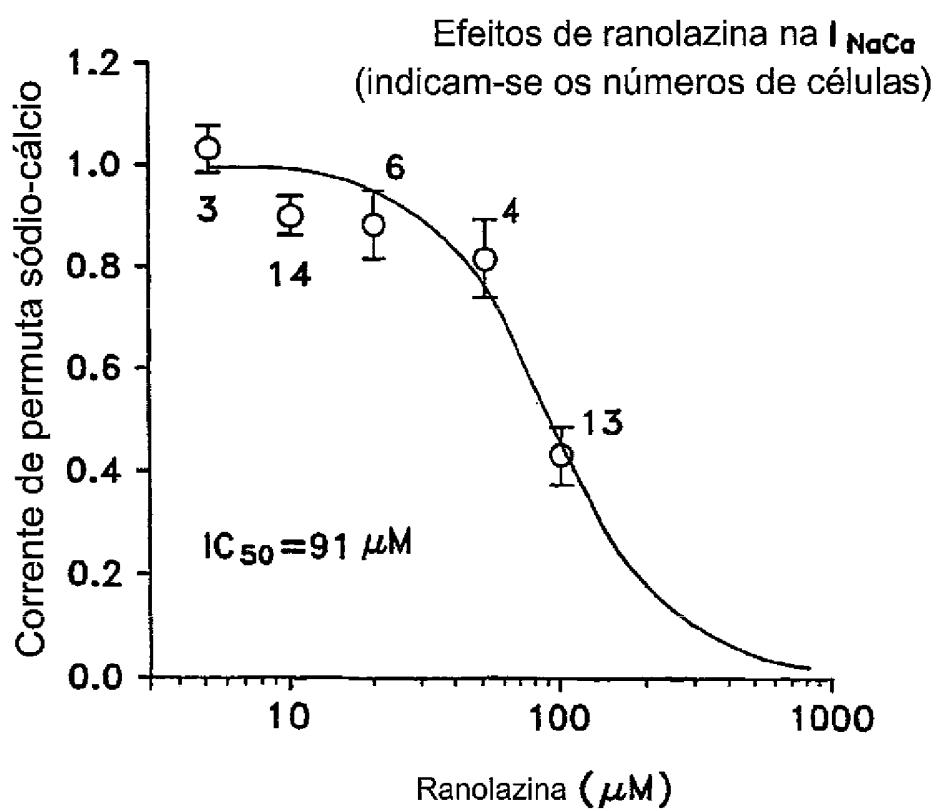
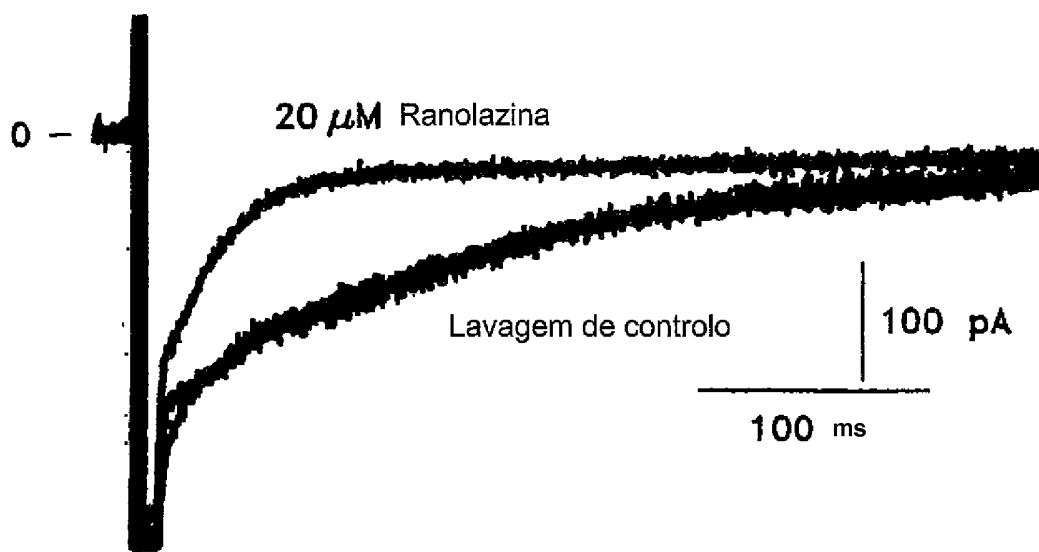


Fig. 18

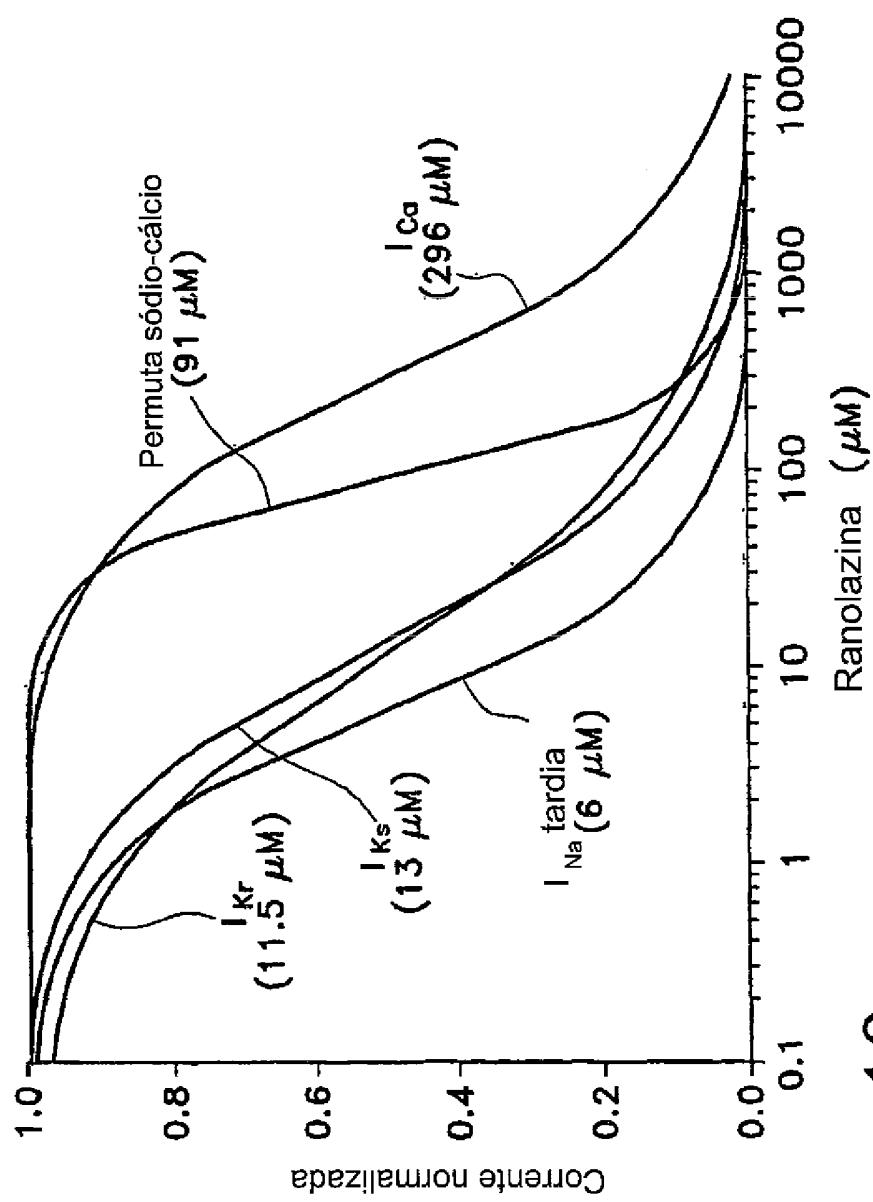


Fig. 19

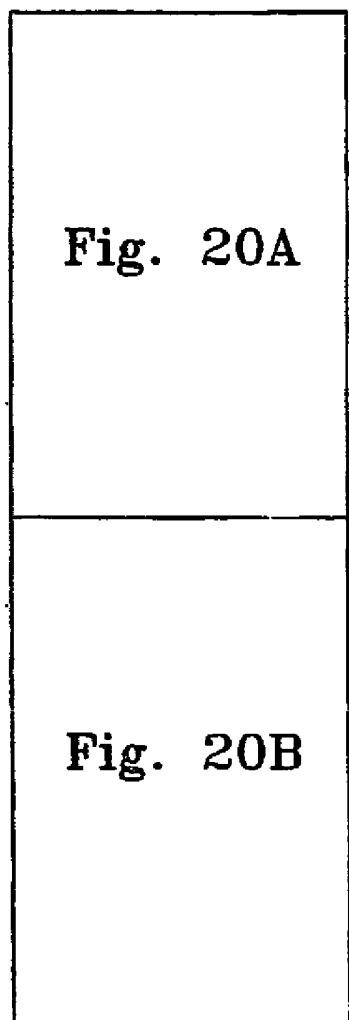
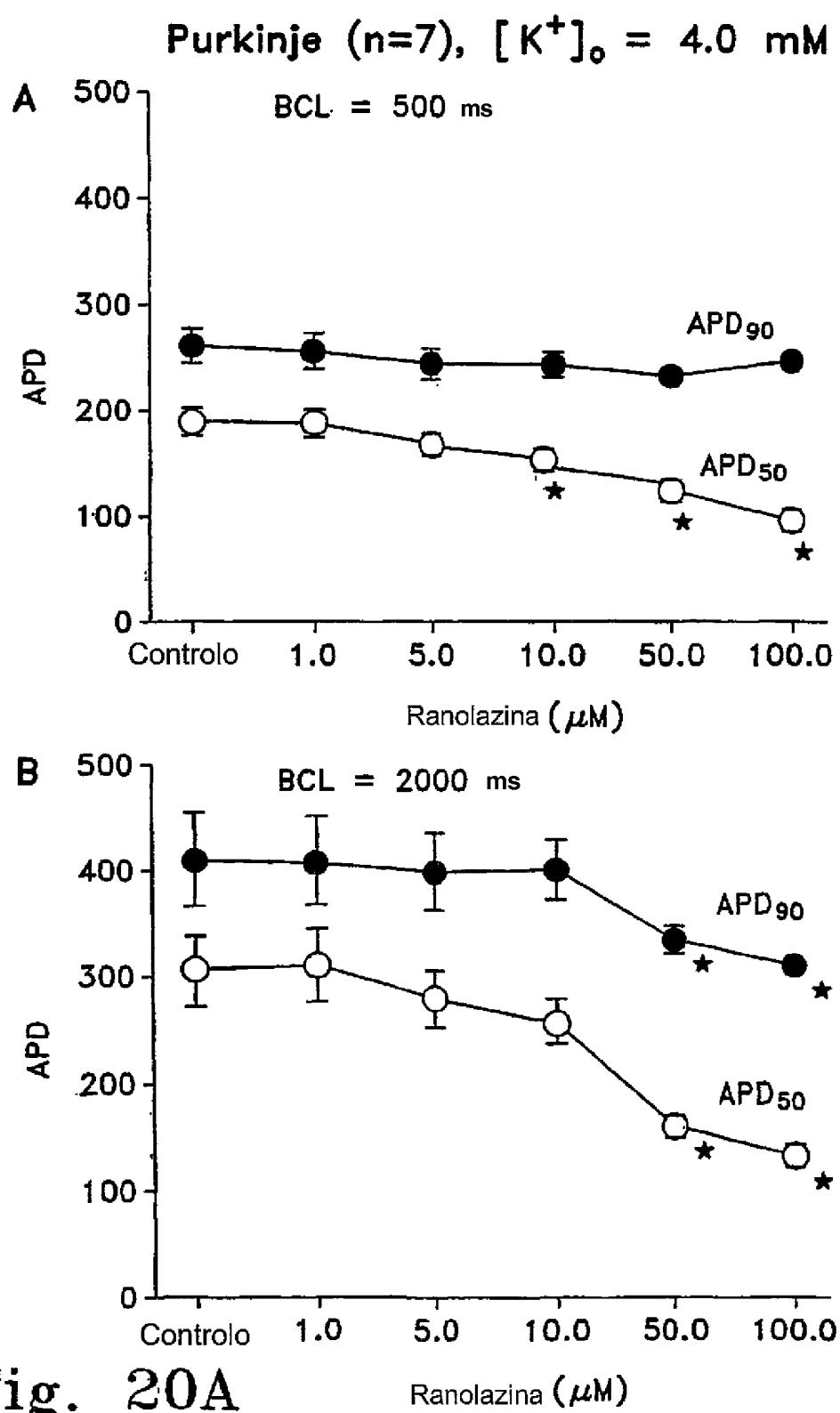


Fig. 20



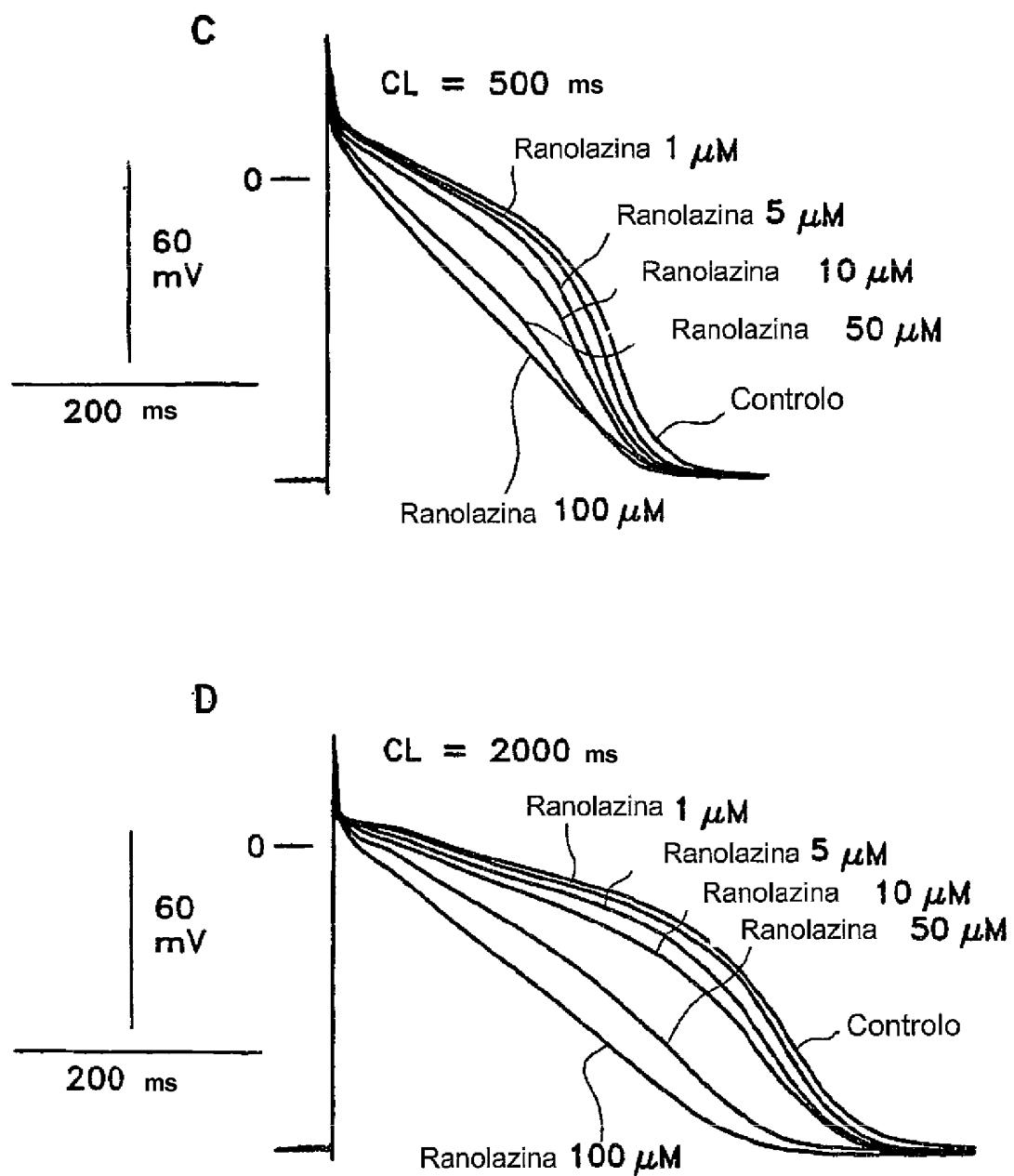


Fig. 20B

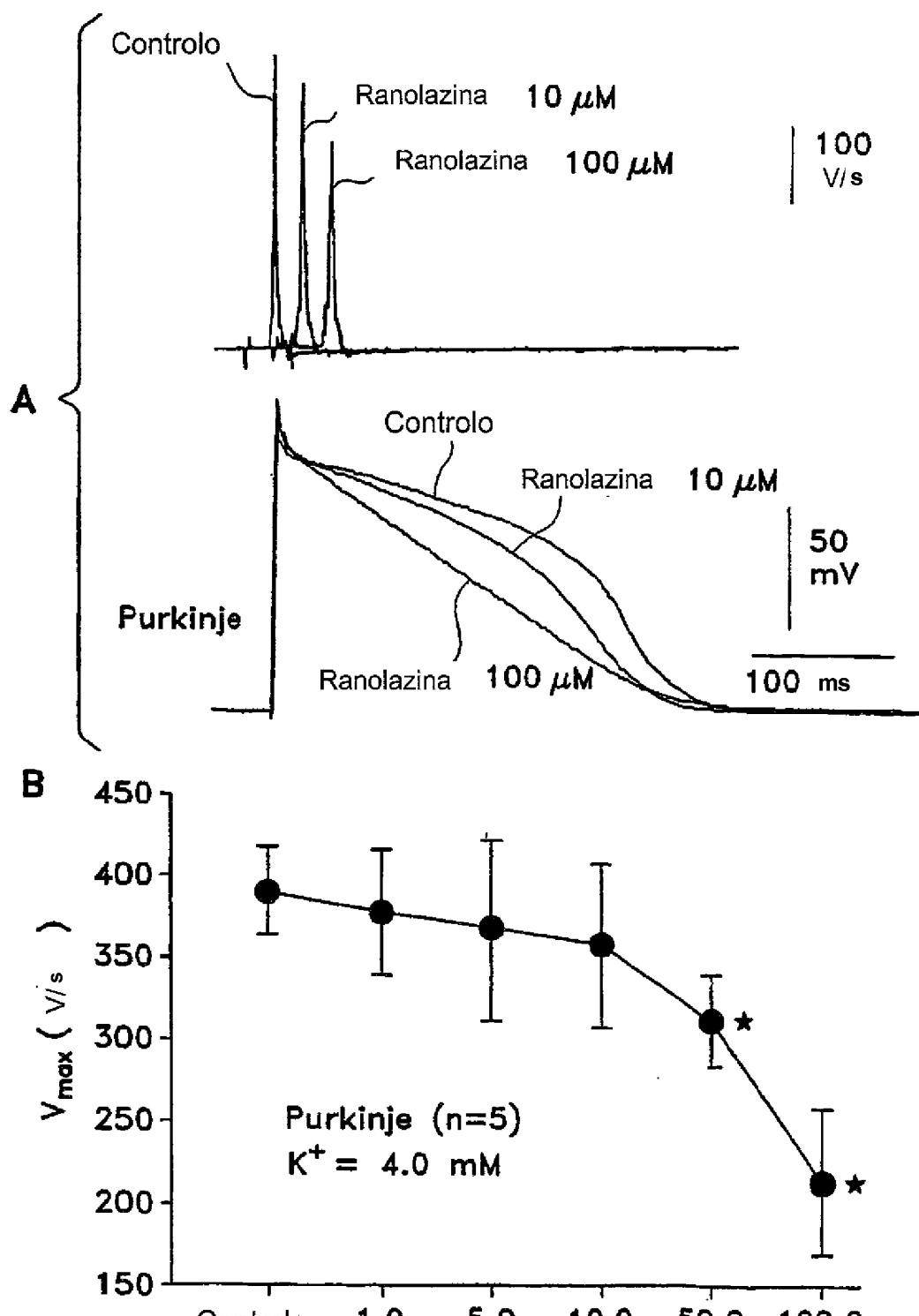


Fig. 21

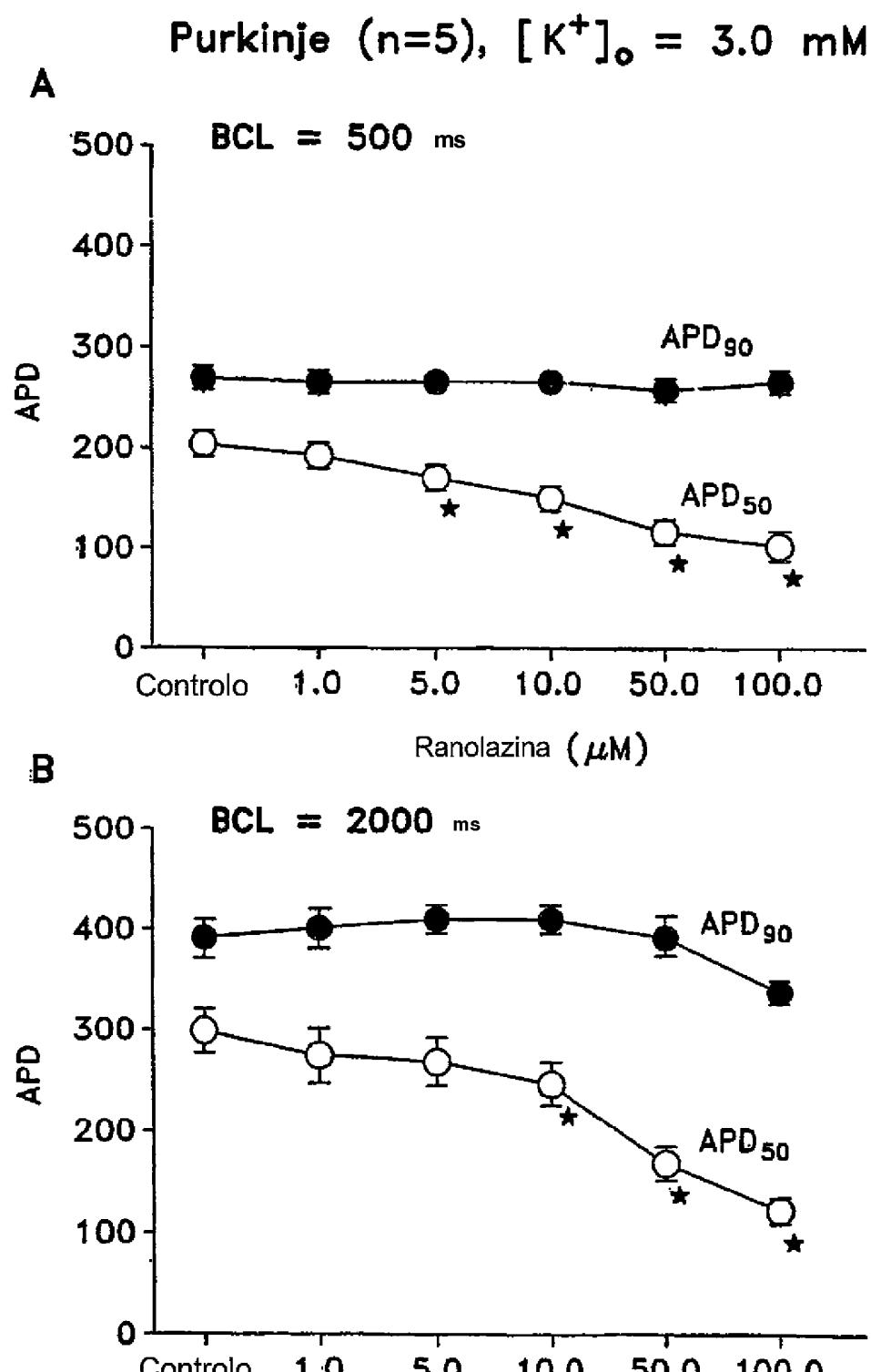


Fig. 22

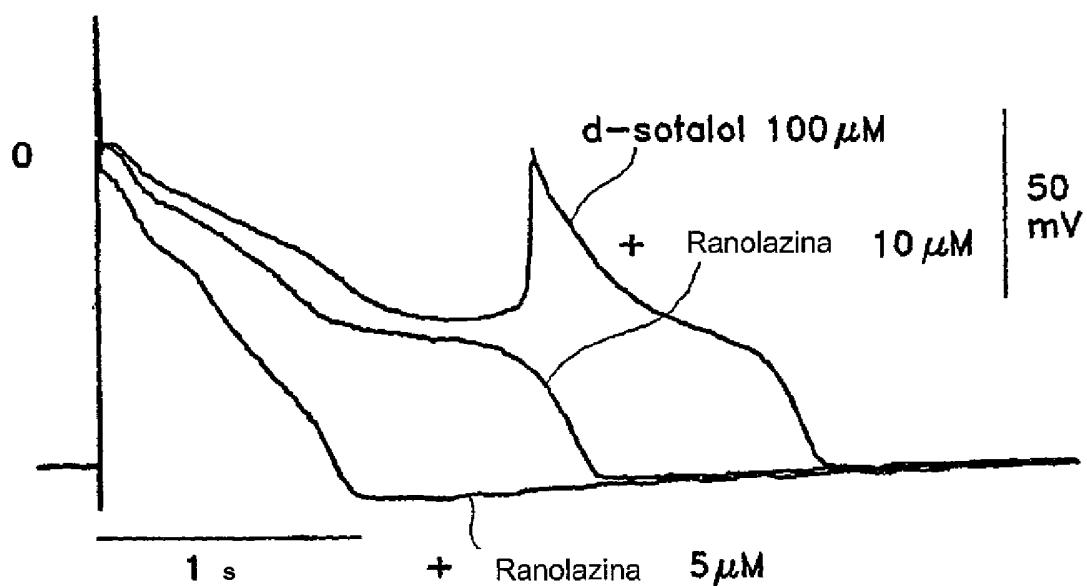


Fig. 23

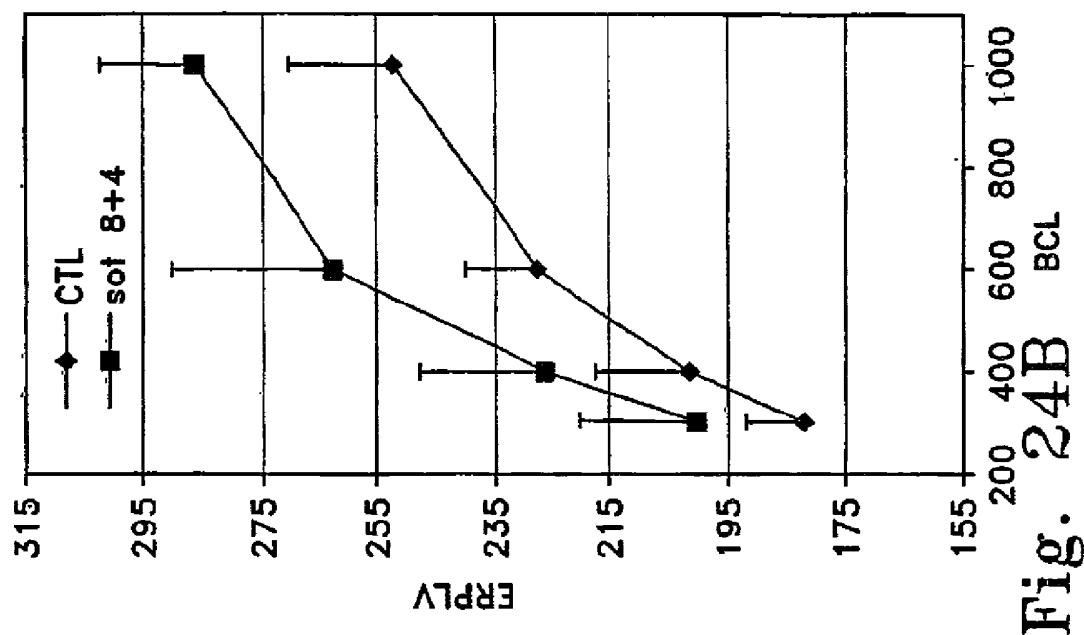


Fig. 24B

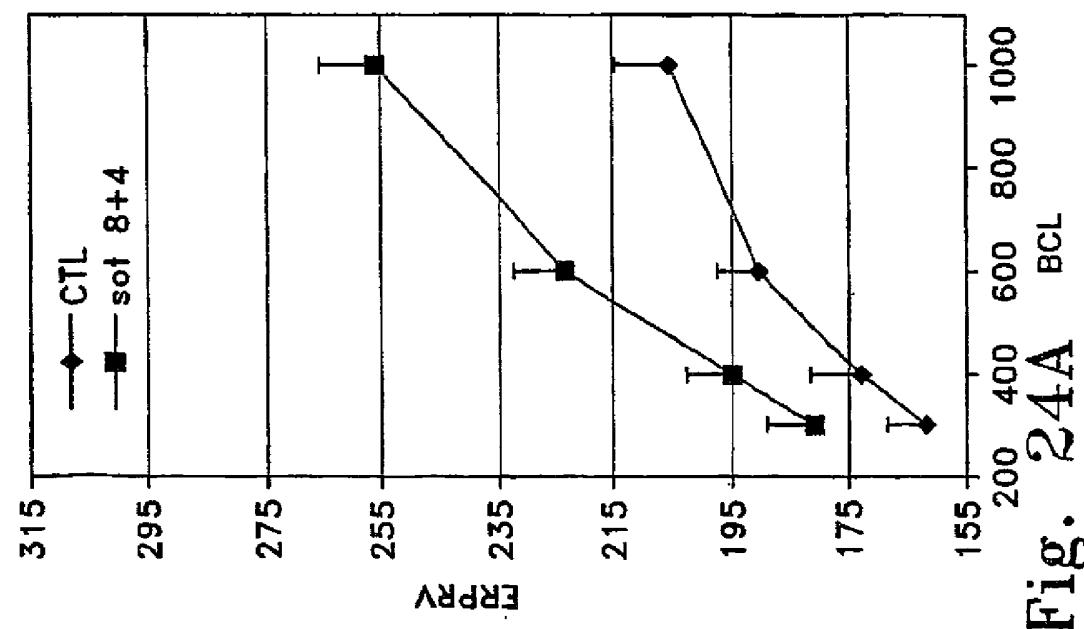


Fig. 24A

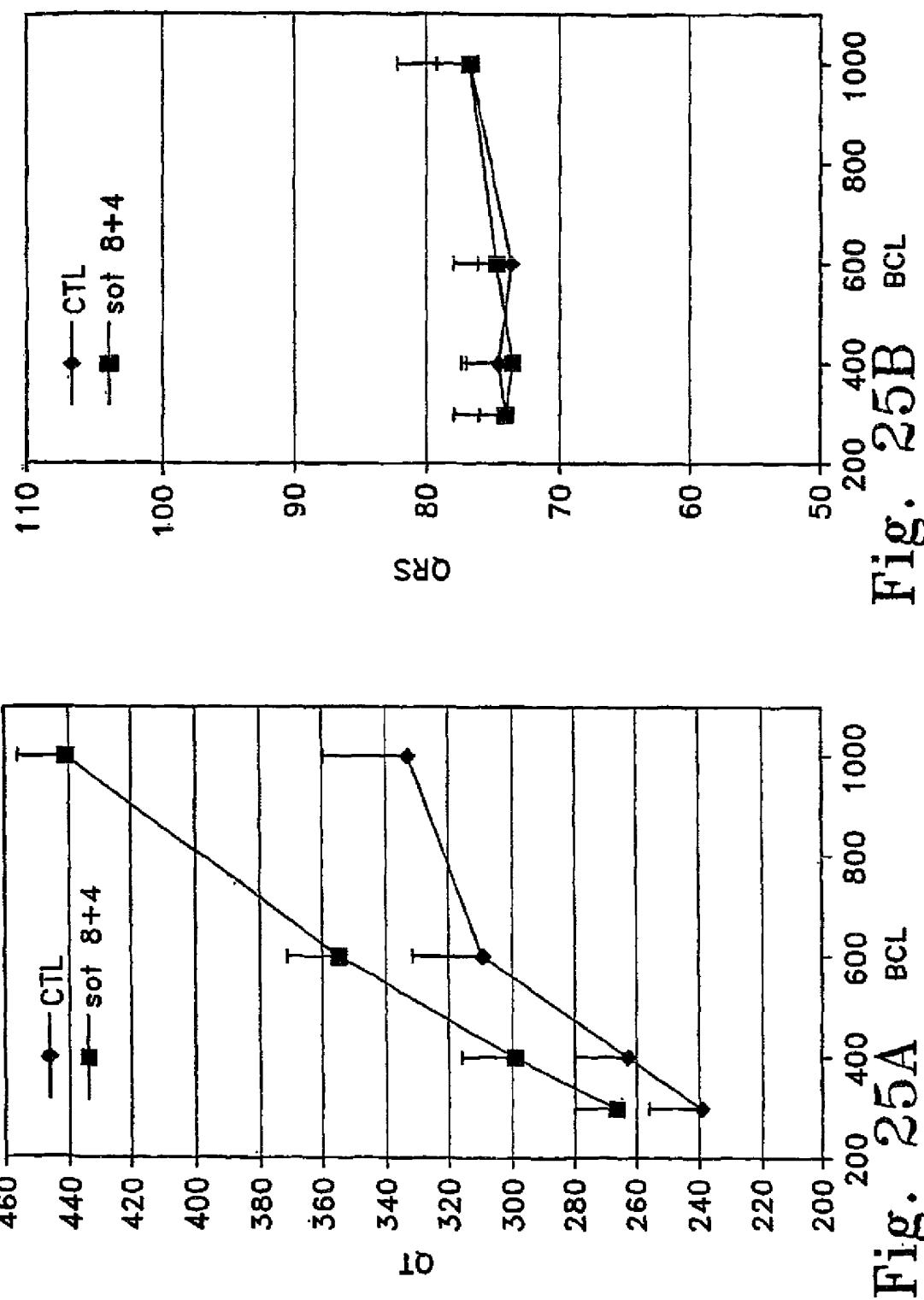


Fig. 25A

Fig. 25B

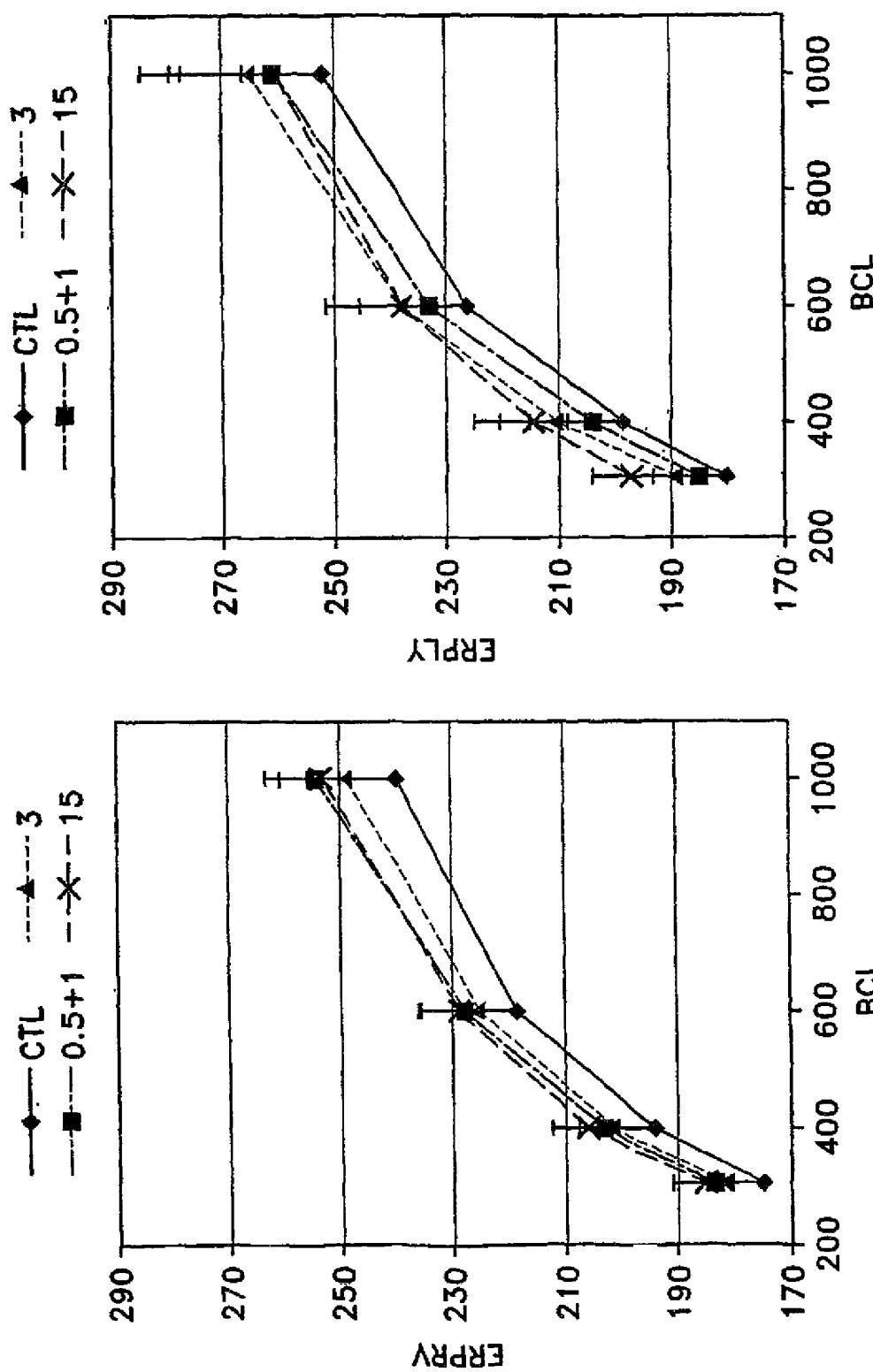


Fig. 26
Fig. 27

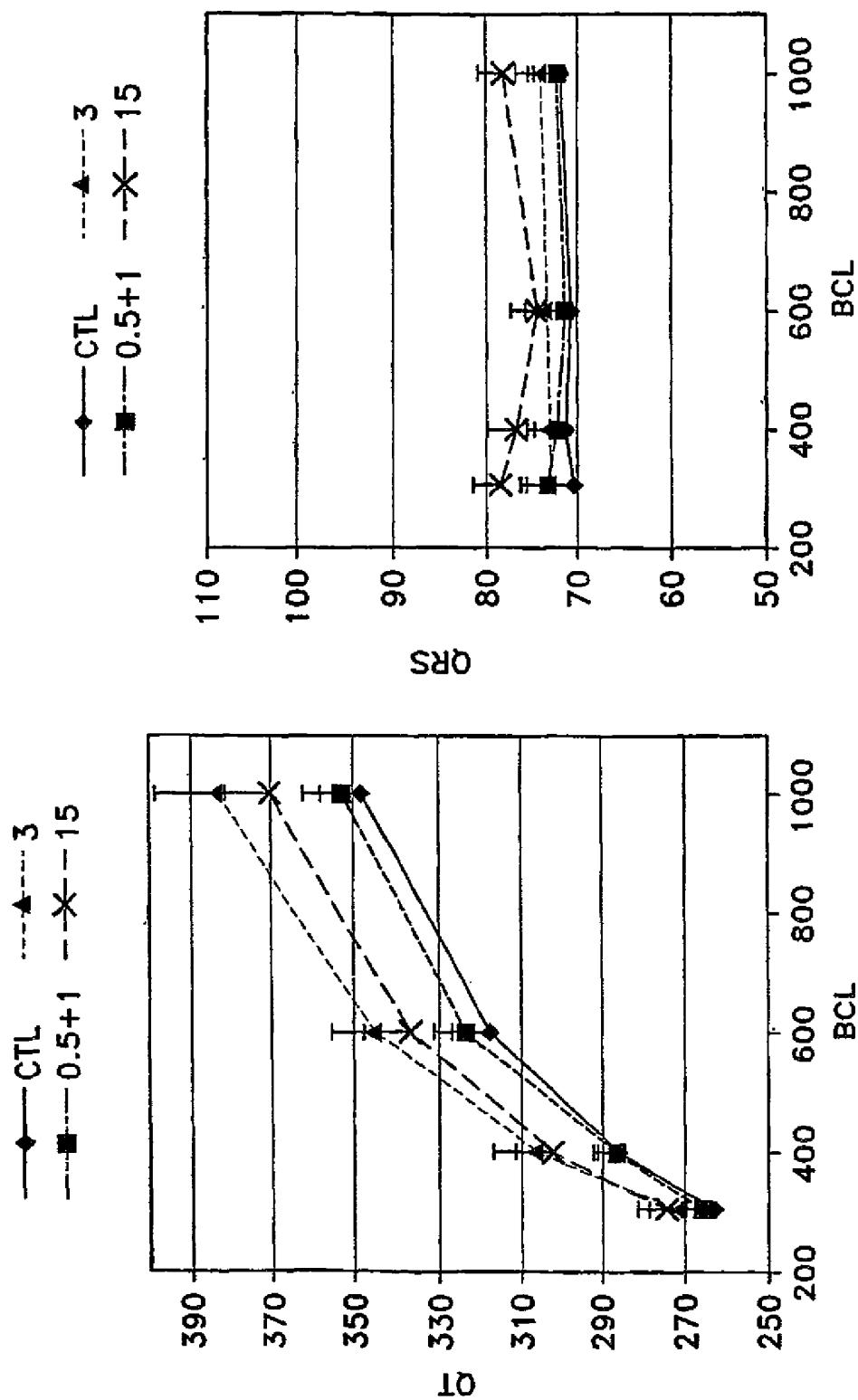
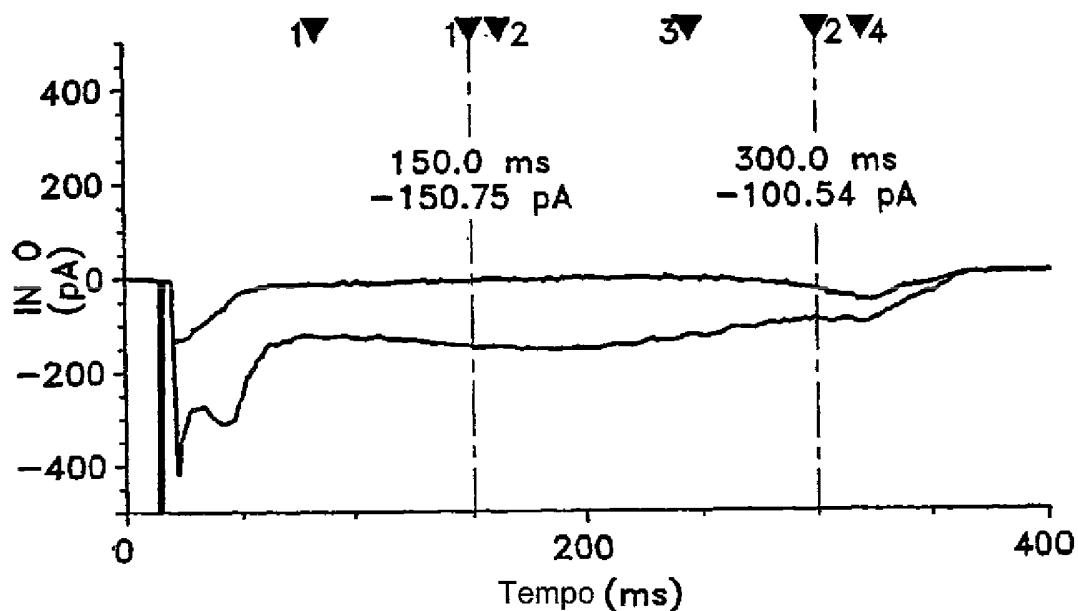
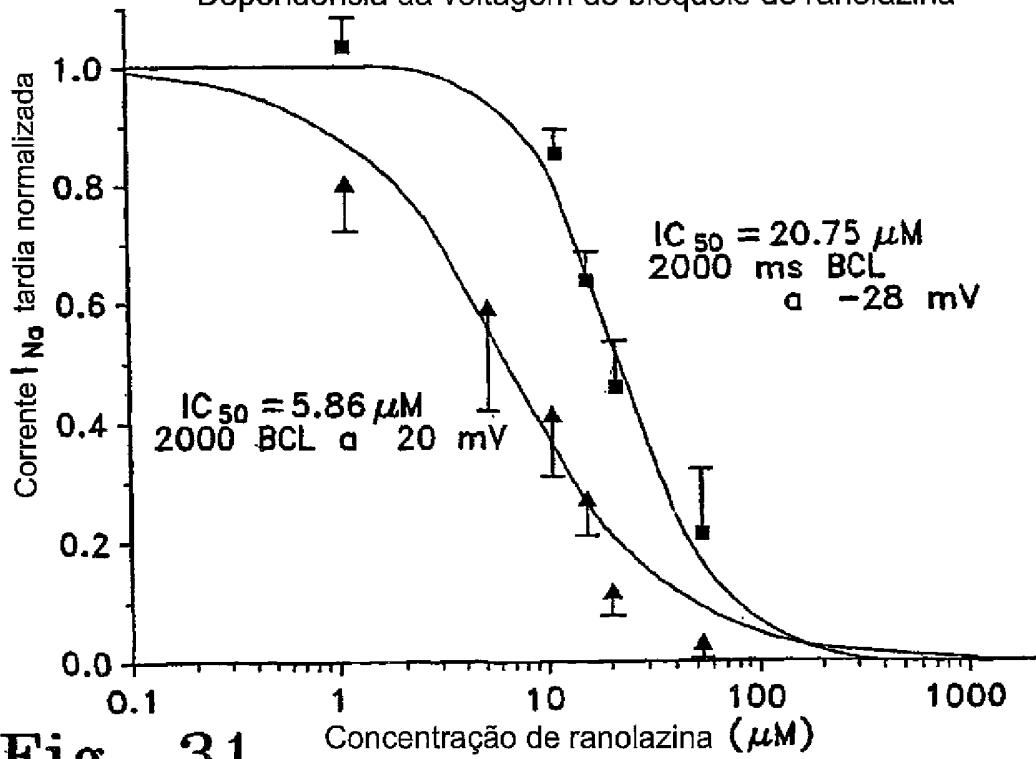


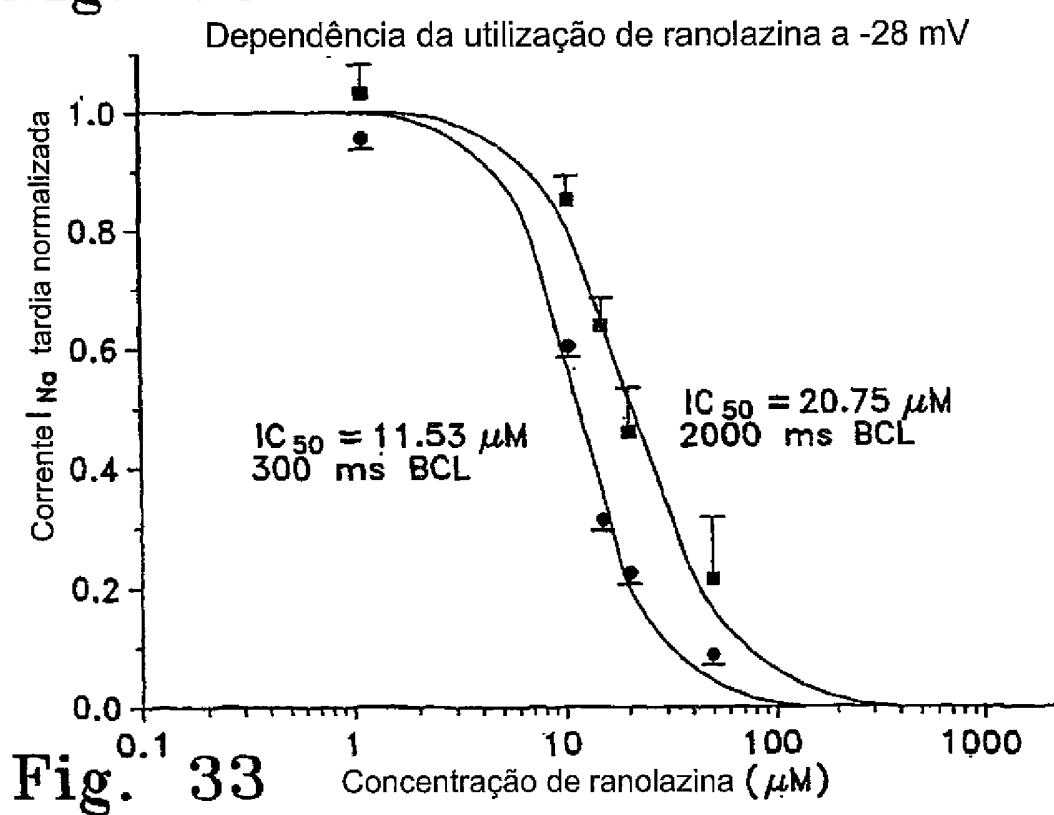
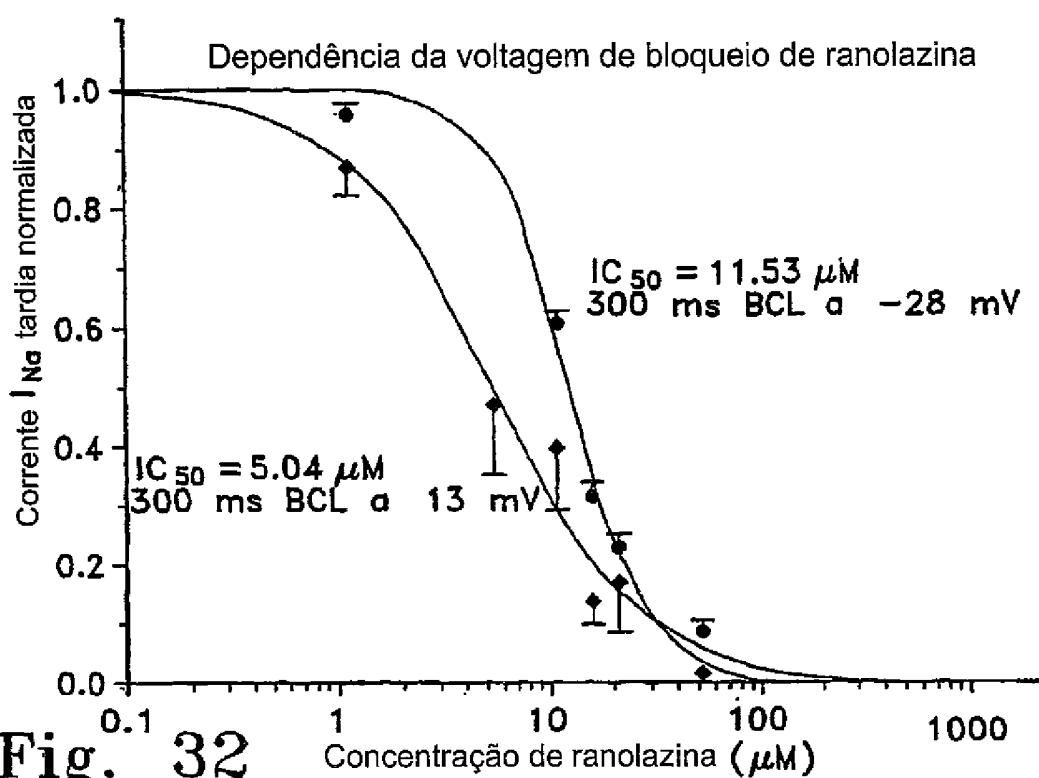
Fig. 28

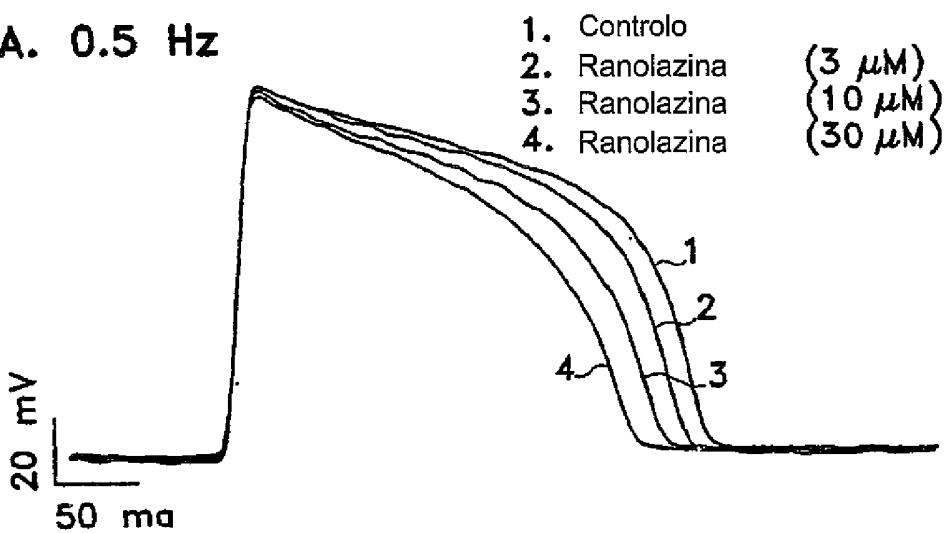
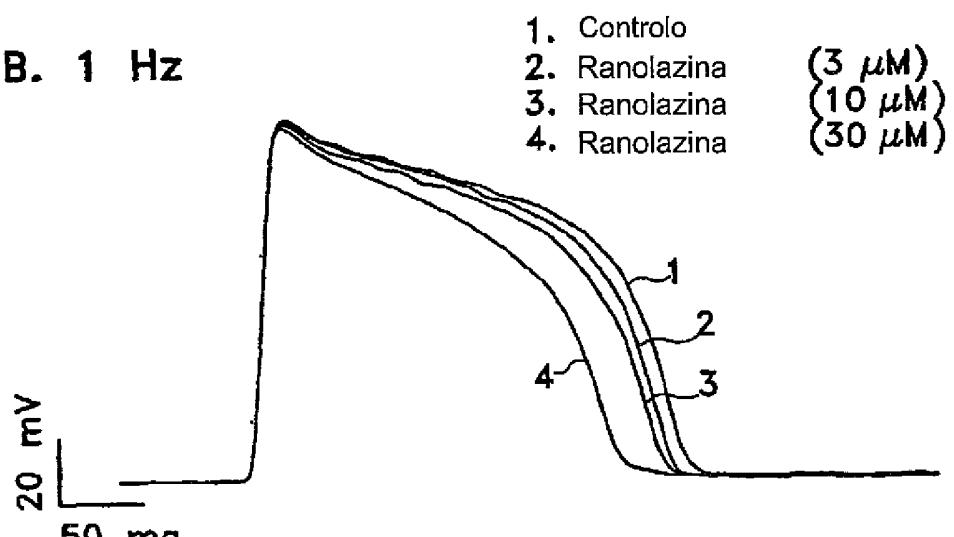
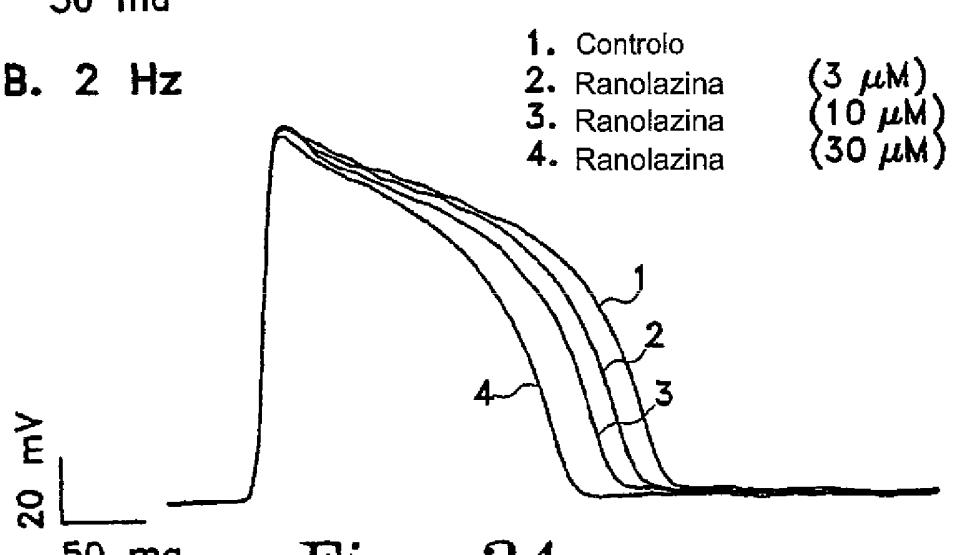
Fig. 29

**Fig. 30**

Dependência da voltagem de bloqueio de ranolazina

**Fig. 31**



A. 0.5 Hz**B. 1 Hz****B. 2 Hz****Fig. 34**

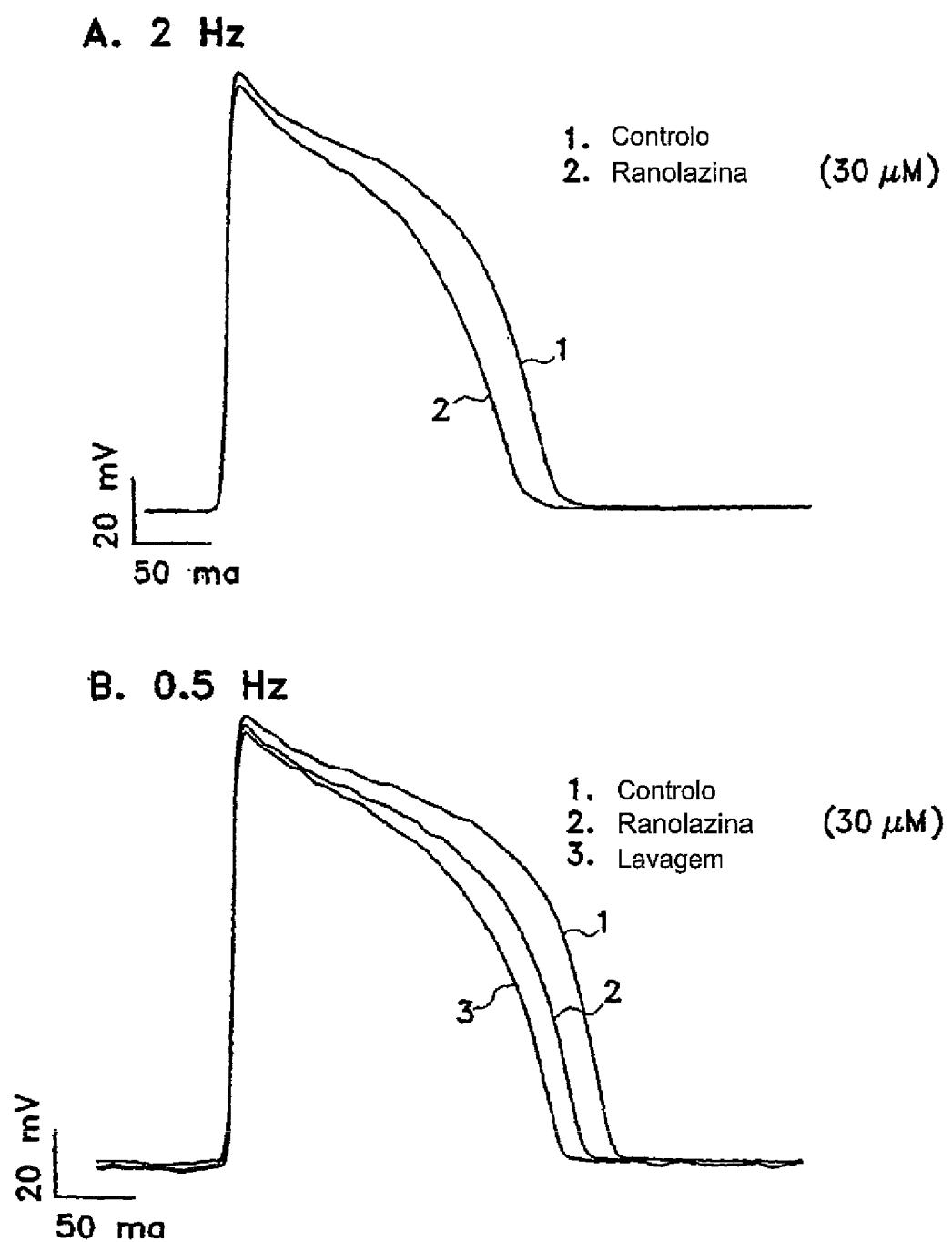
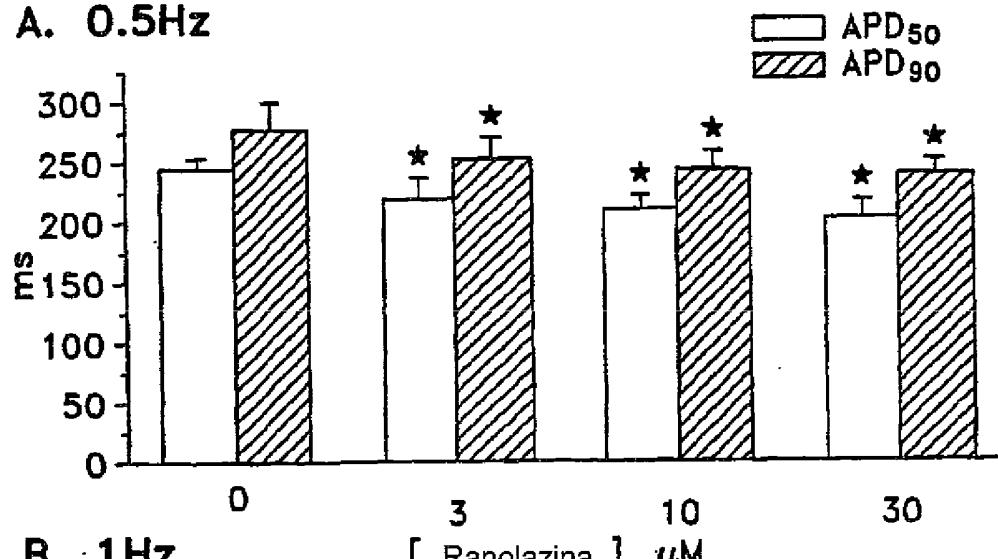
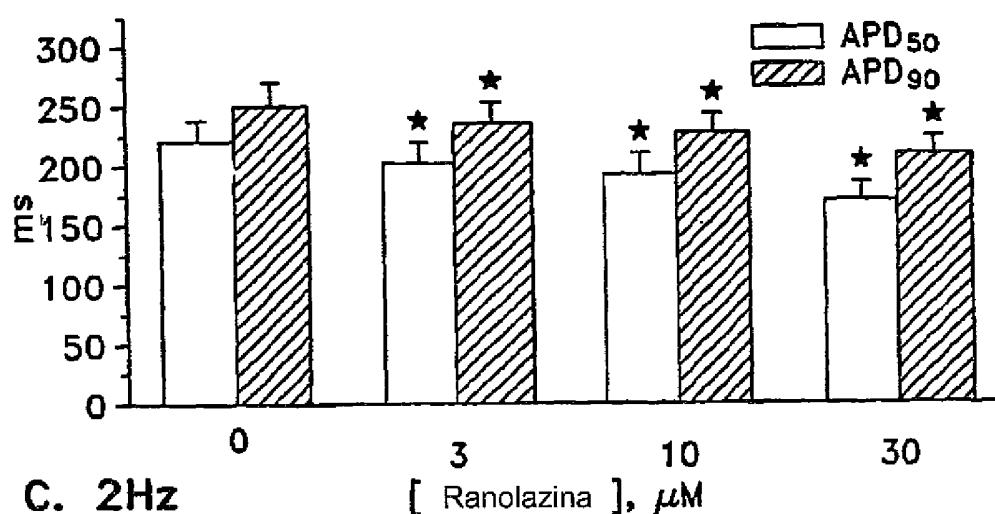
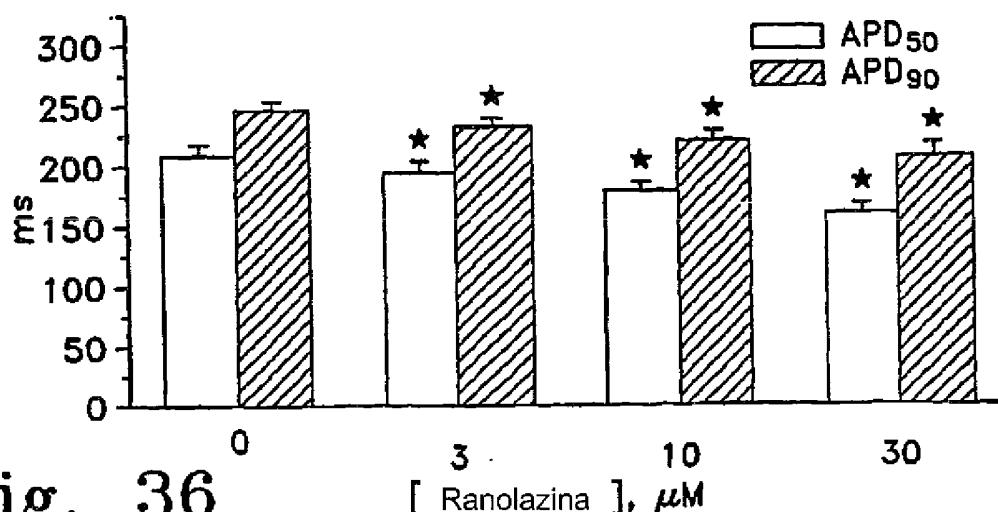
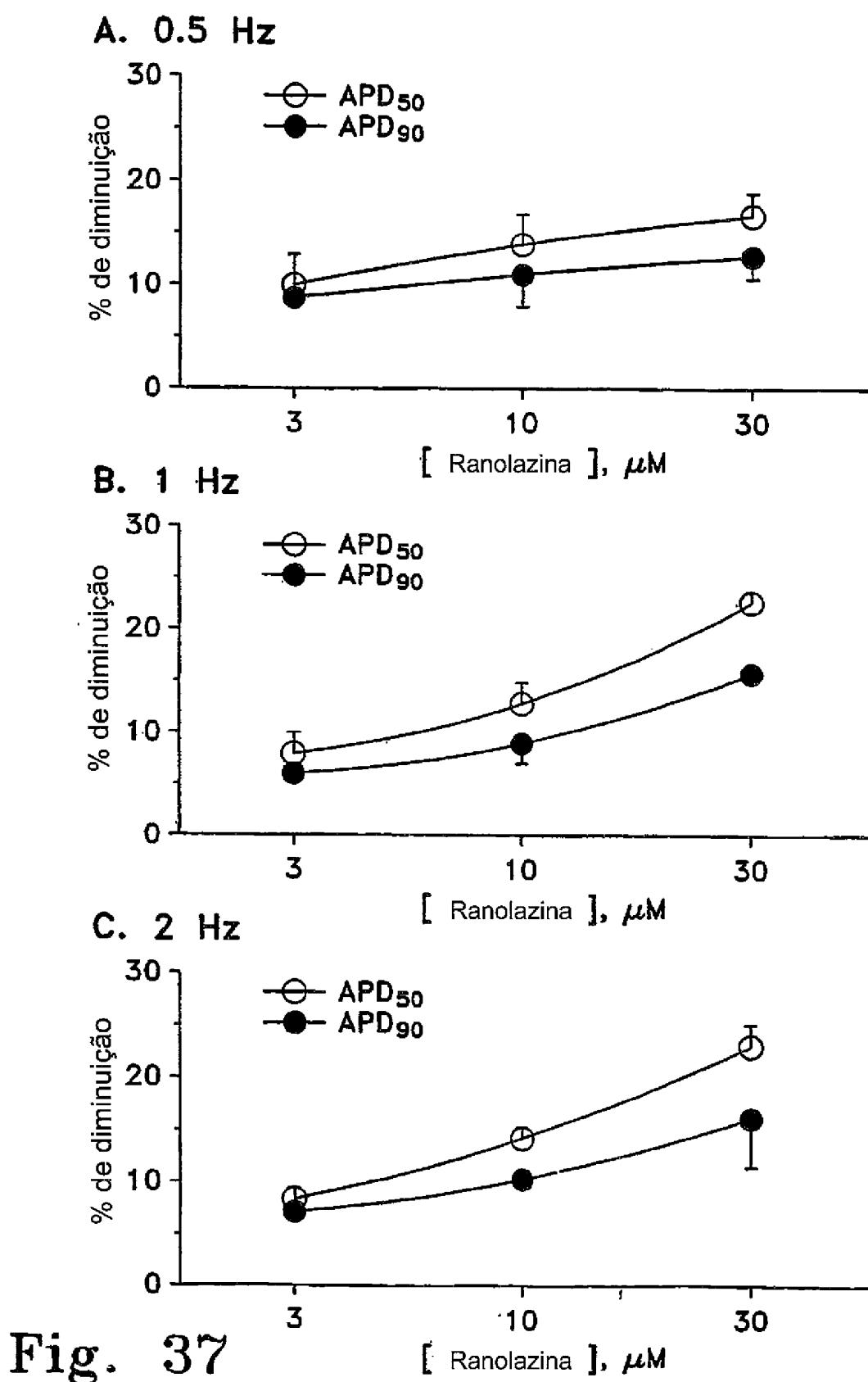


Fig. 35

A. 0.5Hz**B. 1Hz****C. 2Hz****Fig. 36**



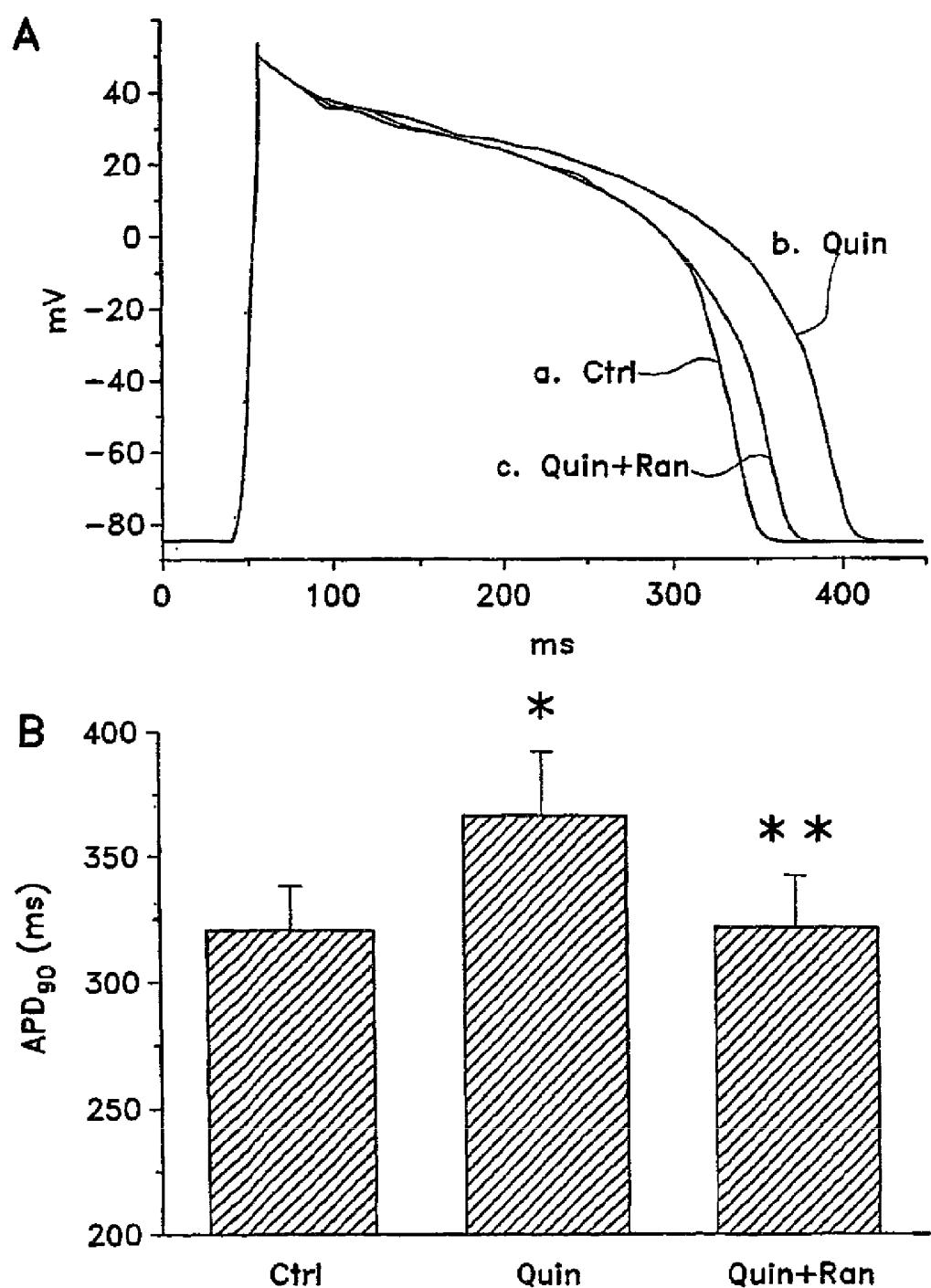


Fig. 38

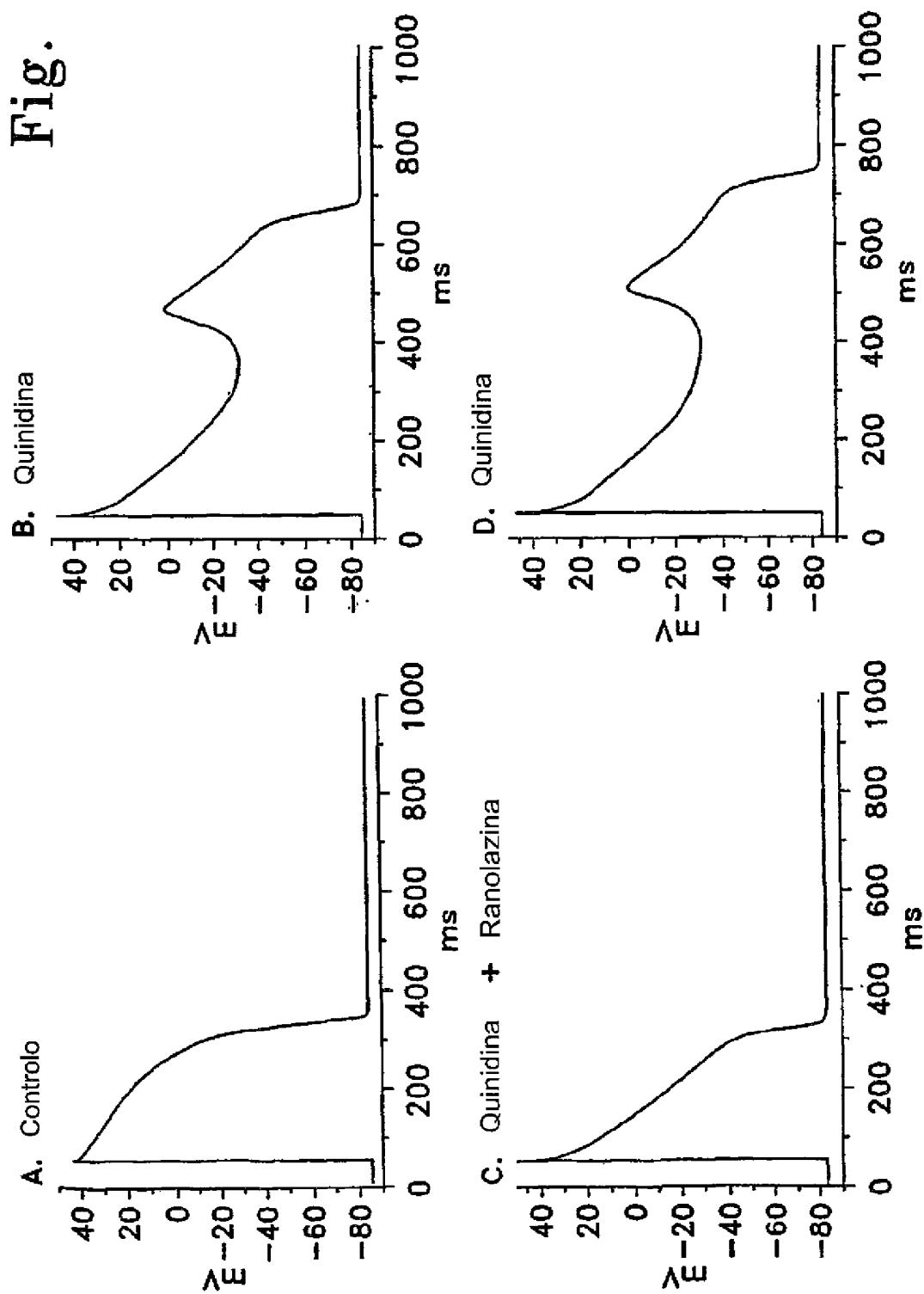
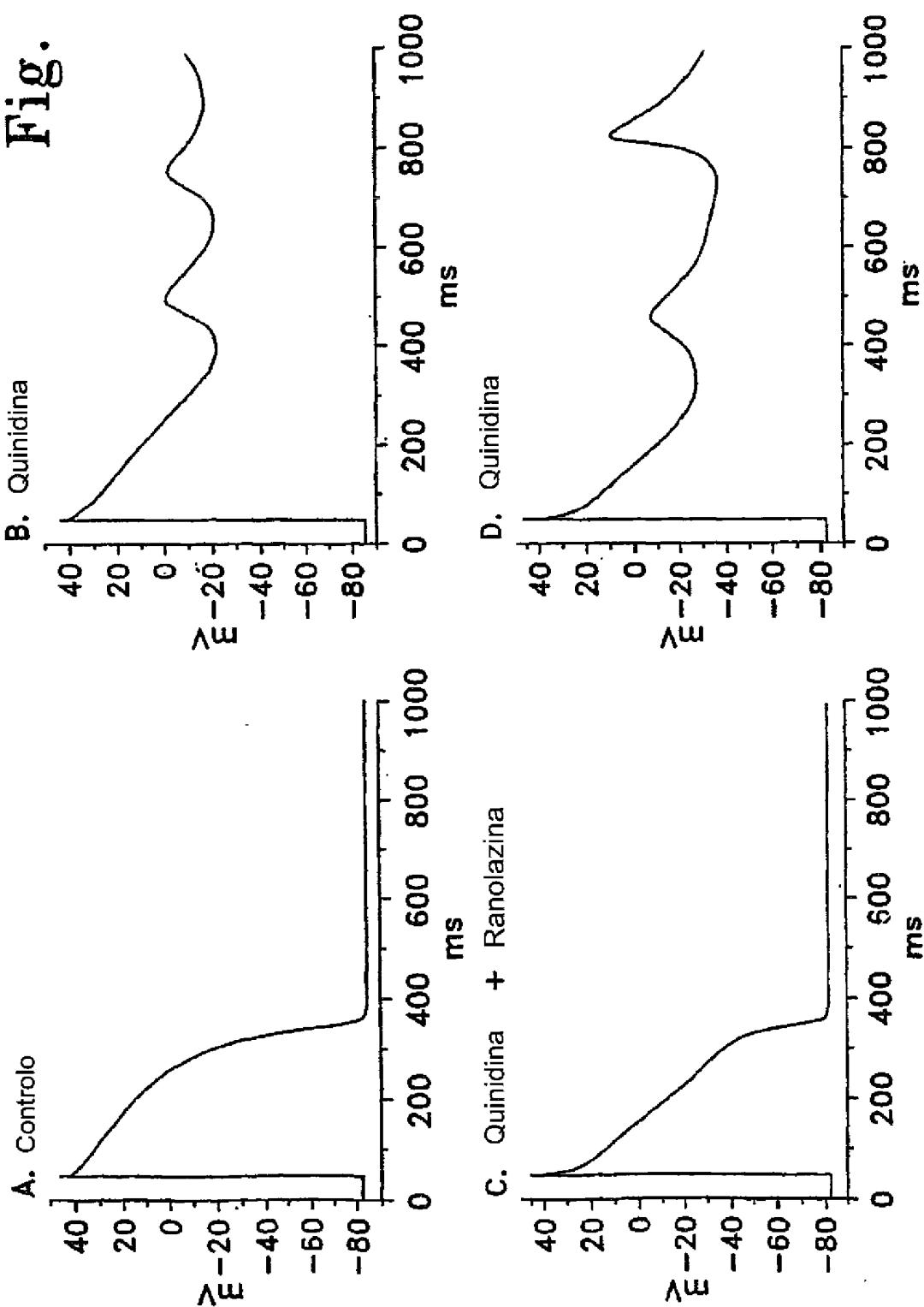
Fig. 39

Fig. 40



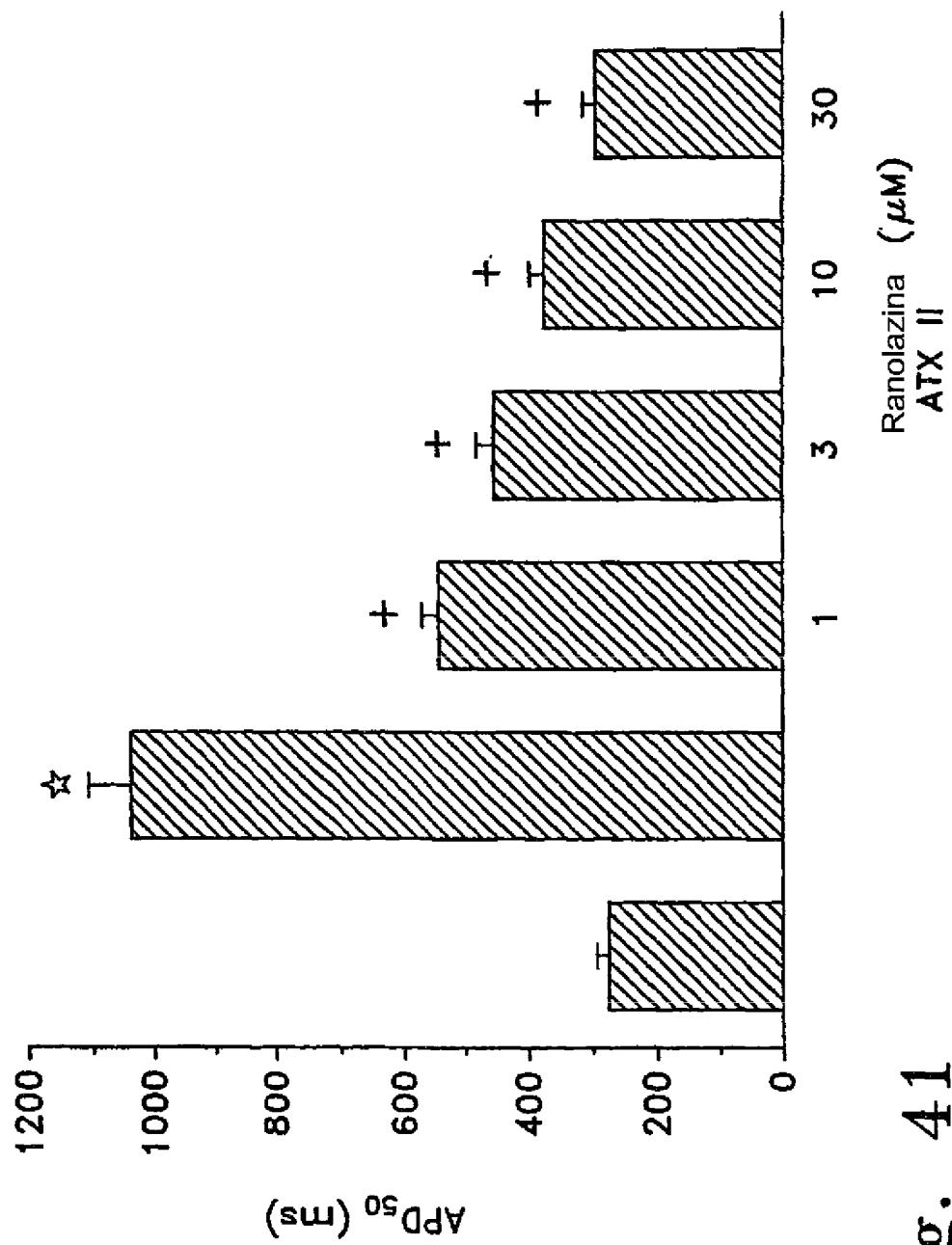
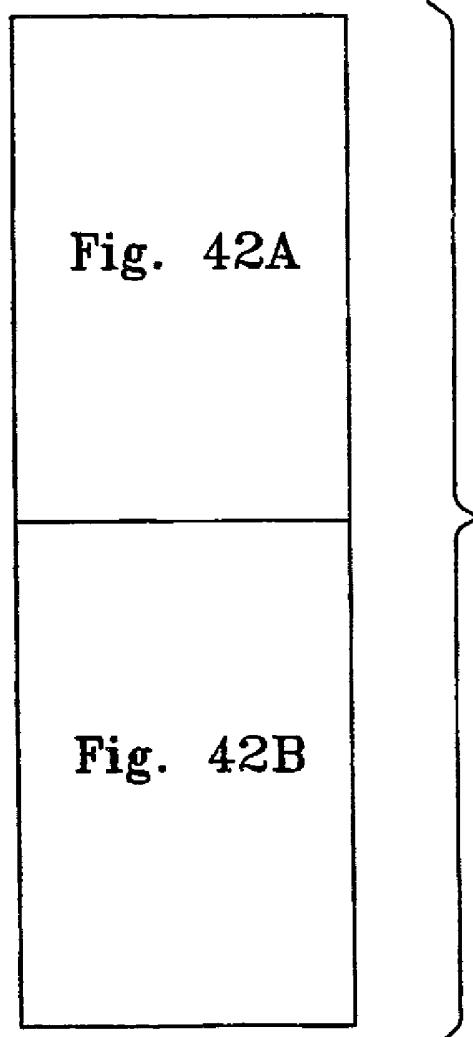


Fig. 41



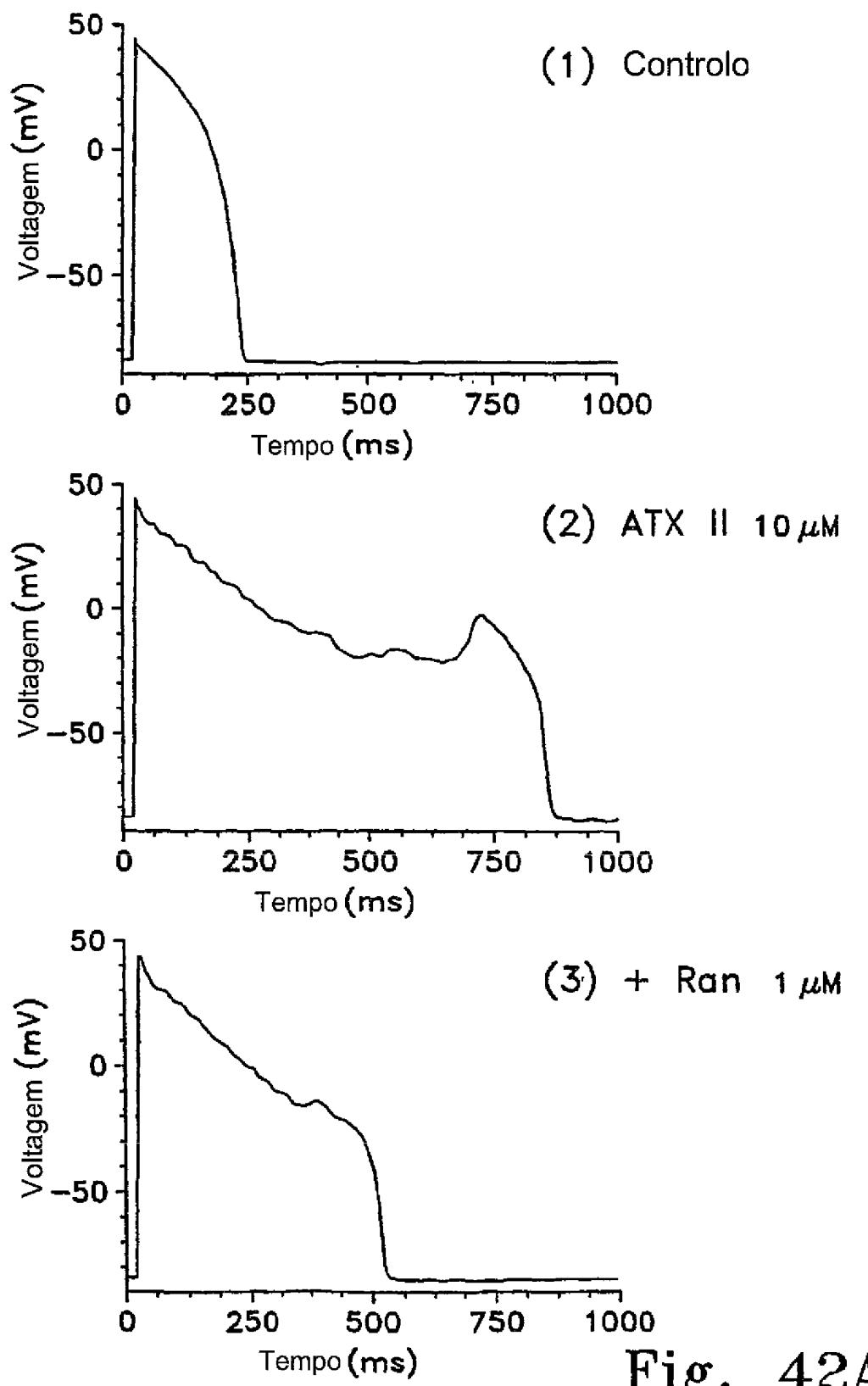


Fig. 42A

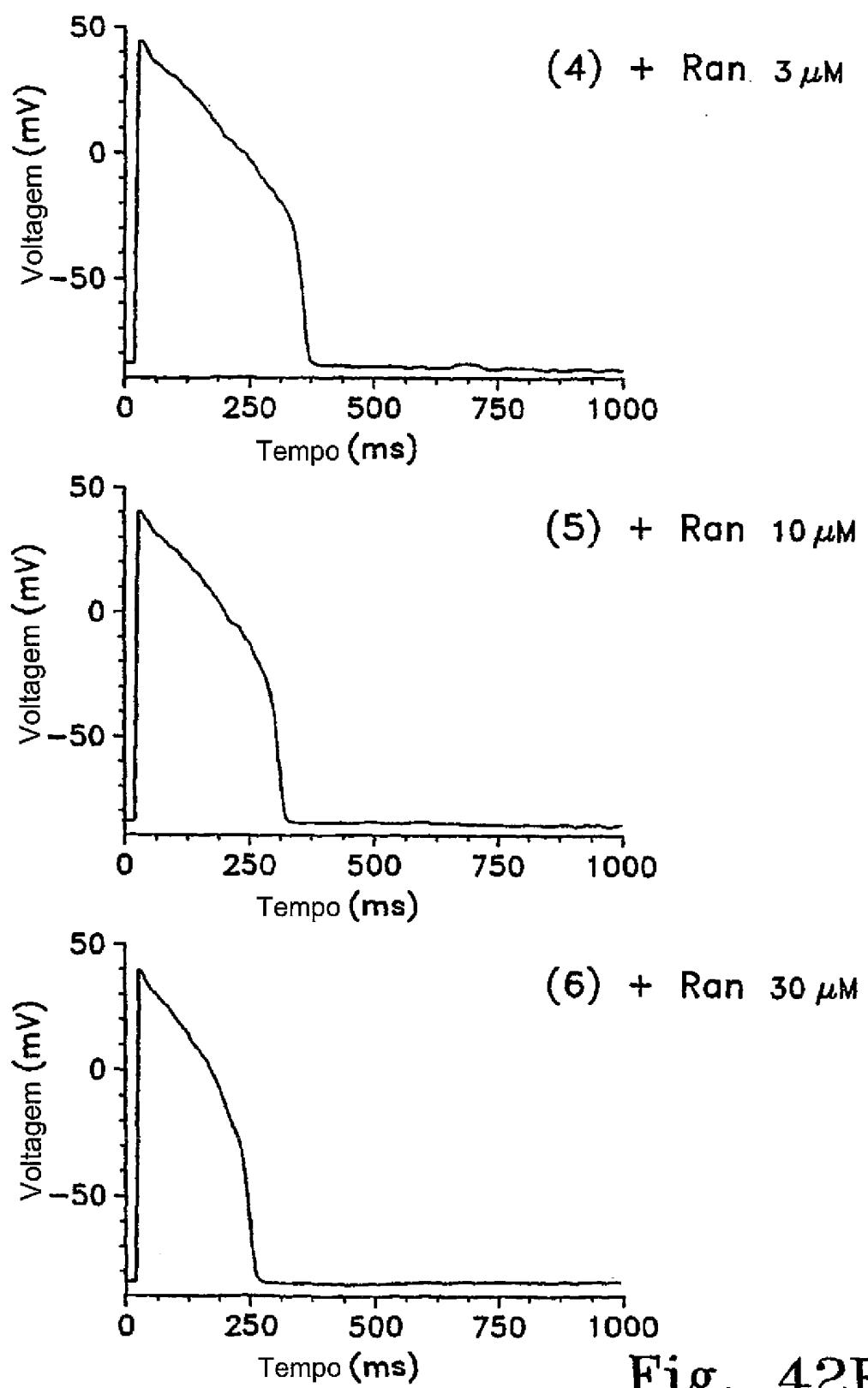
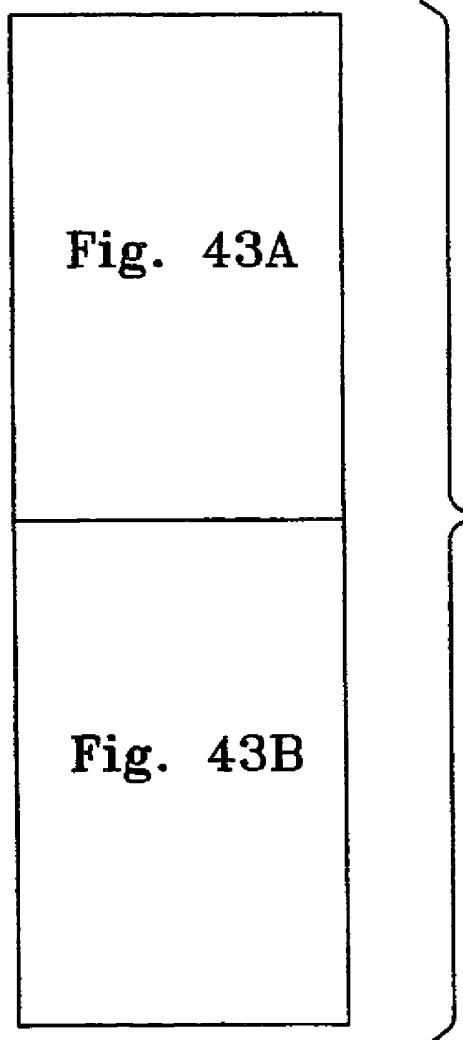


Fig. 42B



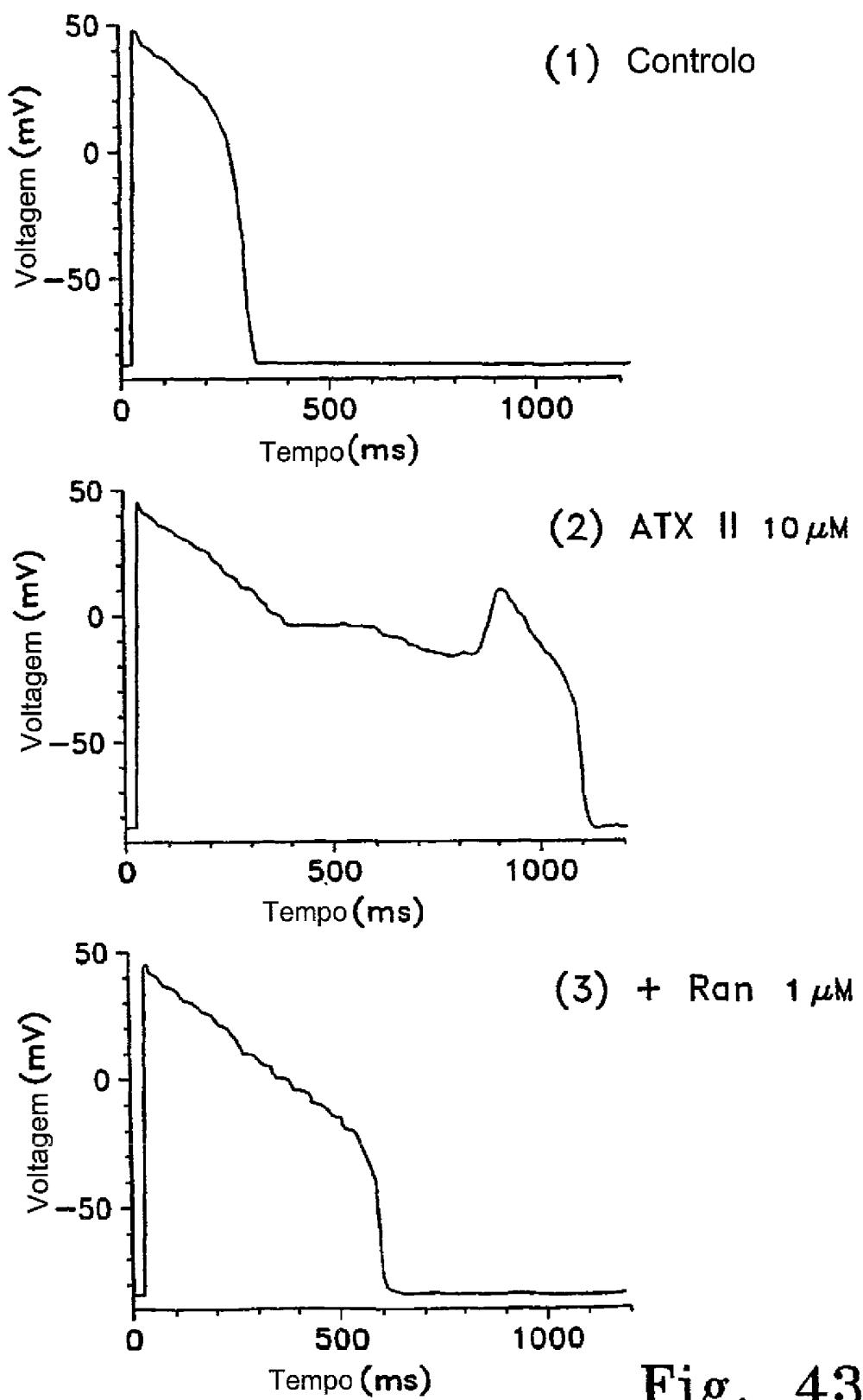


Fig. 43A

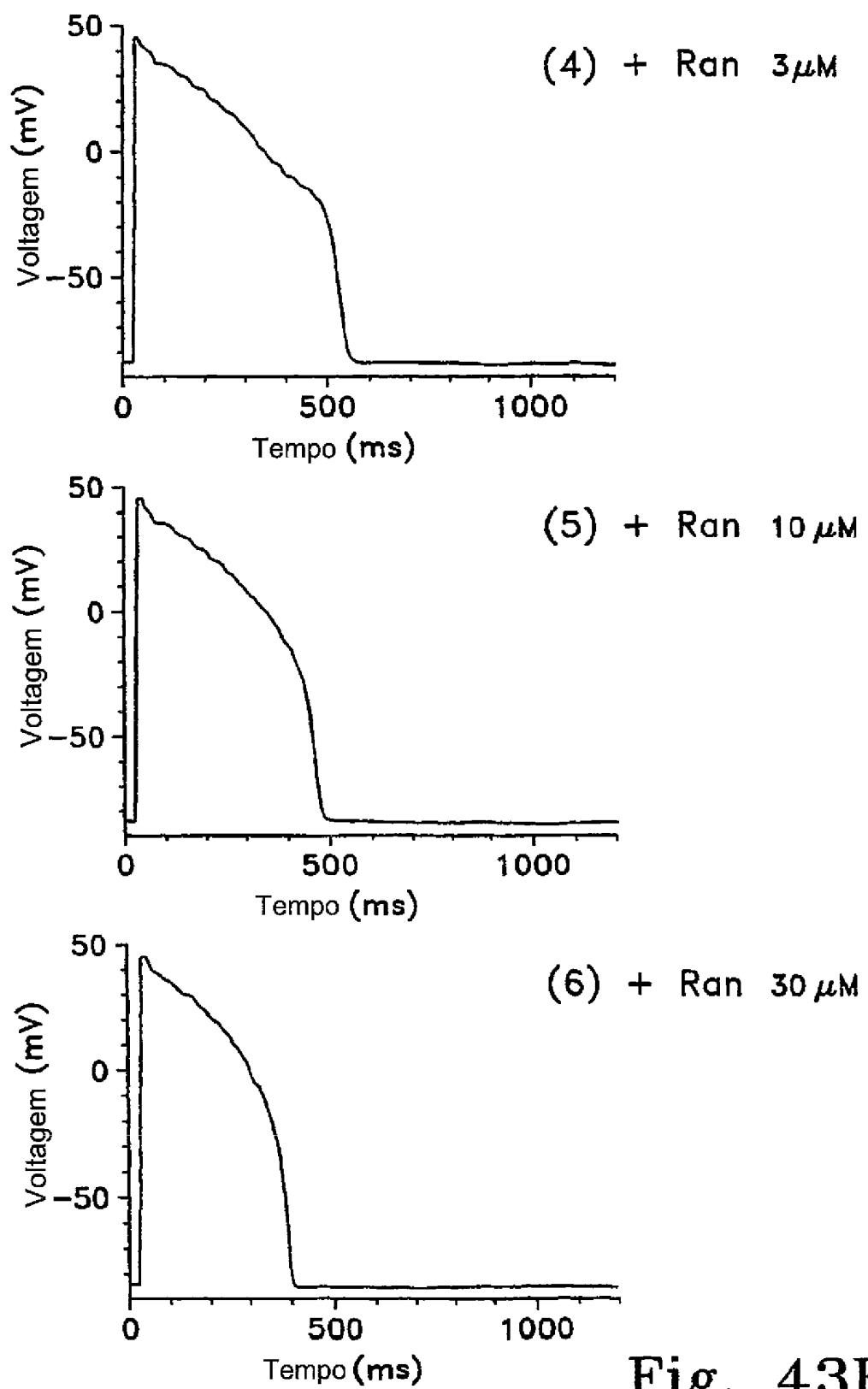
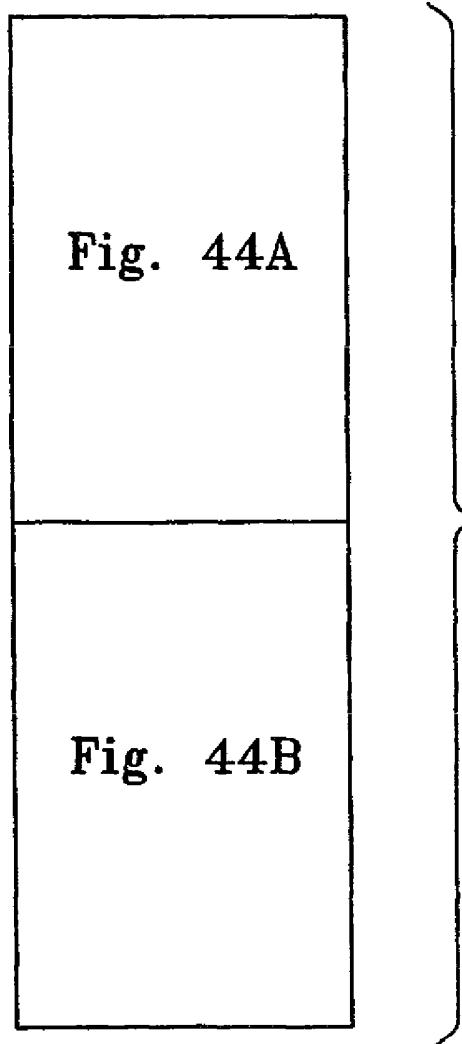


Fig. 43B



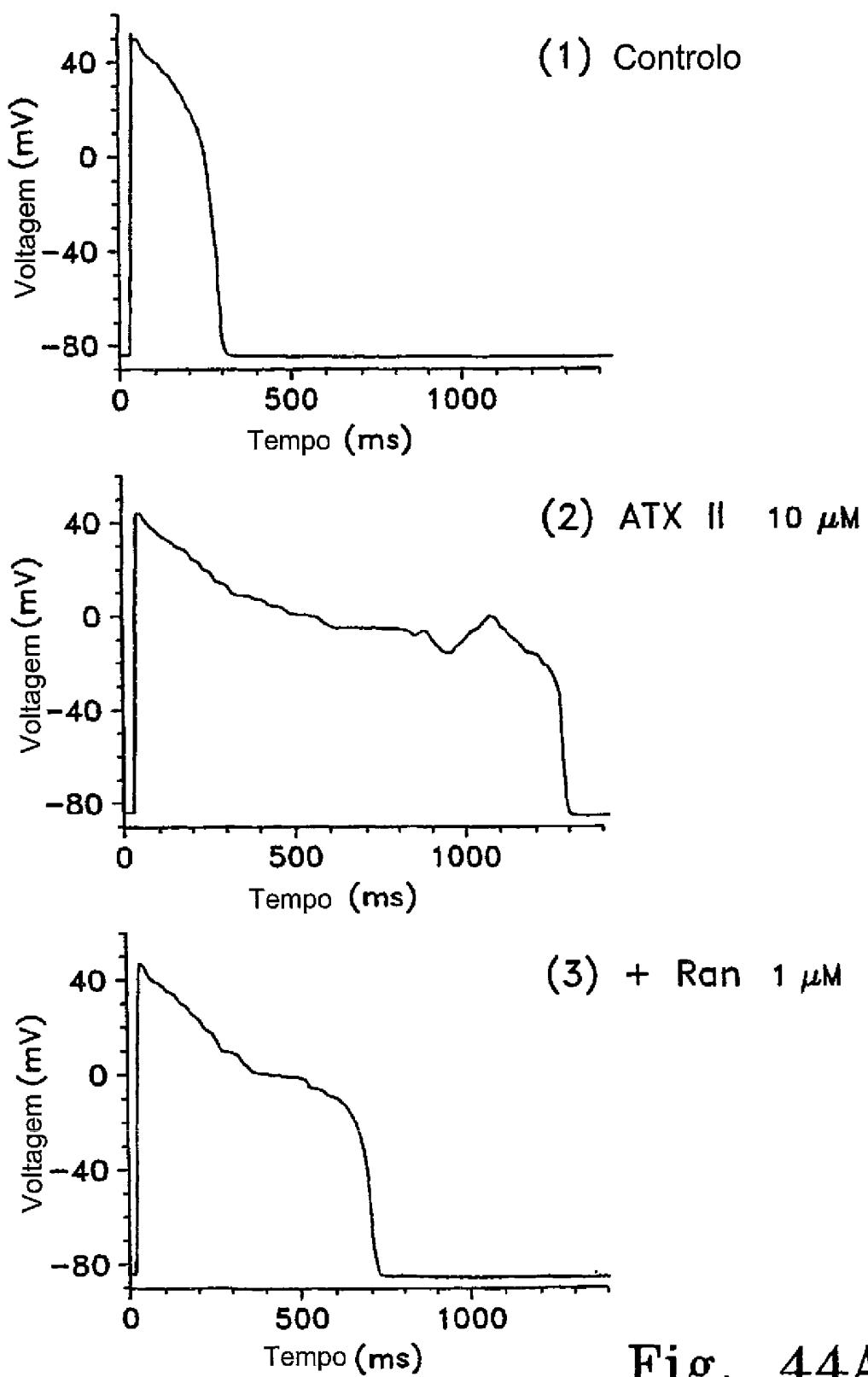


Fig. 44A

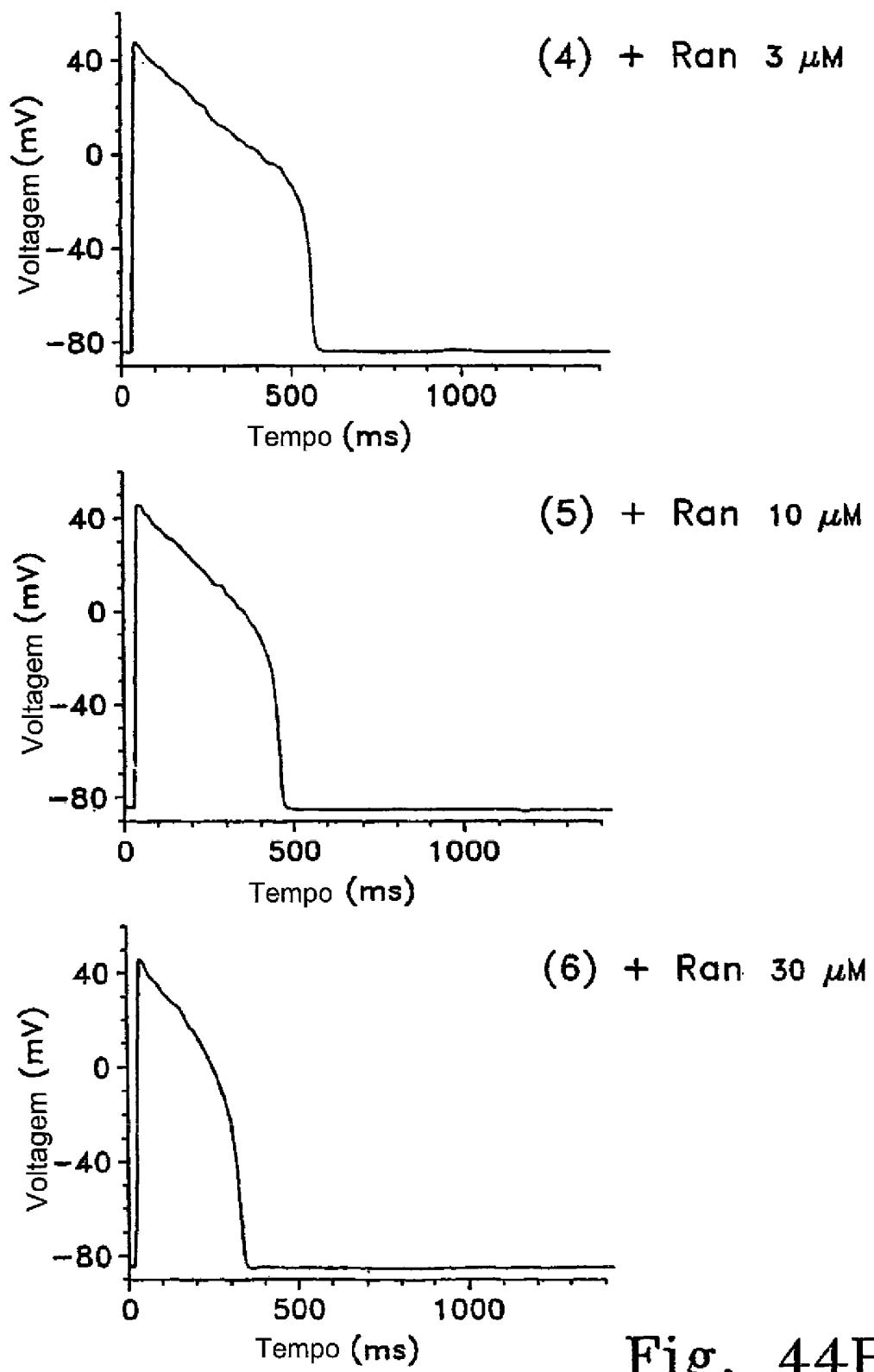
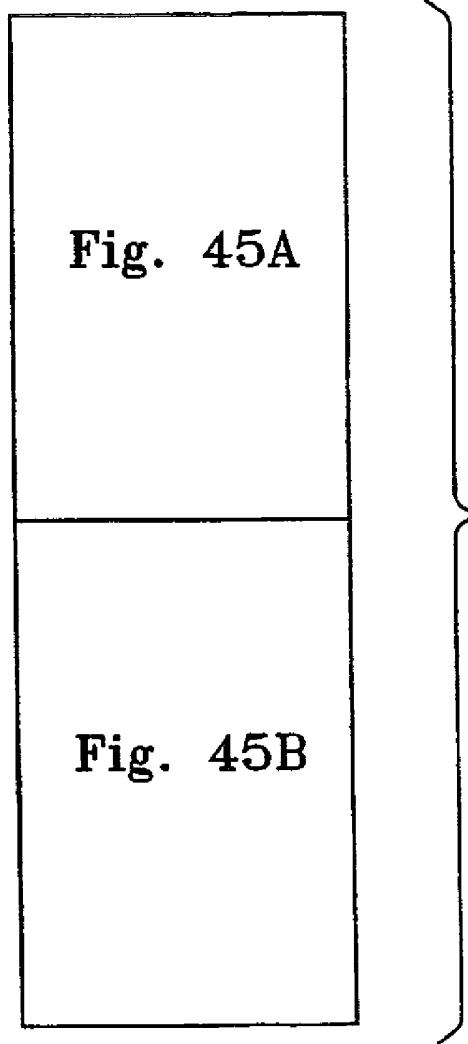
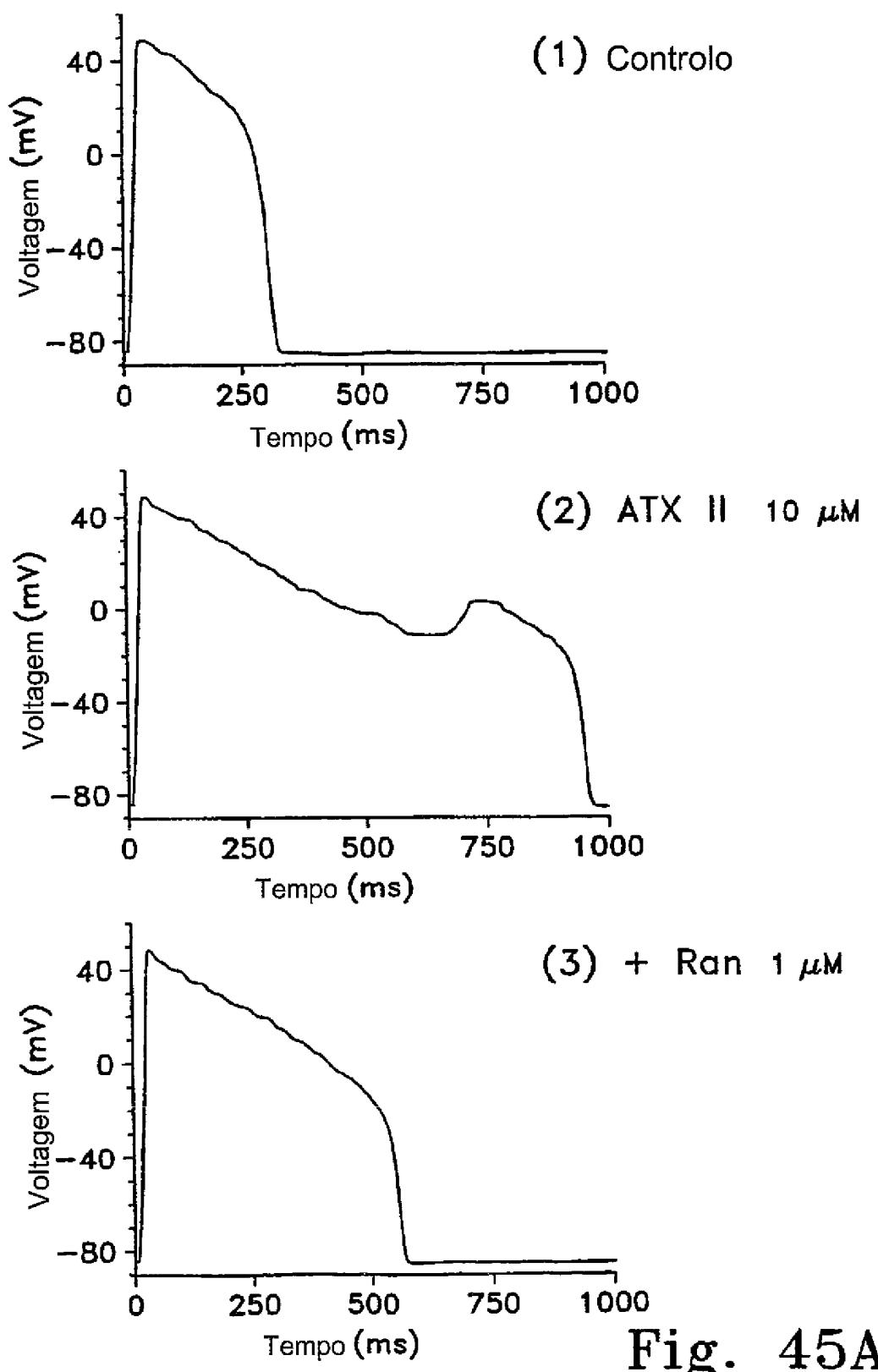


Fig. 44B





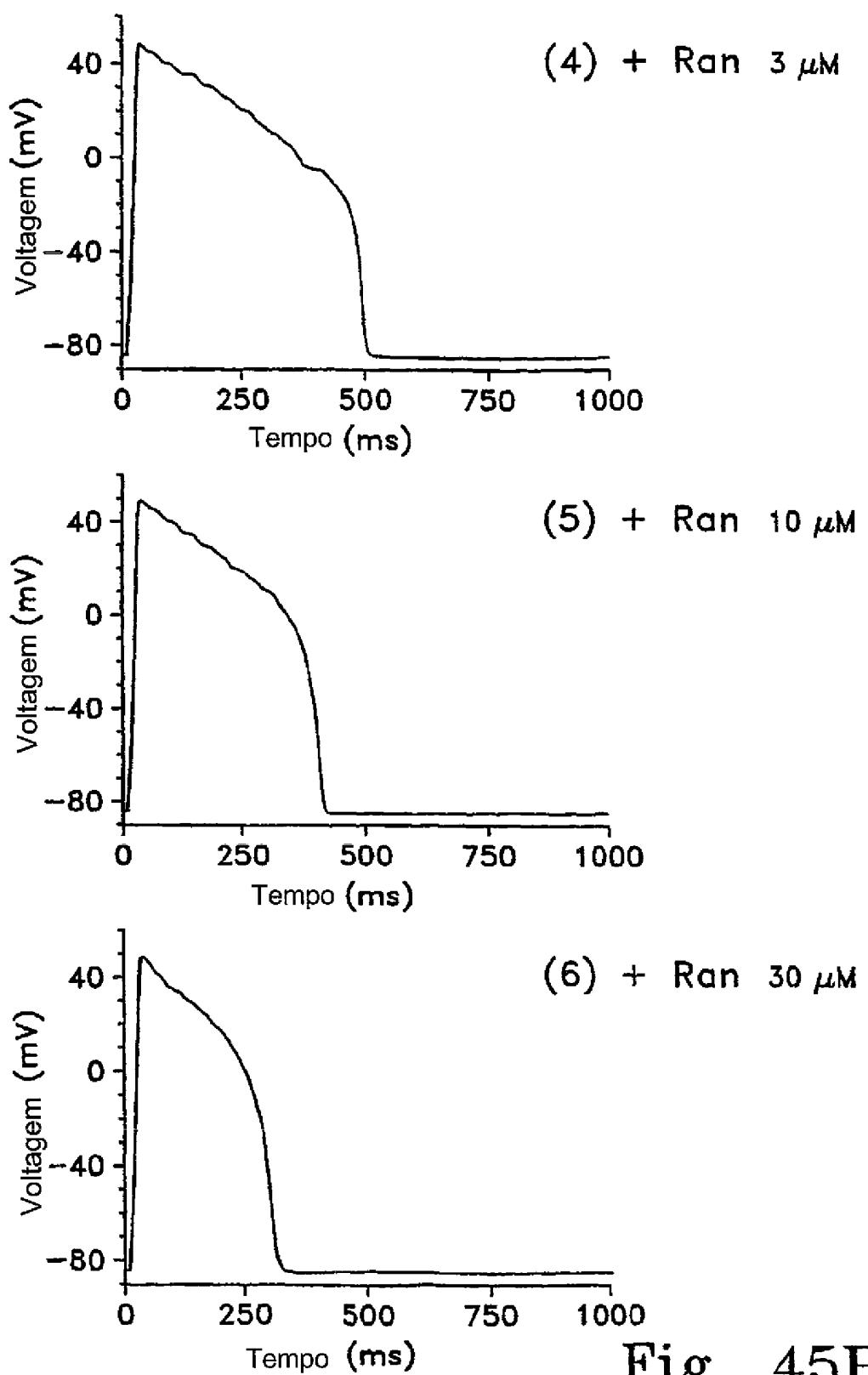
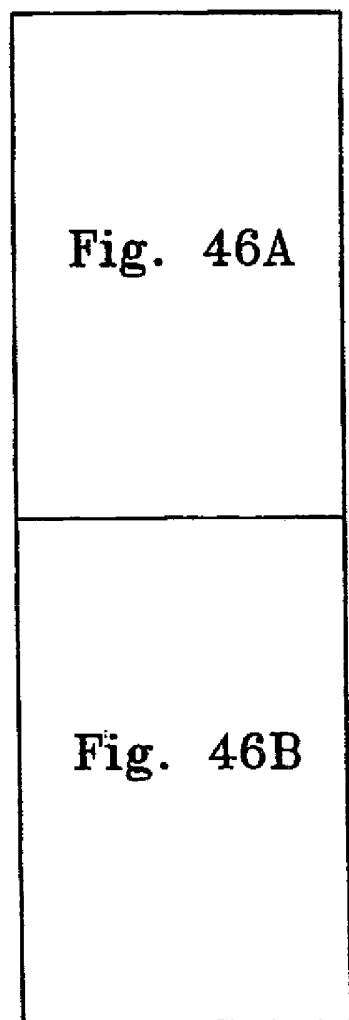


Fig. 45B



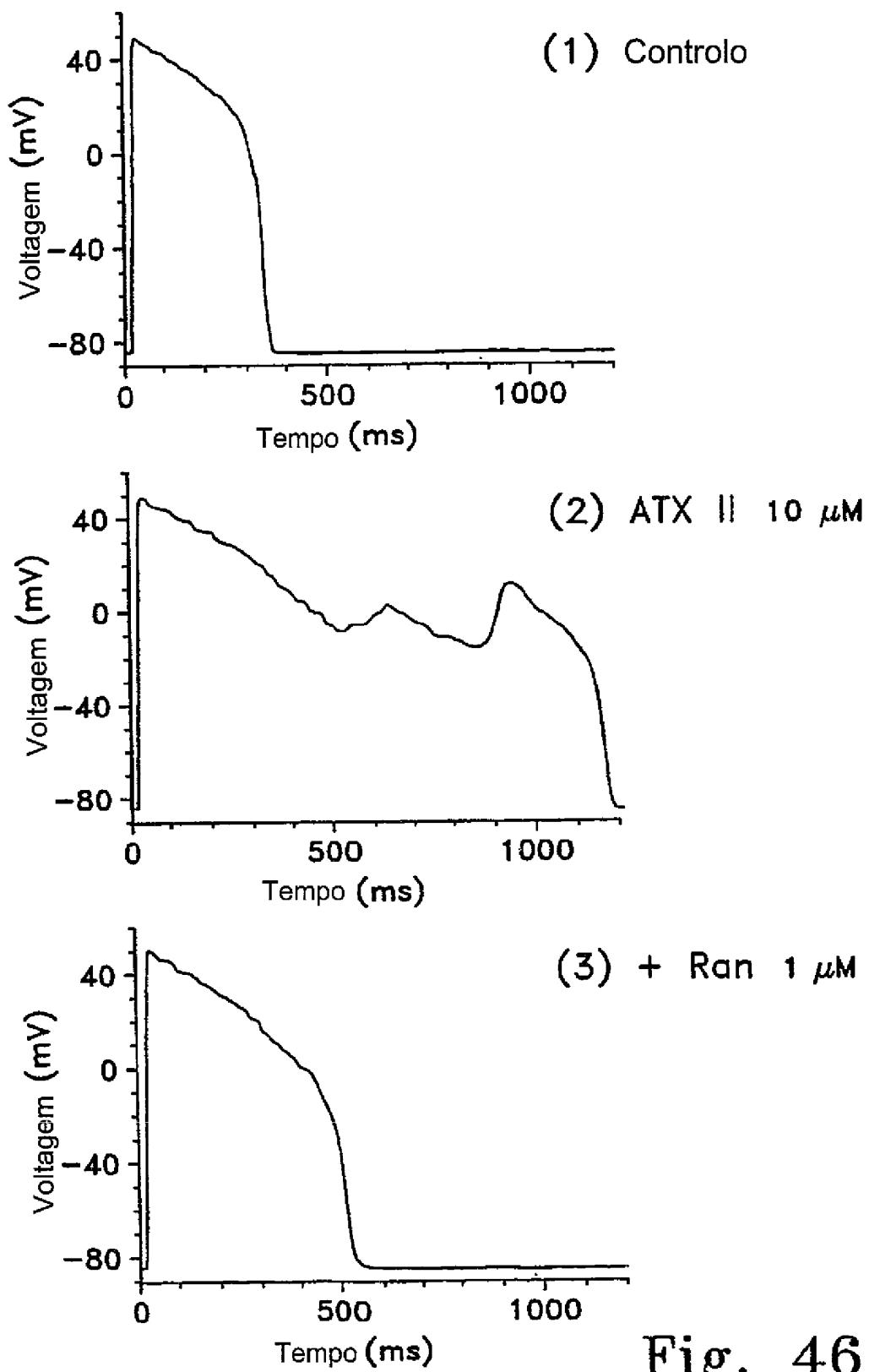


Fig. 46A

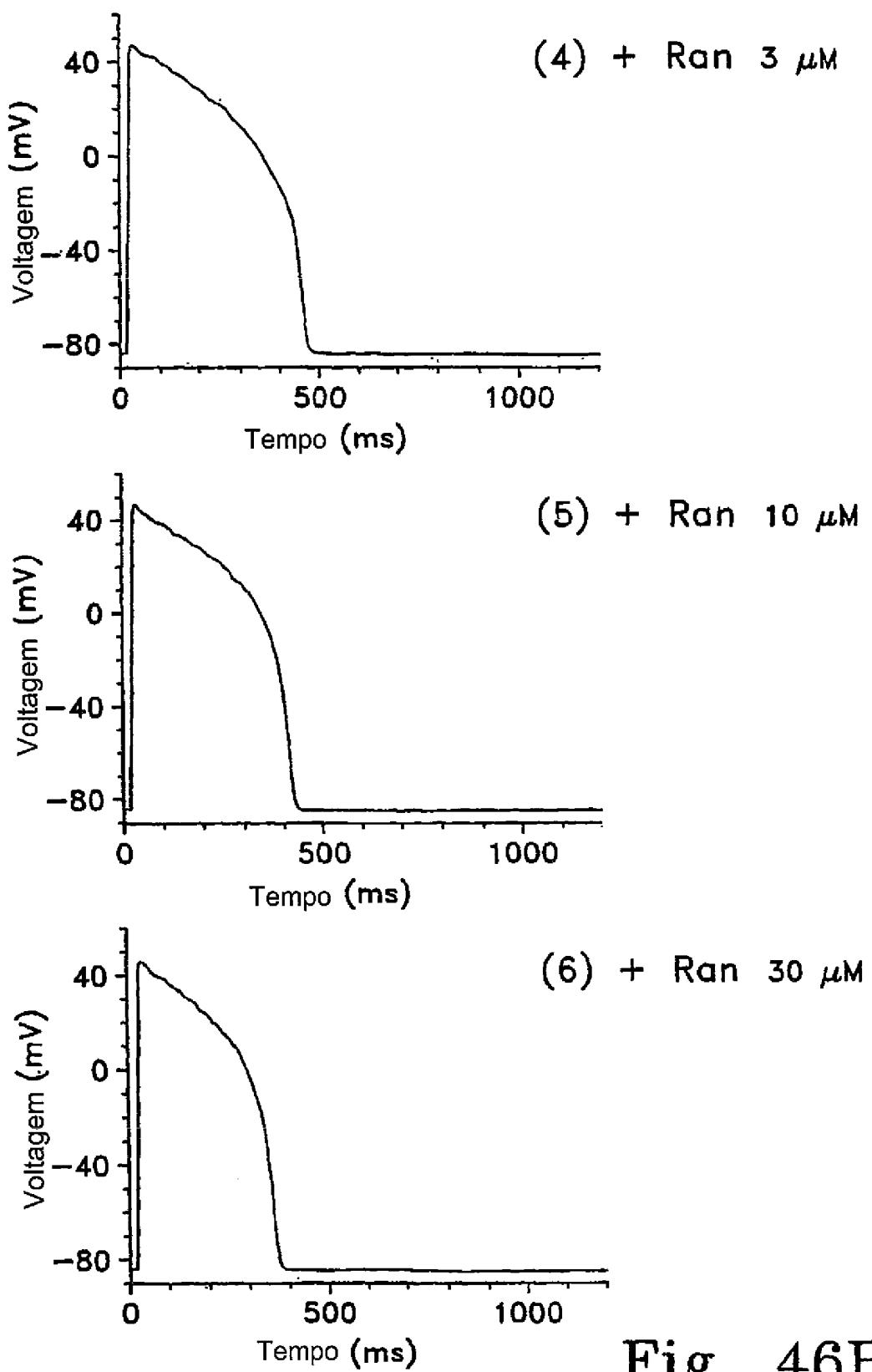


Fig. 46B

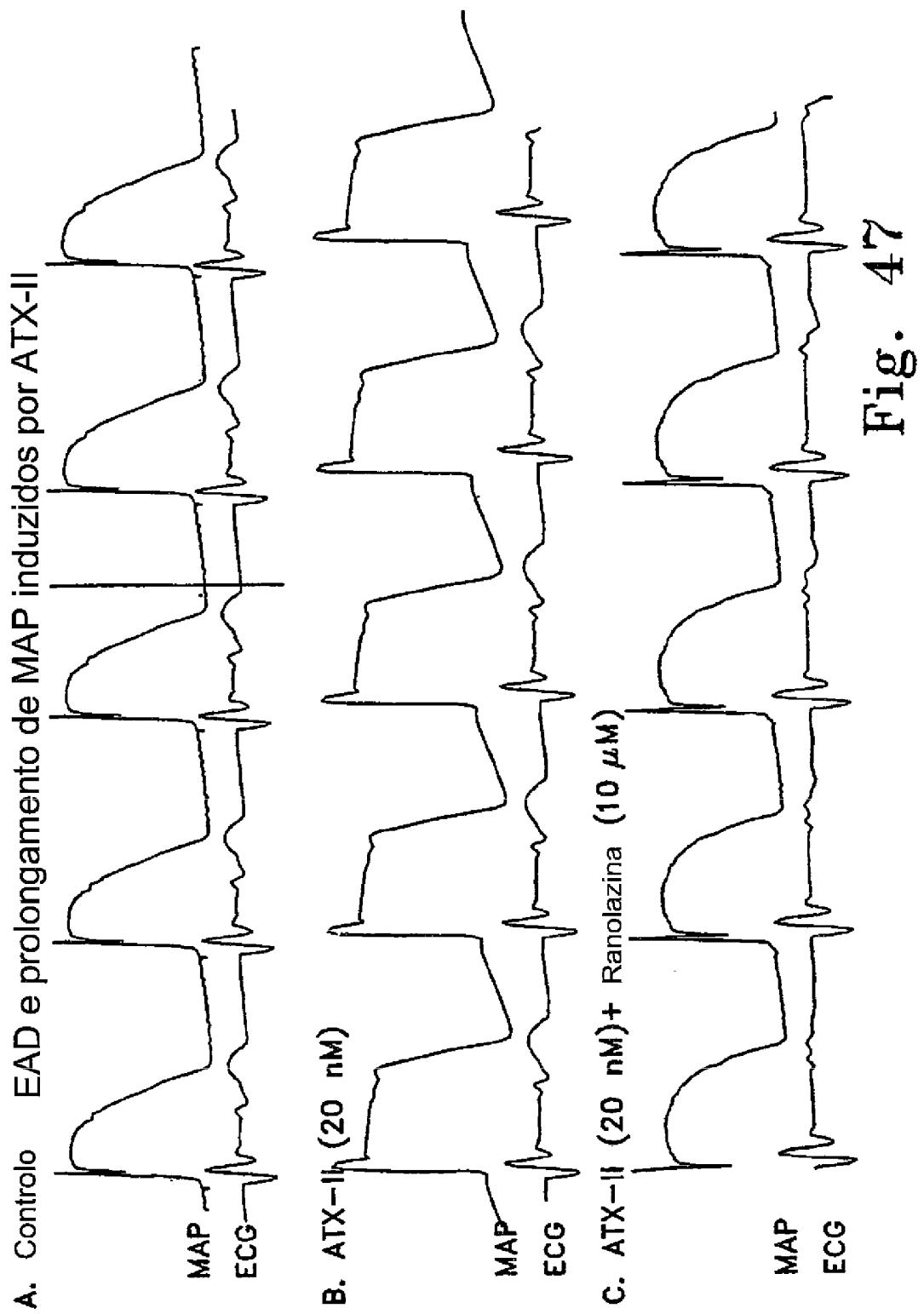


Fig. 47

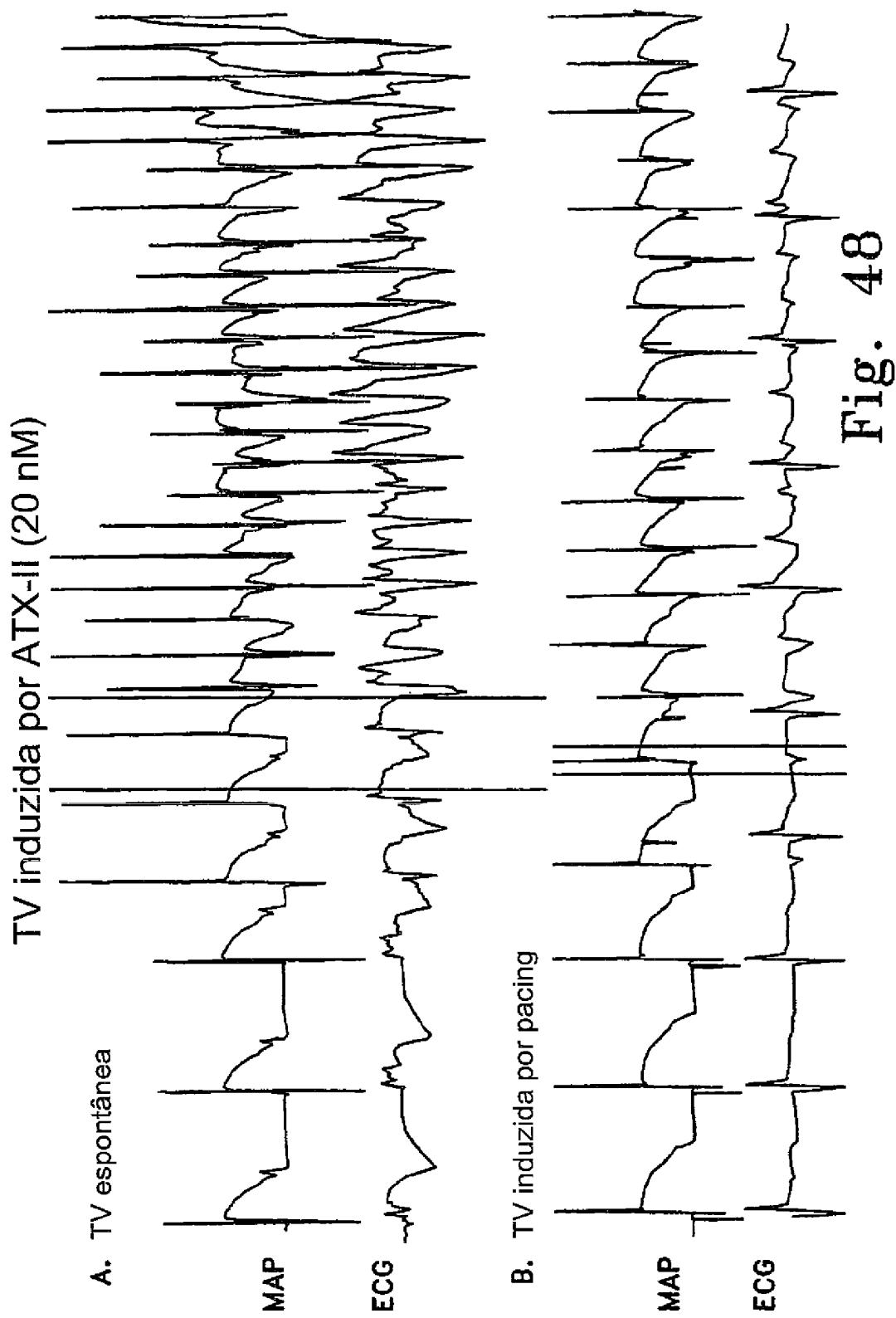


Fig. 48

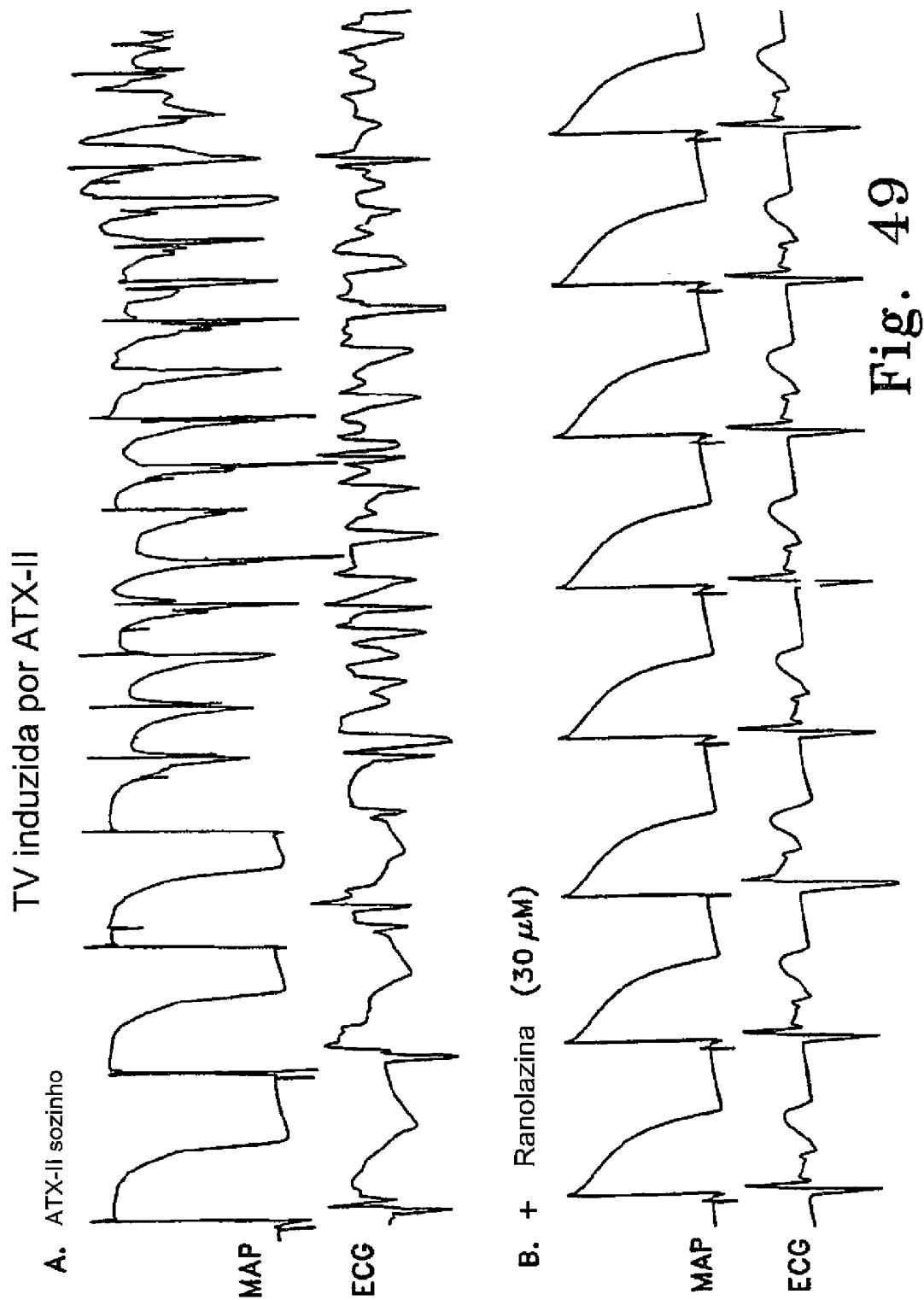


Fig. 4.9

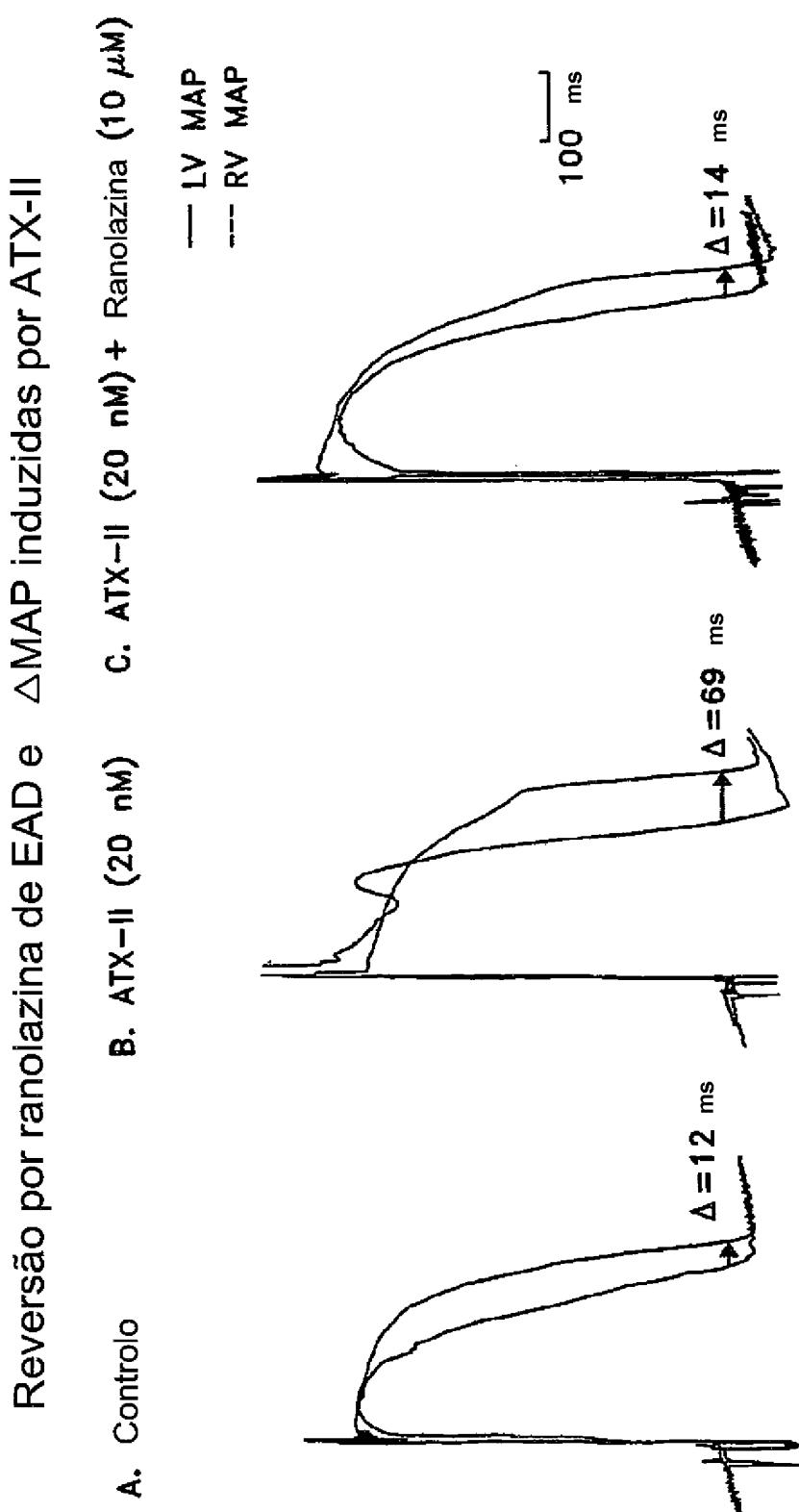


Fig. 50