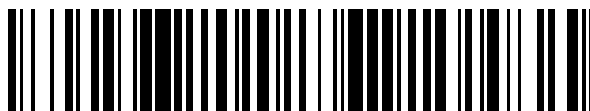


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 418**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4709 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2002 E 02796079 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 1461039**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden cilostazol y un inhibidor de la recaptación de adenosina**

30 Prioridad:

27.12.2001 US 342367 P

23.09.2002 US 412546 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.12.2014

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
2-9, Kanda-Tsukasacho Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**LIU, YONGGE;
SUN, BING;
YOSHITAKE, MASUHIRO y
KAMBAYASHI, JUN-ICHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 525 418 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden cilostazol y un inhibidor de la recaptación de adenosina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden cilostazol, que es un inhibidor multifuncional de la fosfodiesterasa (IMFDE) y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina. Un IMFDE es un agente que, como mínimo, inhibe tanto la fosfodiesterasa tipo III (FDE3) como la recaptación de adenosina (por ejemplo, cilostazol). La invención también se refiere al uso de las composiciones para el tratamiento de varios síntomas y enfermedades incluyendo isquemia de las extremidades y claudicación intermitente (CI) asociada con la enfermedad arterial oclusiva periférica (EAOP), para la prevención y tratamiento del ictus y para la prevención de la trombosis coronaria y la reestenosis. La invención proporciona el uso de las composiciones para lograr una mayor potencia terapéutica y la eficacia con menos efectos secundarios que los que pueden producirse utilizando cualquier IMFDE, inhibidores de FDE3 tradicionales o inhibidores de la recaptación de adenosina por sí solos. La capacidad de las composiciones para mejorar los efectos antiplaquetarios y vasodilatadores y para eludir los posibles efectos secundarios cardiotónicos de los IMFDE o de los inhibidores FDE3, ofrece la posibilidad de ampliar la indicación aprobada y el uso de cilostazol para los pacientes que presentan CI, ictus o enfermedad coronaria e insuficiencia cardíaca congestiva (ICC).

20 **Antecedentes**

La EAOP afecta hasta un 5 % de los pacientes de edad avanzada en los Estados Unidos (EE.UU.) y los pacientes con EAOP tienen un riesgo seis veces mayor de muerte por causas cardíacas y cerebrovasculares. La CI es un síntoma con frecuencia incapacitante de la EAOP. Los pacientes suelen describir molestias, caracterizadas de forma variable por dolor o sensación de fatiga en la pierna afectada al caminar. Sólo hay dos medicamentos aprobados en los EE.UU. para el tratamiento de la CI. La pentoxifilina está disponible desde hace dos décadas, aunque sólo es parcialmente eficaz. El cilostazol (Pletal® (6-[4-(1-ciclohexil-1*H*-tetrazol-5-il)butoxi]-3,4-dihidro-2(1*H*)-quinolinona) fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Fármacos (FDA) en 1999 para el tratamiento de la IC. En ensayos controlados con placebo, cilostazol mejoró significativamente la distancia máxima recorrida en una cinta en comparación con el placebo y la pentoxifilina.

El cilostazol se conoce desde hace mucho tiempo como un inhibidor nucleótido cíclico de la FDE3. Los nucleótidos cíclicos, tales como el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), desempeñan un papel importante en la mediación de muchas respuestas celulares dentro del sistema cardiovascular. Los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos son controlados por las actividades equilibradas de dos familias de enzimas. La adenilato ciclasa y la guanilato ciclasa regulan la síntesis *de novo* del AMPc y del GMPc, respectivamente. Por el contrario, once isoformas genéticamente distintas de la FDE, que difieren en sus perfiles bioquímicos y farmacológicos, regulan la degradación de AMPc y/o GMPc. La isoforma de la FDE3 actúa específicamente sobre el AMPc y causa agotamiento del AMPc intracelular. La FDE3 se expresa en diferentes tipos de células incluyendo los cardiomiocitos, las células del músculo liso vascular (CMLV) y las plaquetas. En consecuencia, la FDE3 afecta a la contractilidad cardíaca, al tono y a la proliferación de las CMLV y a la actividad de las plaquetas, respectivamente. La inhibición de la FDE3 provoca una acumulación selectiva de AMPc intracelular y un aumento en los efectos inducidos por la proteína quinasa A (PKA). Por lo tanto, la disminución de la actividad de la FDE3 en las células anteriores provoca un aumento de la contractilidad cardíaca, vasodilatación, disminución de la proliferación celular y reducción de la agregación plaquetaria. Los efectos beneficiosos de cilostazol en pacientes con CI se han atribuido en gran medida a los efectos vasodilatadores y de agregación antiplaquetaria de la inhibición de FDE3, aunque también podrían intervenir otros efectos.

Los inhibidores de la FDE3 generalmente ejercen efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos en el corazón (es decir, aumentan la contractilidad y la frecuencia cardíaca). De hecho, se ha demostrado que los inhibidores de la FDE3 aumentan el gasto cardíaco y reducen la congestión pulmonar en pacientes con ICC. Por ejemplo, la milrinona, un inhibidor de la FDE3 prototípico, está actualmente en uso clínico para el tratamiento agudo de la ICC. Sin embargo, el uso crónico de milrinona en pacientes con ICC se ha asociado con actividades proarrítmicas (probablemente debido a un excesivo aumento de la contractilidad cardíaca inducida por AMPc (Packer, 1992; Thadani y Roden, 1998)). El cilostazol ha demostrado aumentar la mortalidad cardiovascular en los ensayos clínicos de CI en los EE.UU., y el uso seguro a largo plazo se ha demostrado en los países asiáticos (solicitud de autorización de la especialidad farmacéutica cilostazol, Otsuka America Pharmaceutical, Inc., 1997). En general, los pacientes con ICC no participaron en los ensayos de CI de cilostazol en los EE.UU. porque la ICC limitante de ejercicio era un criterio de exclusión. Por lo tanto, en los ensayos clínicos realizados en los EE.UU. participó un número relativamente pequeño de pacientes con ICC (y ninguno con ICC severa) y se desconoce el efecto del fármaco sobre la mortalidad en este grupo de pacientes. Sin embargo, basándose en la experiencia clínica previa con inhibidores de la FDE3, tales como milrinona, la FDA ha ordenado que cilostazol esté contraindicado en pacientes con ICC de cualquier grado de gravedad. Por desgracia, la población de pacientes con CI puede superponerse con la de los pacientes con ICC, de tal manera que los efectos beneficiosos de la inhibición de la FDE3 no están generalmente disponibles para estos pacientes. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevos

enfoques farmacológicos que eliminen o minimicen los posibles efectos secundarios cardíacos de cilostazol, permitiendo de ese modo que los beneficios de la terapia con cilostazol se extienda a los pacientes que presentan CI y disfunción cardíaca.

5 Sumario de la invención

La presente invención aborda estas necesidades proporcionando composiciones farmacéuticas que inhiben la actividad FDE3 y la recaptación de adenosina. Estas composiciones farmacéuticas incluyen una combinación de cilostazol y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina (por ejemplo, dipiridamol). En la presente invención, la combinación de cilostazol y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina actúa de forma sinérgica para aumentar el efecto antiagregante plaquetario y la vasodilatación, limitando al mismo tiempo el efecto inotrópico positivo de la inhibición de FDE3. La combinación de cilostazol y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina debe ser más seguro y más eficaz que cualquier agente solo para el tratamiento de varios síntomas y enfermedades, incluyendo EAOP (tales como IC), derrame cerebral, y trombosis coronaria y la reestenosis.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra el efecto sinérgico de adenosina (1 μM) y cilostazol (1 μM) sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno. Las plaquetas lavadas se activaron con colágeno (1 $\mu\text{g/ml}$) como se indica por la flecha.

La Figura 2 ilustra el efecto sinérgico dependiente de la dosis de dipiridamol (1, 3 y 10 μM) y cilostazol (10 pM a 100 μM) sobre la agregación plaquetaria en plaquetas lavadas.

La Figura 3 ilustra el efecto sinérgico de dipiridamol (1,3 y 10 μM) sobre la agregación plaquetaria en plaquetas lavadas en presencia de adenosina (1 μM) y cilostazol (30 nM y 100 nM).

La Figura 4 ilustra el efecto sinérgico de cilostazol (30 y 100 nM) sobre la agregación plaquetaria en plaquetas lavadas en presencia de adenosina (1 μM) y dipiridamol (1, 3 y 10 μM).

La Figura 5 ilustra el efecto sinérgico de dipiridamol (3 μM) y cilostazol (3 μM) sobre la elevación del nivel de AMPc intracelular en las plaquetas de PRP, en presencia de adenosina (0,3 μM y 1 μM).

La Figura 6 ilustra el efecto sinérgico de dipiridamol (0,5, 1, 5 y 10 μM) y cilostazol (1 μM) sobre la elevación del nivel de AMPc intracelular en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan adenosina A_{2A} en presencia o ausencia de adenosina (1 μM).

La Figura 7 ilustra el efecto sinérgico de dipiridamol (0,5, 1, 5 y 10 μM) y cilostazol (3 μM) sobre la elevación del nivel de AMPc intracelular en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan adenosina A_{2A} en presencia o ausencia de adenosina (1 μM).

La Figura 8 ilustra el efecto inhibidor de cilostazol en comparación con milrinona sobre la recaptación de adenosina en las plaquetas y eritrocitos humanos lavados.

La Figura 9 ilustra el aumento en los niveles de adenosina en plasma con estimulación con colágeno (2 $\mu\text{g/ml}$) en presencia o ausencia de dipiridamol (1 μM) en sangre entera.

La Figura 10 ilustra el efecto sinérgico de dipiridamol (0,1, 0,3, 1 y 3 μM) y cilostazol (10 μM y 30 μM) sobre la agregación plaquetaria en sangre entera inducida por 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno.

La Figura 11 ilustra el efecto sinérgico de dipiridamol (1 y 3 μM) y bajas concentraciones de cilostazol (0,3, 0,7, 1 y 3 μM) sobre la agregación de plaquetas de sangre entera inducida por 0,1 o 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno.

La Figura 12 ilustra el efecto sinérgico de dipiridamol ($\sim 1 \mu\text{M}$) y cilostazol ($\sim 1 \mu\text{M}$) sobre la inhibición de la agregación de plaquetas de sangre entera *ex vivo*.

La Figura 13 ilustra los protocolos experimentales utilizados para estudiar el efecto de cilostazol y dipiridamol sobre la función cardíaca de corazones aislados de conejo mediante la técnica Langendorff.

La Figura 14 ilustra el efecto de cilostazol (1, 3, y 10 μM) y dipiridamol (0,3, 1 y 3 μM) solo o en combinación sobre la contractilidad (A), frecuencia cardíaca (B) y flujo coronario (C).

La Figura 15 ilustra el protocolo de ensayo del efecto de la combinación de bajos niveles de cilostazol y dipiridamol sobre el flujo sanguíneo del músculo gastrocnemio durante el reposo, el ejercicio (con estimulación eléctrica), y la isquemia mediante oclusión de la arteria femoral y reperusión.

La Figura 16 ilustra que el tratamiento con la combinación de cilostazol (1 μM) y dipiridamol (1 μM) aumentó significativamente el flujo sanguíneo en el músculo gastrocnemio ejercitado y mejoró la recuperación del flujo sanguíneo después de un período de isquemia en comparación con aquellos en el músculo no tratado.

55 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la necesidad en la técnica de composiciones farmacéuticas seguras y eficaces para trastornos tales como la EAOP (como la CI), el ictus, la trombosis coronaria y la reestenosis. El cilostazol está disponible para el tratamiento de la CI y ha demostrado ser eficaz en la prevención del ictus (Gotoh, Tohgi, Hirai, Terashi, Fukuuchi, Otomo, Shinohara, Itoh, Matsuda, Sawada, Yamaguchi, Nishimaru y Ohashi, 2000), la trombosis coronaria después de una angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) (Park, Lee, Kim, Lee, Park, Hong, Kim y Park, 1999) y la reestenosis (Tsuchikane, Fukuhara, Kobayashi, Kirino, Yamasaki, Izumi, Otsuji, Tateyama, Sakurai y Awata, 1999). El cilostazol inhibe la FDE3 y los efectos antiplaquetarios y vasodilatadores resultantes parecen contribuir a su acción terapéutica. Sin embargo, los posibles efectos secundarios cardíacos de la inhibición de FDE3 son un problema. De hecho, debido a las experiencias clínicas previas con milrinona, cilostazol está contraindicado en la ICC de cualquier gravedad.

Los estudios recientes indican que cilostazol posee un mecanismo inesperado de acción que no se comparte con milrinona. De hecho, cilostazol ha demostrado que inhibe la recaptación de adenosina en diversas células, incluyendo miocitos ventriculares, células del músculo liso coronario, células endoteliales, eritrocitos y plaquetas.

5 Cilostazol inhibe la recaptación de adenosina con una CI_{50} de alrededor de 5-10 μ M. En comparación, milrinona no tiene ningún efecto inhibitorio significativo a concentraciones tan altas como 100 μ M (Liu et al., 2000). Debido a sus capacidades para inhibir la FDE3 y la recaptación de adenosina, los inventores consideran cilostazol un IMFDE.

La inhibición de la recaptación de adenosina es importante porque la adenosina induce una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria. La adenosina también ejerce efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos en el corazón. Los efectos de la adenosina sobre la vasculatura y las plaquetas están mediados por la activación de los receptores de adenosina A_2 . Los receptores de adenosina A_2 desencadenan la estimulación por la proteína G_s de la adenilato ciclasa y, por tanto, aumentan la concentración intracelular de AMPc. Los efectos anti-adrenérgicos bien conocidos de la adenosina sobre el miocardio están mediados por la

10 La activación de los receptores de adenosina A_1 . Los receptores de adenosina A_1 desencadenan la inhibición por la proteína G_i de la adenilato ciclasa y, por tanto, disminuyen la concentración intracelular de AMPc (Dobson y Fenton., 1998; George et al., 1991; Narayan et al., 2000). La inhibición de la recaptación de adenosina aumenta los niveles intersticiales y circulatorios de adenosina. Un aumento de la adenosina extracelular tiene las consecuencias favorables de aumentar los efectos anti-plaquetarios (Sun et al., 2001) y vasodilatadores de la inhibición de la FDE3

15 y disminuir el efecto inotrópico positivo de la inhibición de la FDE3 (Wang et al., 2001). El potencial efecto antagonista de la adenosina sobre el inotropismo positivo causado por la inhibición de la FDE3 se demostró por la inducción de un menor aumento en la contractilidad cardíaca por cilostazol en comparación con milrinona (Cone et al., 1999) y por la capacidad de un antagonista de la adenosina A_1 para aumentar el efecto cardiotónico de cilostazol en corazones aislados de conejo (Wang, Cone, Fong, Yoshitake, Kambayashi y Liu, 2001). Además, se ha determinado que la adenosina es un importante mediador local de la cardioprotección (Downey et al., 1994) y se ha demostrado que atenúa las lesiones por isquemia y reperfusión en el músculo esquelético y las neuronas (Wang et al., 1996; Whetzel et al., 1997). En general, la adenosina puede desempeñar un papel en el aumento de la distancia de claudicación provocada por la práctica de ejercicio y puede ejercer un efecto favorable sobre los síntomas relacionados con la CI (Laghi et al., 1997; Pasini et al., 2000).

La potencia de cilostazol para la inhibición de la recaptación de adenosina es más de un orden de magnitud inferior de la potencia de inhibición de la FDE3 (5-10 μ M frente a 0,32 μ M) (Liu et al., 2000). El aumento de la adenosina extracelular causada por cilostazol, aunque es suficiente para atenuar el inotropismo positivo y aumentar la agregación anti-plaquetaria, es leve en comparación con el provocado por el potente inhibidor de la recaptación de adenosina dipiridamol (CI_{50} 10 nM). Por lo tanto, un enfoque terapéutico para aumentar la eficacia y disminuir los posibles efectos secundarios cardíacos de cilostazol en el tratamiento de la CI es combinar este IMFDE con al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina (por ejemplo, dipiridamol). Los solicitantes han descubierto que la combinación de cilostazol y un potente inhibidor de la recaptación de adenosina produce efectos anti-plaquetarios superiores a los que se puede atribuir al efecto aditivo de un inhibidor de la FDE3 o a un inhibidor de la recaptación

20 de adenosina solo. De hecho, la combinación produjo una inhibición sinérgica de la función plaquetaria, lo que confirma la contribución de distintos mecanismos de acción. Además, se ha visto que la combinación reduce los efectos inotrópicos positivos de cilostazol solo. Además, la combinación de bajos niveles de cilostazol y dipiridamol aumenta el flujo sanguíneo en el músculo gastrocnemio ejercitado y aumenta la recuperación de flujo al tejido después de un período de isquemia (mientras que cada fármaco por separado no altera el flujo de sangre de manera significativa). Así, la combinación resultante proporciona un tratamiento seguro y eficaz para enfermedades que implican la agregación plaquetaria y la vasoconstricción. Estas enfermedades incluyen EAOP (tales como CI), ictus y trombosis coronaria. Esta combinación también puede usarse para tratar la reestenosis coronaria debido a la inhibición de la proliferación del músculo liso por cilostazol.

Además de su acción beneficiosa en la CI, cilostazol ha demostrado ser eficaz en la prevención de la recurrencia del ictus (Gotoh et al., 2000). Si bien no se sabe si dipiridamol solo es eficaz, dipiridamol en combinación con aspirina se comercializa actualmente como Aggrenox[®] (Boehringer Ingelheim) para la prevención del ictus. El efecto beneficioso de Aggrenox[®] se atribuye a los efectos antiplaquetarios aditivos de dipiridamol y aspirina. Diversos estudios han demostrado ventajas de cilostazol frente a otros agentes antiplaquetarios, como la aspirina (Igawa et al., 1990; Matsumoto et al., 1999). Dado que cilostazol y dipiridamol inhiben sinérgicamente la agregación plaquetaria, la combinación de estos dos fármacos debe ser al menos tan eficaz en la prevención del ictus.

El cilostazol se ha utilizado con éxito en la prevención de la trombosis coronaria después de una ACTP (Park et al., 1999) y para la prevención de la reestenosis después de una ACTP con o sin stent (Tsuchikane et al., 1999). La combinación de cilostazol y dipiridamol debe ser tan eficaz y más segura que cilostazol solo mediante la reducción del efecto secundario cardíaco deletéreo.

En una realización de la invención, la composición comprende cilostazol y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina en una cantidad capaz de proporcionar inhibición sinérgica de la agregación plaquetaria. Otra realización de la presente invención proporciona composiciones que comprenden cilostazol y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina en cantidades capaces de proporcionar la elevación sinérgica de los niveles de AMPc

intracelular. La invención también proporciona un uso para tratar la EAOP (tal como CI), el ictus, la trombosis coronaria y la reestenosis con las composiciones para lograr una mayor potencia terapéutica y eficacia con menos efectos secundarios que pueden ocurrir durante el tratamiento con un inhibidor de la FDE3 o un inhibidor de la recaptación de adenosina solo.

5 “Inhibidor de la FDE3” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un agente que es capaz de inhibir o reducir selectivamente la actividad de la FDE tipo III. El inhibidor de la FDE3 de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de los compuestos conocidos o aún por descubrir que inhibe la FDE3. Inhibidores de la FDE3 aceptables incluyen los siguientes: biperidinas, tales como milrinona y amrinona; imidazolonas, tales como piroximona y
10 enoximona; imidazolinas, tales como imazodan y 5-metil-imazodan; dihidropiridazinonas, tales como indolidan y LY181512; compuestos dihidroquinolinona, tales como cilostamida, cilostazol y OPC 3911 y otros compuestos, tales como anagrelida, bemoradan, ibudilast, isomazol, lixazinona, motapizona, olprinona, ftalazinol, pimobendan, quazinona, siguazodan y trequinsina.

15 “IMFDE” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un agente que es capaz de inhibir o reducir selectivamente la actividad de la FDE3 y es eficaz en bloquear el transporte de adenosina a una célula. El IMFDE de acuerdo con la invención es cilostazol.

20 “Inhibidor de la recaptación de adenosina” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier agente que es eficaz en bloquear el transporte de adenosina en una célula. Tales inhibidores de la recaptación de adenosina incluyen los compuestos conocidos que han demostrado inhibir el transporte de adenosina. Inhibidores de la recaptación de adenosina aceptables de acuerdo con la invención son los siguientes: dipiridamol; propentofilina; dilazep; nitrobeniltioinosina; S-(4-nitrobenzil)-6-tioguanosina; S-(4-nitrobenzil)-6-tioinosina; yodohidroxi-nitrobeniltioinosina; mioflazina; sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25 La presente invención se refiere al uso de una combinación de cilostazol y al menos una inhibidor de la recaptación de adenosina (es decir, la presente composición farmacéutica) para tratar la EAOP (tal como CI), el ictus, la trombosis coronaria u otros síntomas o enfermedades caracterizadas como resultantes de la agregación excesiva de plaquetas, u oclusión arterial, etc., y la reestenosis coronaria que resulta de la proliferación del músculo liso. Como se usa en la presente memoria, farmacéuticamente eficaz se refiere a una cantidad de un agente que es capaz de
30 reducir la tasa de aparición o la gravedad de cualquiera de los síntomas o enfermedades descritas anteriormente. Como es sabido por los expertos con conocimientos normales en la técnica, los síntomas de los anteriores incluyen malestar o dolor en las extremidades afectadas y gangrena, etc. En general, una administración eficaz de la composición farmacéutica provocará la reducción de la actividad de la FDE3 y la recaptación de adenosina en las plaquetas y otras células sanguíneas, así como en las células de músculo liso vascular, en cantidades suficientes para prevenir, mejorar o de otro modo tratar los síntomas y enfermedades descritas.

35 Las personas con conocimientos normales en la técnica serán capaces de determinar y optimizar las dosis de cilostazol y de los inhibidores de la recaptación de adenosina de la presente invención utilizando técnicas que son conocidas en la técnica. Esas técnicas se exponen, por ejemplo, en las páginas 3-41 de The Pharmacological Basis of Therapeutics de Goodman y Gilman, Novena Edición (1996). Las dosis se pueden determinar y optimizar mediante el uso de ensayos establecidos, estudios de respuesta a la dosis y tiempo convencionales y estudios de farmacocinética y metabolismo convencionales. Otros refinamientos de los cálculos necesarios para determinar las dosis apropiadas para el tratamiento se realizan de forma rutinaria por los expertos normales en la técnica y están
45 dentro del tipo de las tareas realizadas rutinariamente por ellos sin experimentación indebida. Por ejemplo, los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de administración para uso en un paciente. La administración puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier composición para su uso en la terapia de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede ser formulada para conseguir un intervalo de concentración en plasma de sangre circulante según lo determinado en el cultivo celular. Cuando dos o más compuestos se van a administrar, ya sea como una sola formulación o como formulaciones separadas, la dosis(s) se puede formular para lograr un intervalo de relación molar entre los dos o más compuestos en el plasma de la sangre circulante como se determina en el cultivo celular. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, una composición que comprende cilostazol y dipiridamol
50 produce una concentración en sangre de aproximadamente 0,3 μM a aproximadamente 10 μM para cilostazol y aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 3 μM para dipiridamol. En otras realizaciones, una composición que comprende cilostazol y dipiridamol produce una concentración en sangre de 0,5 μM a 5 μM o de 1 μM a 3 μM , para cilostazol y 1 μM a 3 μM para dipiridamol. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, una composición que comprende cilostazol y dipiridamol produce una relación molar cilostazol:dipiridamol en la sangre de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 1:0,01. En otras formas de realización de la presente invención, una composición que comprende cilostazol y dipiridamol produce una relación molar cilostazol:dipiridamol en sangre de aproximadamente 0,16:1 a aproximadamente 1:0,2, o aproximadamente 0,33:1 a aproximadamente 1:0,33. Con la actual formulación clínicamente disponible, estos niveles de concentraciones en sangre son equivalentes a una dosis diaria de 20 mg a 300 mg de cilostazol (Pletal[®]) y 200 mg a 600 mg de dipiridamol (Persantine-Retard[®]). En
65 otras realizaciones, estos niveles de concentraciones en sangre son equivalentes a una dosis diaria de 50 mg a 200 mg o 50 mg a 160 mg, para cilostazol y de 200 a 600 mg de dipiridamol. Por consiguiente, una preparación

farmacéutica que comprende cilostazol y dipiridamol tiene una proporción en peso cilostazol:dipiridamol de aproximadamente 1:0,7 a aproximadamente 1:30. En otras realizaciones, una preparación farmacéutica que comprende cilostazol y dipiridamol tiene una proporción en peso cilostazol:dipiridamol de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:12 o de aproximadamente 1:1,25 a aproximadamente 1:12. Los niveles en sangre pueden medirse por cromatografía líquida de alto rendimiento o por otros métodos conocidos en la técnica.

Además, las dosis de cilostazol y de inhibidores de la recaptación de adenosina para ser administrados en el uso de la presente invención variarán dependiendo de, por ejemplo, los síntomas y las enfermedades particulares a tratar, el modo de administración y la edad, el peso y el sexo del paciente a tratar. De hecho, ya que los pacientes individuales pueden presentar una amplia variación en la gravedad de los síntomas y enfermedades y cada fármaco tiene sus características terapéuticas únicas, el modo preciso de administración y dosis empleadas para cada paciente se deja a la discreción del médico.

“Paciente” como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier persona o animal no humano en necesidad de tratamiento para los síntomas y las enfermedades anteriores, o para cualquier sujeto para el cual el tratamiento puede ser beneficioso, incluyendo seres humanos y animales no humanos. Tales animales no humanos a ser tratados incluyen todos los vertebrados domesticados y salvajes, preferiblemente, pero sin limitarse a: ratones, ratas, conejos, peces, aves, hámsters, perros, gatos, cerdos, ovejas, caballos, vacas y primates no humanos.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden formulaciones de principios activos (es decir, la combinación de cilostazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables o excipientes y opcionalmente otros agentes terapéuticos. El vehículo(s) debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la composición y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Cuando los componentes individuales de la combinación se administran juntos o por separado, por lo general, se presentan como una formulación farmacéutica.

Las formulaciones adecuadas incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, usando métodos tales como los descritos en Gennaro et al, Remington Pharmaceutical Sciences (18^a ed, Mack Publishing Company, 1990, ver especialmente la Parte 8: Preparaciones farmacéuticas y su fabricación). Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. Tales componentes accesorios incluyen los convencionales en la técnica, tales como, cargas, aglutinantes, diluyentes, disgregantes, lubricantes, colorantes, agentes aromatizantes y agentes humectantes.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como píldoras, comprimidos o cápsulas que contienen cada una cantidad predeterminada de principios activos en forma de polvo o gránulos o como una solución o suspensión. Los principios activos también pueden estar presentes como un bolo o pasta o pueden estar contenidos dentro de liposomas.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio o enema.

Para la administración parenteral, las formulaciones adecuadas incluyen inyección estéril acuosa y no acuosa. Las formulaciones pueden ser presentadas en dosis unitarias o en envases multidosis, por ejemplo, viales y ampollas sellados, y pueden conservarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua, antes de usar.

Las formulaciones adecuadas para la administración por inhalación nasal incluyen polvos finos o neblinas que se pueden generar por medio de aerosoles presurizados de dosis fija, nebulizadores o insufladores.

La presente invención incluye además un proceso para la preparación de una composición farmacéutica que comprende poner en asociación una combinación de cilostazol (o sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina (o sal farmacéuticamente aceptable del mismo) con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables del mismo.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Ejemplo 1

Cilostazol y dipiridamol inhiben sinérgicamente la agregación de plaquetas humanas lavadas *in vitro*

Preparación de plaquetas lavadas

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de diez voluntarios sanos (sin medicación durante al menos 10 días) mediante una técnica de dos jeringas usando una aguja de mariposa 19G. El procedimiento para la extracción de sangre fue aprobado por el comité de revisión institucional de acuerdo con la convención de Helsinki. Se recogieron nueve volúmenes de sangre directamente en una jeringa que contiene 1 volumen de citrato trisódico (3,8 %). Se recogió plasma rico en plaquetas (PRP) después de la centrifugación a 150 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. La suspensión de plaquetas lavadas (WP) se preparó a partir de PRP citratado mediante el método de lavado de citrato tal como se ha descrito anteriormente en Cone et al. (Cone et al., 1999a). Las plaquetas se resuspendieron finalmente en tampón HEPES de Tyrode (NaCl 136,7 mM, dextrosa 5,5 mM, KCl 2,6 mM, NaHCO₃ 13,8 mM, MgCl₂ 1 mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM y HEPES 10 mM; pH 7,4). La concentración de plaquetas se ajustó a 3,8 x 10⁸ plaquetas/ml.

Descripción de los compuestos de ensayo

Cilostazol (OPC-13013): Un IMFDE que inhibe selectivamente la FDE3 y evita la agregación plaquetaria mediante la elevación de los niveles de AMPC. (Ofrecido por Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., Tokushima, Japón, Lote # B8E88M.)

Dipiridamol: Un fármaco antiplaquetario que bloquea la recaptación de adenosina en las células vasculares y células sanguíneas. (Calbiochem, La Jolla, California, Cat # 322328, Lote # B11755.) ZM241385: Un bloqueador selectivo del receptor de adenosina A_{2A}. (Tocris, Ballwin, MO., Cat # 1036, lote # 2/18074.)

Detección de la agregación de plaquetas lavadas

La agregación se cuantificó por el cambio en la transmisión de la luz utilizando un Analizador de Agregación AG-10 (Kowa, Japón). Las plaquetas lavadas se mantuvieron a temperatura ambiente y el estudio se realizó en las 3 horas siguientes a la recogida de sangre. El cilostazol se disolvió en DMSO y la adenosina se disolvió en agua. Se hicieron diluciones apropiadas para obtener concentraciones de trabajo deseadas mientras se mantenía la concentración final de DMSO en no más de 0,2 %. La suspensión de plaquetas (400 µl) se pipeteó en una cubeta de agregación y se dejó incubar con agitación a 1000 rpm a 37 °C durante 1 minuto. A continuación se añadieron fármaco o vehículo (DMSO) (0,4 µl) y se incubaron durante otros 3 minutos. Cuando se ensayó el sinergismo con dipiridamol, se añadieron dipiridamol (1, 3, y 10 µM) y adenosina 1 µM 1 minuto después de la adición de fármaco o DMSO de manera que el tiempo total de incubación de dipiridamol y adenosina fue de 2 minutos. A continuación, la suspensión se estimuló con 1-2 µg/ml de colágeno (Chrono-Log Corp., Havertown, PA). El tiempo total de la agregación registrada fue de 15 minutos. Los valores de transmisión de luz máximos durante los últimos 11 minutos (después de la adición de colágeno) se presentan como el porcentaje de agregación de control (DMSO + etanol + adenosina).

Cilostazol y dipiridamol inhiben sinérgicamente la agregación de plaquetas lavadas

Para estudiar el efecto sinérgico de la adenosina y del cilostazol sobre la agregación de plaquetas lavadas, se valoró la cantidad de colágeno para cada donante individual en presencia de adenosina 1 µM. Se utilizó la concentración mínima de colágeno (1-5 µg/ml) en la que adenosina 1 µM no mostró ningún efecto sobre la agregación. Cilostazol (1 µM) o adenosina (1 µM) por sí solos tuvieron poco efecto sobre la agregación plaquetaria inducida por colágeno (Figura 1a, 1b, 1c). Sin embargo, en combinación ambos inhibían completamente la agregación plaquetaria (Figura 1d).

La inhibición dependiente de la concentración de la agregación inducida por colágeno de las plaquetas lavadas por cilostazol en combinación con dipiridamol (1, 3 y 10 µM) se realizó en presencia de adenosina (1 µM). Como se muestra en la Figura 2, cilostazol dependiente de la dosis inhibió la agregación plaquetaria. La adición de adenosina desplazó la curva inhibitoria a la izquierda (Tabla 2). La CI₅₀ calculada se redujo de 2,66 ± 0,41 µM a 0,38 ± 0,05 µM (p <0,001, prueba t de Student de dos colas). Dpiridamol dependiente de la dosis desplazó más hacia la izquierda las curvas de inhibición de cilostazol con adenosina. La CI₅₀ cambió a 0,17 ± 0,04 µM (p <0,05), 0,11 ± 0,06 µM (p <0,05) y 0,01 ± 0,01 µM (p <0,005) en presencia de 1, 3 y 10 µM dipiridamol, respectivamente (Tabla 1). Los datos indican que la combinación de dipiridamol y cilostazol ejercían un efecto sinérgico sobre la inhibición de la agregación plaquetaria, en lugar de tener un efecto aditivo.

Tabla 1

CI ₅₀ de cilostazol sobre la agregación plaquetaria				
Cilostazol	+Adenosina (1 µM)	+Adenosina +Dipiridamol (1 µM)	+Adenosina +Dipiridamol (3 µM)	+Adenosina +Dipiridamol (10 µM)
2,66±0,41 µM (n=6)	0,38±0,05 µM (n=5)	0,17±0,04 µM (n=5)	0,11±0,06 µM (n=5)	0,01±0,01 µM (n=5)
	p<0,001 (frente, sin Ado)	p<0,05 (frente, con Ado)	p<0,05 (frente con Ado)	p<0,005 (frente con Ado)

El efecto sinérgico de cilostazol y dipiridamol fue reconfirmado utilizando plaquetas lavadas de cinco donantes adicionales, pero esta vez, centrándose en cilostazol 30 y 100 nM. La Figura 3 muestra el % de inhibición de la agregación plaquetaria en comparación con el control (sin fármacos añadidos) cuando se añadía cilostazol 1 y 3 μM cilostazol en presencia de adenosina (1 μM) y dipiridamol (1, 3 y 10 μM). En comparación con los controles, dipiridamol (1, 3 o 10 μM) o cilostazol (30 o 100 nM) por sí solos no tuvo ningún efecto inhibitorio significativo sobre la agregación de plaquetas lavadas a las concentraciones ensayadas (Figura 3 y 4). La adición de adenosina (1 μM , a la que no se observó efecto con adenosina sola) aumentó el efecto del dipiridamol significativamente (Figura 3). Se observó un aumento adicional con la adición de cilostazol 100 nM pero no 30 nM. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de dipiridamol 10 μM sobre la agregación plaquetaria se podría lograr con la combinación de dipiridamol 1 μM y cilostazol 100 nM, en presencia de adenosina, debido al efecto sinérgico entre los dos compuestos. La Figura 4 muestra el % de inhibición de la agregación plaquetaria en comparación con el control cuando se añadía dipiridamol 1, 3 o 10 μM en presencia de adenosina 1 μM y cilostazol 30 o 100 nM. La combinación de cilostazol 30 o 100 nM con adenosina 1 μM mostró diferencias significativas con los controles, pero no por sí solos. La adición de dipiridamol a la combinación en ambas concentraciones de cilostazol (30 y 100 nM) aumentó significativamente el efecto inhibitorio en las tres concentraciones. Una vez más, el efecto sinérgico entre los dos compuestos se puede ilustrar en el sentido de que el efecto equivalente de cilostazol 100 nM podría lograrse mediante la combinación de cilostazol 30 nM con dipiridamol 3 μM , en presencia de adenosina. Como se esperaba, la combinación de cilostazol con dipiridamol sin adenosina no tuvo ningún efecto sobre la agregación de plaquetas lavadas (datos no presentados), lo que sugiere que la adenosina es el mediador del efecto sinérgico entre cilostazol y dipiridamol. Por lo tanto, estos experimentos demostraron claramente que la combinación de cilostazol y dipiridamol inhibe sinérgicamente la agregación plaquetaria. Esto permitiría el uso de concentraciones mucho más bajas de cada agente en combinación para lograr la misma eficacia que la obtenida con concentraciones más altas de cada agente utilizado solo. El efecto sinérgico se cree que es debido a una mayor elevación de los niveles de AMPc intracelular, como se demuestra a continuación.

Ejemplo 2

Cilostazol y dipiridamol aumentan sinérgicamente la concentración de AMPc intracelular

Medición de AMPc en las plaquetas

En primer lugar, adenosina, cilostazol o dipiridamol solos o en combinación se dividieron en alícuotas en tubos de ensayo de polipropileno separados. DMSO y etanol se utilizaron como controles. Los agentes de ensayo solos o en combinaciones se mezclaron con PRP mediante una breve agitación en vórtex. El volumen de la muestra final fue de 200 μl y cada experimento se realizó por duplicado. Después de incubar las muestras a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, la reacción se terminó mediante la adición de 50 μl de ácido perclórico (PCA, 1,25 N) enfriado con hielo. Después de congelar y descongelar una vez, la mezcla se neutralizó con 50 μl de KHCO_3 (1,25 N) y se centrifugó a 20.000 x g durante 15 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes resultantes se recogieron y se diluyeron con tampón acetato proporcionado con el kit. La concentración de AMPc se midió por duplicado utilizando un kit de radioinmunoensayo de AMPc (NEK-033, NEN Life Science, Boston, MA).

Establecimiento de células CHO que expresan el receptor de adenosina A_{2A} humano

Se extrajo ARN total de plaquetas humanas frescas y 5 μg se sometieron a transcripción inversa en ADNc y se utilizó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron cebadores específicos con una secuencia Kozak (CCCACC) del receptor de adenosina A_{2A} (cebador directo: 5'-CCCACCATGCCATCATGGGCT-3', cebador inverso: 5'-TCAGGACACTCCTGCTCC-3') y se sintetizaron por Life Technologies (Rockville, MD). Usando estos cebadores, se amplificaron regiones codificantes completas por PCR y se recombinaron además en el vector de clonación, pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La secuencia de ADN del inserto se confirmó antes de insertar en el vector de expresión de mamíferos, pcDNA3.1 + (Invitrogen). Se adquirió en Stratagene (La Jolla, CA) un vector de expresión (pCRE-Luc) que contiene un elemento de respuesta a AMPc (CRE) en la región promotora, que determina la expresión de la luciferasa. El nivel de expresión de la luciferasa refleja la concentración de AMPc intracelular. Se sabe que el receptor de adenosina A_{2A} está acoplado a las proteínas G_s (Hüttemann et al., 1984). Por lo tanto, la activación de los receptores se reflejaría en la expresión de la luciferasa, en donde el nivel de expresión puede medirse por el ensayo de actividad de la luciferasa. La co-transfección del vector informador de la luciferasa con los vectores que contienen los receptores de adenosina A_{2A} se llevó a cabo mediante precipitación con fosfato de calcio en células de ovario de hámster chino (CHO). Se seleccionaron transfectantes estables con 1,0 mg/ml de G418 (Life Technologies) durante 12 días. Los clones de células que sobre-expresan los receptores de adenosina A_{2A} funcionales se determinaron mediante la expresión de la luciferasa con estímulo de la adenosina.

Ensayo de luciferasa

Para analizar el efecto sinérgico de cilostazol y dipiridamol con o sin adenosina sobre la elevación de AMPc, las células fueron sub-cultivadas hasta la casi confluencia en una placa de 96 pocillos de pared blanca con fondo claro (Coming Costar Co., Cambridge, MA). Al día siguiente, las células se lavaron una vez con medio F12K suplementado con FCS al 0,5 % y luego se incubaron con 100 μl de medio solo (basal) o medio más agentes de

ensayo durante 4 horas a 37 °C. Después de equilibrar a temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo 100 µl de sustrato de detección (Bright-Glo™ sistema de ensayo de la luciferasa, Promega, Madison, WI). La actividad de la luciferasa se midió después de 5 minutos utilizando un lector de placas de luminiscencia Mediators PhL (Imtech, New Windsor, MD). El valor de la luminiscencia (unidad arbitraria) detectada durante medio segundo se tomó como la actividad de la luciferasa.

Cilostazol y dipiridamol aumentan sinérgicamente los niveles de AMPc intracelular

El efecto del dipiridamol y cilostazol sobre la concentración de AMPc intracelular se estudió por primera vez en PRP. Como se muestra en la Figura 5A y 5B, en presencia de adenosina 0,3 o 1 µM, dipiridamol (3 µM) en combinación con cilostazol (3 µM) aumentó aún más los niveles de AMPc intra-plaquetas, en comparación con cada uno individualmente (n = 2 de ensayos duplicados). Debido a los bajos niveles de AMPc basales en las plaquetas, se estableció un ensayo de luciferasa en células CHO que sobre-expresaban el receptor de adenosina A_{2A} en plaquetas humanas. La cantidad de actividad de la luciferasa refleja los niveles de AMPc intracelular. El efecto inhibidor de dipiridamol sobre la recaptación de adenosina fue similar en plaquetas y eritrocitos. La Figura 6 muestra el efecto de dipiridamol sobre la actividad de la luciferasa en presencia de adenosina 0,03 mM y/o cilostazol 1 µM. Del mismo modo, la Figura 7 muestra el efecto de dipiridamol sobre la actividad de la luciferasa en presencia de adenosina 0,03 µM y/o cilostazol 3 µM (triplicados representativos de al menos 3 experimentos independientes). Como se muestra en las Figura 6 y 7, cilostazol 1 y 3 µM elevaron sinérgicamente la actividad de luciferasa en presencia de dipiridamol, incluso en ausencia de adenosina en el caso de cilostazol 3 µM. Dpiridamol dependiente de la dosis aumentaba el efecto de cilostazol en el intervalo de 0,5 µM a 10 µM, alcanzando un máximo con aproximadamente 5 µM. En general, estos estudios establecen que cilostazol y dipiridamol actúan sinérgicamente para aumentar la concentración intracelular de AMPc y proporcionan un mecanismo probable por el cual estos agentes inhiben sinérgicamente la agregación plaquetaria.

Ejemplo 3

Cilostazol inhibe la recaptación de adenosina

Ensayo de recaptación de adenosina en plaquetas y eritrocitos lavados

Se prepararon eritrocitos lavados (wRBC) de la siguiente manera. Después de la centrifugación inicial y la eliminación del PRP y la capa leucocitaria, se diluyeron 100 µl de la porción de sedimento rojo en 12 ml de PBS que contenía calcio y magnesio. Se centrifugaron los eritrocitos a 150 x g durante 5 min. Después de un lavado con PBS, el sedimento se resuspendió en PBS a 1×10^8 eritrocitos/ml. Se llevaron a cabo experimentos de recaptación de adenosina de acuerdo con el método descrito previamente (Liu, Fong, Cone, Wang, Yoshitake y Kambayashi, 2000). Se incubaron 100 µl de plaquetas lavadas o de eritrocitos lavados con 50 µl de cilostazol o milrinona a 37 °C durante 5 min. A continuación, se añadieron 50 µl de 1 µCi de [³H]-adenosina (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), adenosina 1 µM y eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenosina (EHNA, concentración final, Sigma Chemical), seguido de 200 µl de aceite (ftalato de dibutilo : ftalato de dioctilo = 1 : 1, Aldrich) y a continuación se incubaron durante 1 min. Las células se separaron de la adenosina libre en la fase acuosa por centrifugación a 16.000 xg durante 2 min. Después de la eliminación de las fases de aceite y agua, se midió la radiactividad del sedimento celular utilizando un contador de centelleo líquido β (1209 Rackbeta, LKB, Turku, Finlandia).

Cilostazol inhibe la recaptación de adenosina

Se llevaron a cabo experimentos de recaptación de [³H]-adenosina con plaquetas lavadas y eritrocitos lavados y los resultados se muestran en la Figura 8. Cilostazol inhibía la recaptación de adenosina tanto en las plaquetas como en eritrocitos con una CI₅₀ de aproximadamente 7 µM (n = 3). La potencia de cilostazol en la inhibición de la recaptación es similar a los valores notificados previamente en los miocitos cardíacos de conejo, músculo liso vascular humano y células endoteliales (5~10 µM) (Liu, Fong, Cone, Wang, Yoshitake y Kambayashi, 2000). En comparación, la milrinona no tenía prácticamente ningún efecto sobre la recaptación de adenosina por las plaquetas o los eritrocitos. Se usaron células de CHO que sobre-expresan receptores de adenosina A_{2A} humanos funcionales para confirmar adicionalmente el papel de cilostazol en la inhibición de la recaptación de adenosina. El cilostazol inhibía la recaptación de [³H]adenosina en estas células CHO con una potencia similar a las plaquetas y eritrocitos, mientras que la milrinona no tuvo ningún efecto (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Cilostazol y dipiridamol inhiben sinérgicamente la agregación de plaquetas en sangre entera humana *in vitro*

Preparación de sangre entera

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de diez voluntarios sanos (sin medicación durante al menos 10 días) mediante una técnica de dos jeringas utilizando una jeringa que contiene 4 µl de hirudina (250 U/µl)/10 ml de sangre.

Estudio de agregación plaquetaria en sangre entera

Se diluyeron muestras de sangre 1:1 con solución salina fisiológica y se realizaron ensayos utilizando un agregómetro de sangre entera Chrono-Log con una velocidad de agitación de 1000 rpm. Al comienzo, se sumergió una barra de agitación en una cubeta de plástico seguido por la adición de 1 ml de sangre completa diluida. Los electrodos se colocaron después en la cubeta y la muestra se dejó incubar a 37 °C mientras se calibraba el instrumento. El cilostazol y ZM241385 se disolvieron en DMSO a una concentración inicial de 100 mM. El dipiridamol se diluyó en etanol (EtOH) a una concentración inicial de 100 mM. Se hicieron diluciones adicionales para obtener la concentración de ensayo apropiada de cilostazol (10 µM y 30 µM, debido a la propiedad de unión a la proteína de cilostazol), dipiridamol (0,1, 0,3, 1 o 3 µM) y ZM241385 (0,1 µM) cuando se añade a los 1 ml de sangre entera. Se añadieron los fármacos y el vehículo en un volumen de 1 µl de modo que la concentración final de DMSO no excediese el 0,2 %. La suspensión se dejó incubar durante 3 minutos antes de añadir colágeno. La concentración de colágeno utilizada en este estudio fue de 0,5 g µg/ml, determinada por la selección preliminar. Para probar el sinergismo entre cilostazol y dipiridamol, se añadió dipiridamol (1 µl de la solución madre) 1 minuto después de la adición de cilostazol. Para ver los efectos inversos de estos fármacos, se añadió 0,1 µM de ZM241385 (1 µl) 1 minuto antes de la adición de los fármacos. El colágeno se añadió 3 minutos después de la adición de los fármacos, por lo que el ZM241385 se dejó incubar durante un total de 4 minutos, cilostazol o DMSO 3 minutos, y dipiridamol 2 minutos. Después de la estimulación, se observó la amplitud durante 11 minutos, usándose la máxima amplitud para la presentación de los datos. Para probar si las concentraciones más bajas de cilostazol también pueden sinergizar con dipiridamol para inhibir la agregación plaquetaria en sangre entera, se estimularon las plaquetas con concentraciones ligeramente más bajas de colágeno (0,1 o 0,3 µg/ml) que producen una agregación menos potente, pero que son más relevantes para los trastornos en pacientes. Se examinaron diferentes combinaciones de cilostazol (0,3, 0,7, 1 y 3 µM) y dipiridamol (1 y 3 µM). Los datos se expresan como porcentaje de los valores detectados en ausencia de cualquier inhibición.

Medición de la concentración de adenosina en el plasma

Se extrajo sangre y se mezcló con hirudina humana recombinante (100 U/ml). Se utilizó el mismo procedimiento para la agregación de plaquetas para estimular estas plaquetas con colágeno (2 µg/ml). Después de una incubación de 5 minutos, se mezclaron rápidamente 500 µl de plaquetas lavadas con 500 µl de solución salina enfriada con hielo. Las células se centrifugaron a 20.000 x g durante 4 minutos a 4 °C. El sobrenadante (600 µl) se mezcló primero con 300 µl de PCA (2,5 N) y después se neutralizó con 300 µl de KHCO₃ (2,5 M). Finalmente, la mezcla se centrifugó a 20.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La concentración de adenosina en los sobrenadantes se midió utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC, Waters Alliance 2690) con una columna C₁₈ Hypersil de 3 µ (150 mm x 4,6 mm) y un gradiente de 5 a 20 % de metanol en KH₂PO₄. La adenosina se detectó utilizando un detector de matriz de diodos (Water 996) con un cambio de absorbancia a 258 nm y se cuantificó por comparación de los tiempos de retención y la altura del pico con las de un patrón externo conocido. La cuantificación se realizó utilizando el software Waters Millennium 32 Client/Server.

Durante la activación de las plaquetas se generan grandes cantidades de adenosina

Mediante el uso de HPLC, se midieron las concentraciones de adenosina en el medio extracelular de la sangre entera 5 minutos después de la estimulación con 2 µg/ml de colágeno. Como se muestra en la Figura 9, una gran cantidad de adenosina (3152 ± 428 nM, en comparación con el basal 240 ± 53 nM, n = 5) se generó en sangre entera después de la estimulación del colágeno, probablemente debido a la degradación de ATP y ADP liberados de las plaquetas activadas. En presencia de dipiridamol (1 µM), la agregación de las plaquetas no se vio afectada, pero los niveles de adenosina se incrementaron significativamente hasta 5916 ± 641 nM (n = 3).

Cilostazol y dipiridamol inhiben sinérgicamente la agregación plaquetaria en la sangre entera

Como se ha observado anteriormente, no es necesario añadir adenosina exógena a este ensayo dado que durante la activación de las plaquetas, se pueden generar grandes cantidades de adenosina. En sangre entera, los experimentos han demostrado que cilostazol (10 o 30 µM) o dipiridamol (0,1, 0,3, 1 o 3 µM) por sí solos no tenían ningún efecto significativo sobre la agregación plaquetaria (Figura 10). Sin embargo, la combinación de cilostazol 10 µM y dipiridamol 3 µM inhibió significativamente la agregación plaquetaria (desde 98,9 ± 2,0 % para cilostazol 10 µM solo y 97,9 ± 0,7 % para dipiridamol 3 µM solos hasta 74,8 ± 6,2 %, n = 8, p <0,005, Figura 10A). Se observó una demostración más clara con la combinación de cilostazol 30 µM con dipiridamol a concentraciones aún más bajas (n = 5 a 14, Figura 10B). El efecto sinérgico era dependiente de la dosis tanto para cilostazol como para dipiridamol. Además, en presencia de ZM241385 (0,1 µM), un antagonista selectivo del receptor de adenosina A_{2A}, el efecto sinérgico de dipiridamol y cilostazol revertió hasta el nivel basal de cilostazol solo (n = 8), lo que sugiere que el efecto sinérgico estaba mediado por la acumulación de adenosina en el plasma.

Cuando la agregación de sangre entera fue inducida por 0,1 o 0,3 µg/ml de colágeno, se observó que la combinación de cilostazol (entre 0,3 µM y 3 µM) y dipiridamol (1 o 3 µM) inhibía significativamente la agregación plaquetaria (Figura 11). Por ejemplo, una combinación de cilostazol 0,7 µM y dipiridamol 3 µM inhibía la agregación plaquetaria en un 57 ± 11 % y una combinación de cilostazol 1 µM y dipiridamol 3 µM inhibía la agregación

plaquetaria en un 72 ± 11 % ($p < 0,001$). Cilostazol o dipiridamol por sí solos a estas concentraciones no causaron ninguna inhibición significativa.

Ejemplo 5

Cilostazol y dipiridamol inhiben sinérgicamente la agregación de plaquetas en sangre entera humana *ex vivo*

Diseño del estudio clínico

Se diseñó un estudio transversal, secuencial, abierto, de un solo período para probar si se puede observar un efecto sinérgico de cilostazol y dipiridamol en la inhibición de la agregación plaquetaria a dosis clínicamente relevantes en voluntarios sanos. Seis sujetos recibieron un comprimido de 100 mg de cilostazol (Pletal[®]) el día uno del estudio. El día 4 del estudio, los sujetos recibieron un comprimido de 200 mg de dipiridamol. El día 6 del estudio, estos sujetos recibieron la combinación de dipiridamol y cilostazol.

Agregación plaquetaria en sangre entera

Antes de y 2 y 4 horas después de la administración, se extrajeron 5 ml de sangre en una jeringa que contenía 10 U/ml de heparina fraccionada. Las muestras de sangre se diluyeron con solución salina fisiológica y la agregación plaquetaria se midió utilizando un agregómetro de sangre entera Chrono-Log con una velocidad de agitación de 1000 rpm. La agregación plaquetaria se indujo por la adición de colágeno (concentración final de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, Nycomed Arzneimittel, Munich, Alemania). El porcentaje de agregación se registró en cada punto de tiempo. Para comparar el efecto de los tratamientos farmacológicos, la agregación a las 2 horas y 4 horas se normaliza como un porcentaje de los valores anteriores a la administración.

La combinación de cilostazol y dipiridamol inhibe sinérgicamente *ex vivo* la agregación de plaquetas en sangre entera

La concentración en sangre de cilostazol 2 y 4 horas después de una dosis única de 100 mg es de aproximadamente 2 μM . Basándose en datos farmacocinéticos anteriores, la concentración en sangre de dipiridamol a 2 y 4 horas después de una sola dosis de 200 mg también está en el intervalo de 2 μM . Dado que un requisito de acuerdo con las instrucciones del fabricante del agregómetro es la dilución 1: 1 de sangre con solución salina, las concentraciones de fármaco eficaces en el ensayo de agregación de plaquetas *ex vivo* se estiman en 1 μM para cilostazol y 1 μM para dipiridamol. Como era de esperar, a estas concentraciones, ni cilostazol ni dipiridamol solos inhibieron la agregación plaquetaria (Figura 12). Sin embargo, la agregación plaquetaria es inhibida en un 45 % a las 4 horas después de que los sujetos fueron tratados con la combinación de cilostazol y dipiridamol ($p < 0,001$ frente a la administración previa). Estos resultados son muy similares a los datos obtenidos en los estudios de agregación de sangre completa *in vitro* descritos en el Ejemplo 4.

Ejemplo 6

Dipiridamol contrarresta los posibles efectos perjudiciales de cilostazol sobre la función cardíaca

Preparaciones quirúrgicas

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio", publicada por el Consejo Nacional de Investigación, 1996, Washington DC y aprobado por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales del Otsuka Maryland Research Institute, LLC. Conejos macho (Nueva Zelanda Blanco), con un peso 2-2,5 kg, fueron anestesiados con pentobarbital intravenoso (30 mg/kg) a través de una vena marginal de la oreja. Se realizó una traqueotomía y los animales fueron intubados. La ventilación era con aire ambiente, complementado con 100 % de O_2 a través de un ventilador de animales pequeños Harvard. La frecuencia respiratoria se ajustó para mantener la PO_2 , la PCO_2 y el pH de la sangre arterial en el intervalo fisiológico. La temperatura corporal se mantuvo a aproximadamente 38 °C con una manta eléctrica. Los corazones fueron expuestos a través de una incisión en la línea media del pecho y rápidamente extirpados por una incisión en la base del corazón y colocados en tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit enfriado con hielo. A continuación, el corazón se conectó a un aparato Langendorff por la raíz aórtica y fue perfundido con tampón de Krebs-Henseleit no recirculante a una presión constante de 75 mmHg. El perfundido se burbujeó con una mezcla de gas de 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 y la tasa de burbujeo se ajustó para mantener el pH fisiológico (7,35-7,45). La temperatura del perfundido se mantuvo a 38 °C mediante una camisa de agua circulante que rodea a los depósitos de tampón. El corazón también se mantuvo a 38 °C mediante una carcasa recubierta con una camisa de agua en la que se suspendió. La parte superior abierta de la camisa se cubrió con un trozo de Parafilm para mantener la humedad y la temperatura. La arteria pulmonar alrededor del lado derecho de la raíz de la aorta se canuló para la recogida de efluente coronario y para la medición de la velocidad de flujo coronario con una probeta graduada. Un globo de látex lleno de solución salina, conectado a través de un catéter a un transductor de presión, se insertó en el ventrículo izquierdo y se infló para producir una presión diastólica final de 0-5 mmHg. El transductor de presión se conectó a un registrador gráfico Grass (Modelo 7) para registrar la presión ventricular izquierda y su primera derivada (dp/dt), y la frecuencia

cardíaca. Los corazones con presión de desarrollo ventricular izquierdo inferior a 85 mmHg al final del período de equilibrio de 15 min no se incluyeron en el estudio.

Mediciones de la función cardíaca

5 Los índices de función cardíaca medidos fueron LVDP (presión desarrollada del ventrículo izquierdo), dp/dt_{max} (el valor máximo de la primera derivada de la LVDP), la frecuencia cardíaca y el flujo coronario. El protocolo experimental se muestra en la Figura 13. Después de un equilibrio de 15 minutos, los corazones fueron tratados con cilostazol durante 5 min, seguido de 5 min de cilostazol y dipiridamol. Después de 10 minutos de perfusión libre de fármacos, los corazones fueron tratados durante 5 min con dipiridamol. Las mediciones para la función cardíaca se tomaron al final de cada 5 min del tratamiento con fármacos. El efecto del tratamiento con fármaco se expresa como el cambio porcentual de los valores antes y después de cada tratamiento farmacológico:

$$\% \text{ de cambio desde el basal} = [(\text{Valor después del fármaco} - \text{Valor antes del fármaco}) \times 100]$$

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm EEM. Se utilizó una prueba *t* para detectar la significación ($p < 0,05$) (Sigma Stat 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA)

Dipiridamol contrarresta los aumentos en la contractilidad cardíaca y el ritmo cardíaco inducidos por cilostazol

Los estudios anteriores revelaron que cilostazol tiene efectos mínimos sobre la función cardíaca en concentraciones por debajo de 1 μM . También se ha demostrado que dipiridamol es un inhibidor de la recaptación de adenosina muy potente y eficaz en concentraciones de 0,3 a 1 μM . Por lo tanto, estos experimentos se realizaron con concentraciones de cilostazol de 1, 3 y 10 μM y concentraciones de dipiridamol de 0,3, 1 y 3 μM .

Tal y como se esperaba, dipiridamol a 0,3, 1 o 3 μM solo no tuvo ningún efecto significativo sobre la función cardíaca. Sin embargo, cilostazol a 3 o 10 μM aumentó significativamente la contractilidad cardíaca, la frecuencia cardíaca y el flujo coronario. Dipiridamol a 0,3, 1 o 3 μM redujo significativamente el aumento inducido por cilostazol de la contractilidad cardíaca (Figura 14A) y la frecuencia cardíaca (Figura 14B). Dipiridamol a 1 y 3 μM también aumentó el flujo coronario inducido por cilostazol (10 μM) (Figura 14C). En conclusión, este estudio sugiere que dipiridamol puede contrarrestar los posibles efectos perjudiciales de cilostazol sobre la función cardíaca.

Ejemplo 7

La combinación de bajos niveles de cilostazol y dipiridamol aumenta el flujo sanguíneo en el músculo gastrocnemio durante el ejercicio y mejora la recuperación del flujo sanguíneo después de la isquemia

Este ejemplo demuestra que la administración de una combinación de cilostazol y dipiridamol aumenta el suministro de sangre al músculo esquelético ejercido y mejora la recuperación del flujo después de un período de isquemia *in vivo*. Las patas traseras de los conejos fueron preparadas para la infusión del fármaco, la estimulación de las extremidades para ejercicio mímico y la medición del flujo sanguíneo tal como se describe a continuación.

Preparaciones quirúrgicas

Conejos macho (Nueva Zelanda Blanco), con un peso 2-2,5 kg, fueron anestesiados con pentobarbital intravenoso (30 mg/kg) a través de una vena marginal de la oreja. Se realizó una traqueotomía y los animales fueron intubados. La ventilación era con aire ambiente, complementado con 100 % de O_2 a través de un ventilador de animales pequeños Harvard. La temperatura corporal se mantuvo a aproximadamente 38 °C con una manta eléctrica. La vena yugular se canuló para anestesia adicional y la administración del fármaco. Un transductor de presión Miller (Miller Instruments, Houston) con el lumen (4F) se insertó en la arteria carótida izquierda y se avanzó hasta el ventrículo izquierdo para la medición de la presión ventricular izquierda (LVP) y la infusión de microesferas fluorescentes. La arteria carótida derecha se canuló para la medición de la presión arterial. Las arterias femorales de ambas patas traseras fueron expuestas a través de una incisión longitudinal en la piel en el muslo medio que se extendía desde el ligamento inguinal hasta a la babilla. La oclusión arterial se realizó con un pinzado de la arteria y la reperfusión se realizó mediante la retirada de la pinza. Para estimular la contracción muscular, se colocaron un par de electrodos sobre el nervio ciático de la extremidad posterior izquierda y se conectaron a un estimulador Grass SD9. La estimulación se produjo con un pulso cuadrado de 8 ms de 10 V supramáximo a 1 Hz. Los miembros posteriores se colocaron a 90 ° respecto al muslo. El miembro posterior contralateral sirvió como control y no fue estimulado.

Determinación del flujo sanguíneo regional

El flujo sanguíneo se midió utilizando microesferas fluorescentes de acuerdo con el "Manual para el uso de microesferas fluorescentes para medir la perfusión de órganos" (Centro de Recursos de microesferas fluorescentes, Universidad de Washington, Seattle, WA). Se adquirieron en Molecular Probes (Eugene, OR) microesferas de

poliestireno fluorescentes marcadas (15 μm de diámetro) de color azul-verde, amarillo-verde, naranja, rojo y carmesí. Se inyectaron medio millón por kg de peso corporal de cada microesfera de color en el ventrículo izquierdo a través del catéter durante 20 segundos. Al mismo tiempo, se extrajo una muestra de sangre de la arteria carótida derecha a 2,5 ml/min durante 2 min, comenzando 30 segundos antes de la inyección de las microesferas. Al final, el conejo se sacrificó con una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Se extrajeron muestras de tejido (aproximadamente 1 g cada pieza) de la pared ventricular izquierda libre, el riñón y el músculo gastrocnemio de ambos miembros posteriores. Las muestras se pesaron, se colocaron en tubos y se procesaron para la digestión y fluorimetría. La fluorescencia se midió con un espectrofluorómetro (Fluomax-2, Instruments SA, Inc, Edison, Nueva Jersey). El flujo sanguíneo regional se calculó mediante la técnica de flujo de referencia estándar y se expresó como ml/min/100 g.

Protocolos experimentales

El transcurso temporal del experimento se muestra en la Figura 15. Sesenta minutos después de la preparación quirúrgica, los animales fueron divididos en cuatro grupos y recibieron vehículo (control) o una combinación de cilostazol (0,225 mg/kg en bolo seguido de 0,0175 mg/kg/min por vía intravenosa) y dipiridamol (20 μg /kg/min por vía intravenosa) (Cil+Dip). El protocolo de infusión del fármaco se determinó previamente y produjo concentraciones en sangre de aproximadamente cilostazol 1 μM y aproximadamente dipiridamol 1 μM . Sesenta minutos después de la cirugía, se inició la inyección de vehículo o la combinación de fármacos. Después de 20 minutos, el músculo gastrocnemio de la extremidad posterior izquierda fue estimulado durante el resto del experimento. Veinte minutos después de la estimulación (punto de tiempo de 40 minutos en la Figura 15), la arteria femoral izquierda se pinzó durante 20 minutos para inducir isquemia y luego se liberó para permitir la reperfusión. El flujo sanguíneo regional se determinó mediante la inyección a los 0, 20, 40, 60 y 80 minutos de microesferas fluorescentes azules-verde, amarillo-verde, naranja, rojo y carmesí.

Estadística

Los datos se presentan como media \pm EEM. Se tomó $p < 0,05$ como nivel de significación estadística (Sigma Stat 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA (análisis de varianzas) de dos vías (grupo y tiempo como varianzas) con mediciones repetidas seguido de una prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls.

La combinación de bajos niveles de cilostazol y dipiridamol aumenta el flujo sanguíneo en el músculo ejercitado y mejora la recuperación del flujo después de la isquemia

La administración de una combinación de cilostazol y dipiridamol no alteró significativamente el flujo sanguíneo del músculo gastrocnemio en reposo. Mientras que la estimulación aumentó significativamente el flujo de sangre en el músculo gastrocnemio en ambos grupos, el flujo sanguíneo en el músculo tratado con la combinación de fármacos fue significativamente mayor en comparación con el observado en el músculo tratado con vehículo (desde 35 ± 7 ml/min/100 g en el músculo tratado con vehículo hasta 56 ± 11 ml/min/100 g en el músculo tratado con la combinación de fármacos, $p < 0,05$) (Figura 16). El músculo tratado con la combinación de fármacos también tenía un flujo de sangre significativamente mayor después de una ligadura completa de la arteria femoral izquierda durante 20 minutos (51 ± 9 ml/min/100 g frente a 29 ± 6 ml/min/100 g en el músculo tratado con vehículo, $p < 0,05$). Los resultados sugieren que la combinación de cilostazol y dipiridamol aumenta el suministro de sangre al músculo esquelético ejercitado y mejora la recuperación del flujo después de un periodo de isquemia.

Los ejemplos anteriores demuestran que un inhibidor de la recaptación de adenosina puede reducir los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos de un inhibidor de la FDE3. Además, los ejemplos demuestran que la combinación del IMFDE con un inhibidor de la recaptación de adenosina tiene como resultado la reducción sinérgica de la agregación plaquetaria y, por lo tanto, se puede utilizar en concentraciones más bajas que con cualquier agente solo, sin afectar negativamente a la contractilidad cardíaca. Los ejemplos también demuestran que no se espera que una combinación de bajos niveles de un IMFDE y un inhibidor de la recaptación de adenosina, que si se utiliza solo no se espera que aumente el flujo sanguíneo muscular, aumente significativamente el flujo sanguíneo en el músculo ejercitado y mejore la recuperación del flujo sanguíneo después de un periodo de isquemia. Por ejemplo, una combinación de cilostazol, a una concentración sanguínea que varía de 0,3 a 10 μM y dipiridamol, a una concentración sanguínea que varía de 0,1 a 10 μM , produce un perfil óptimo de agregación plaquetaria y efectos secundarios cardíacos insignificantes. Así, la combinación de al menos un IMFDE y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina, tales como cilostazol y dipiridamol, pueden proporcionar una terapia para trastornos, tales como la CI y el ictus, con una eficacia mejorada, pero con menos efectos secundarios cardíacos.

La memoria descriptiva se entiende más a fondo a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas dentro de la memoria descriptiva. Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de realizaciones de la invención y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención. El experto en la técnica reconocerá que muchas otras formas de realización están abarcadas por la invención reivindicada y que se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren sólo a modo de ejemplo.

Lista de referencias

- 5 Cone J, Wang S, Tandon N, Fong M, Sun B, Sakurai K, Yoshitake M, Kambayashi J, and Liu Y (1999) Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:497-504.
- Dobson JGJ and Fenton RA (1998) Cardiac physiology of adenosine, in *Cardiovascular Biology of Purines* (Burnstock G, Dobson JGJ, Liang BT, and Linden J eds) pp 21-39, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- 10 Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, and Liu Y (1994) Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase C, in *Cellular, Biochemical, and Molecular Aspects of Reperfusion Injury* (Das DK ed) pp 82-98, Ann N Y Acad Sci. Vol 723., New York.
- George EE, Romano FD, and Dobson JG, Jr. (1991) Adenosine and acetylcholine reduce isoproterenol-induced protein phosphorylation of rat myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 23:749-764.
- 15 Gotoh F, Tohgi H, Hirai S, Terashi A, Fukuuchi Y, Otomo E, Shinohara Y, Itoh E, Matsuda T, Sawada T, Yamaguchi T, Nishimaru K, and Ohashi Y (2000) Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J.Stroke and Cerebrovasc.Dis.* 9:147-157.
- Huttemann E, Ukena D, Lenschow V, and Schwabe U (1984) Adenosine receptors in human platelets. Characterization by 5'-N-ethylcarboxamido[3H]adenosine binding in relation to adenylate cyclase activity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol* 325:226-233.
- 20 Igawa T, Tani T, Chijiwa T, Shiragiku T, Shimidzu S, Kawamura K, Kato S, Unemi F, and Kimura Y (1990) Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thromb.Res* 57:617-623.
- Laghi PF, Capecchi PL, Acciavatti A, Petri S, de Lalla A, Cati G, Colafati M, and Di Perri T (1997) Pharmacological preconditioning of ischaemia. *Clin Hemorheol.Microcirc.* 17:73-84.
- 25 Liu Y, Fong M, Cone J, Wang S, Yoshitake M, and Kambayashi J (2000) Inhibition of adenosine uptake and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 36:351-360.
- Matsumoto Y, Marukawa K, Okumura H, Adachi T, Tani T, and Kimura Y (1999) Comparative study of antiplatelet drugs in vitro: distinct effects of cAMP-elevating drugs and GPIIb/IIIa antagonists on thrombin-induced platelet responses. *Thromb.Res* 95:19-29.
- 30 Narayan P, Mentzer RM, Jr., and Lasley RD (2000) Phosphatase inhibitor cantharidin blocks adenosine A(1) receptor anti-adrenergic effect in rat cardiac myocytes. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 278:H1-H7.
- Packer M (1992) Treatment of chronic heart failure. *Lancet* 340:92-95.
- Park SW, Lee CW, Kim HS, Lee HJ, Park HK, Hong MK, Kim JJ, and Park SJ (1999) Comparison of cilostazol versus ticlopidine therapy after stent implantation. *Am.J.Cardiol.* 84:511-514.
- 35 Pasini FL, Capecchi PL, and Perri TD (2000) Adenosine and chronic ischemia of the lower limbs. *Vasc.Med.* 5:243-250.
- Sun, B., Le, S., Fong, M., Guertin, M., Liu, Y., Yoshitake, M., Kambayashi, J., and Tandon, N. Interplay between adenosine and cilostazol in antiplatelet activation. *Thrombosis and Haemostasis Suppl.* 2001.
- 40 Thadani U and Roden DM (1998) FDA Panel report: January 1998. *Circulation* 97:2295-2296.
- Tsuchikane E, Fukuhara A, Kobayashi T, Kirino M, Yamasaki K, Izumi M, Otsuji S, Tateyama H, Sakurai M, and Awata N (1999) Impact of cilostazol on restenosis after percutaneous coronary balloon angioplasty. *Circulation* 100:21-26.
- 45 Wang S, Cone J, Fong M, Yoshitake M, Kambayashi J, and Liu Y (2001) Interplay between inhibition of adenosine uptake and phosphodiesterase type 3 on cardiac function by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:775-783.
- Wang WZ, Anderson G, Maldonado C, and Barker J (1996) Attenuation of vasospasm and capillary no-reflow by ischemic preconditioning in skeletal muscle. *Microsurgery.* 17:324-329.
- Whetzel TP, Stevenson TR, Sharman RB, and Carlsen RC (1997) The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plast.Reconstr.Surg* 100:1767-1775.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende cilostazol y al menos un inhibidor de la recaptación de adenosina, seleccionado de dipiridamol, propentoflina, dilazep, nitrobenclitioinosina, S-(4-nitrobencil)-6-tioguanosina, S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina, yodohidroxi-nitrobenclitioinosina, mioflazina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cilostazol y dipiridamol.
3. Una composición que consiste esencialmente en cilostazol y dipiridamol o sales de los mismos.
4. La composición de las reivindicaciones 2 o 3, en la que la composición tiene una relación de peso cilostazol:dipiridamol de aproximadamente:
- (a) de 1:0,7 a aproximadamente 1:30;
 - (b) de 1:1 a aproximadamente 1:12 o
 - (c) de 1:1,25 a aproximadamente 1:12.
5. Una composición farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables de la misma.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en terapia.
7. La composición para uso en la terapia de la reivindicación 6, en la que la terapia:
- (a) es para el tratamiento de la enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP) o el ictus;
 - (b) induce la vasodilatación y/o el bloqueo de la agregación plaquetaria;
 - (c) es para el tratamiento de la reestenosis coronaria o
 - (d) reduce la proliferación del músculo liso.
8. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en la preparación de un medicamento para:
- (a) el tratamiento de la enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP) o el ictus;
 - (b) inducir la vasodilatación y/o el bloqueo de la agregación plaquetaria;
 - (c) el tratamiento de la reestenosis coronaria o
 - (d) reducir la proliferación del músculo liso.
9. El uso de la reivindicación 8, en la que la composición se administra a aproximadamente:
- (a) de 20 mg/día a aproximadamente 300 mg/día para cilostazol y de aproximadamente 200 mg/día a aproximadamente 600 mg/día para dipiridamol;
 - (b) de 50 mg/día a aproximadamente 200 mg/día para cilostazol y de aproximadamente 200 mg/día a aproximadamente 600 mg/día para dipiridamol;
 - (c) de 50 mg/día a aproximadamente 160 mg/día para cilostazol y de aproximadamente 200 mg/día a aproximadamente 600 mg/día para dipiridamol.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso de acuerdo con la reivindicación 7(a) o para el uso de la reivindicación 8(a), en la que la EOAP es la claudicación intermitente.

Figura 1

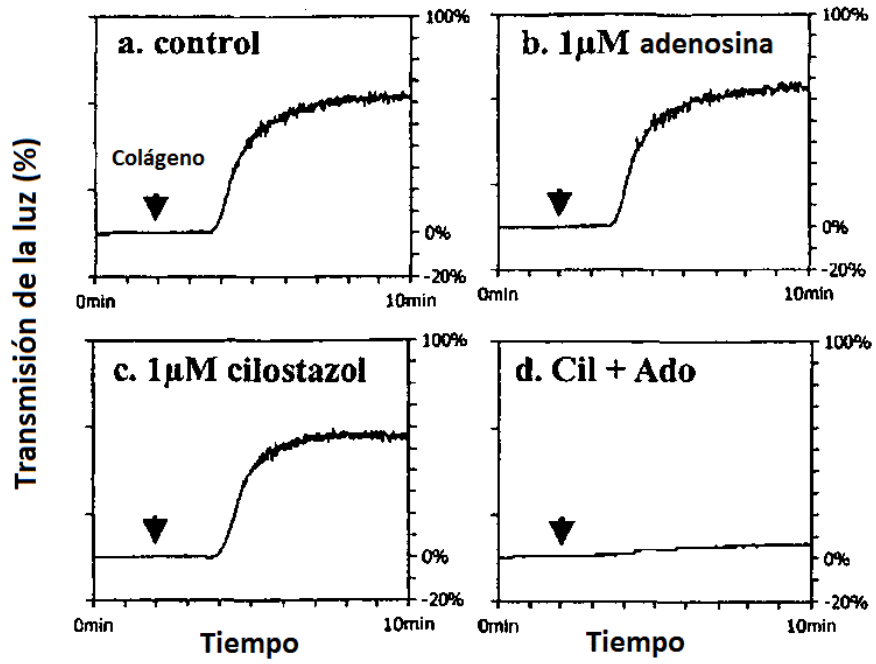


Figura 2

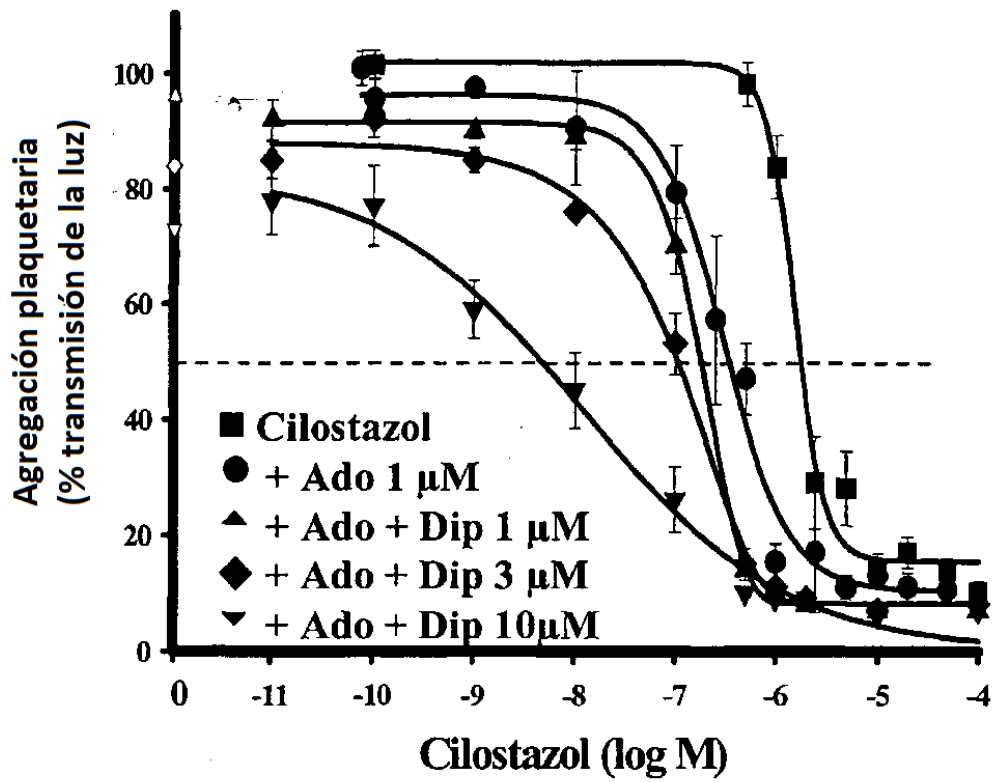


Figura 3

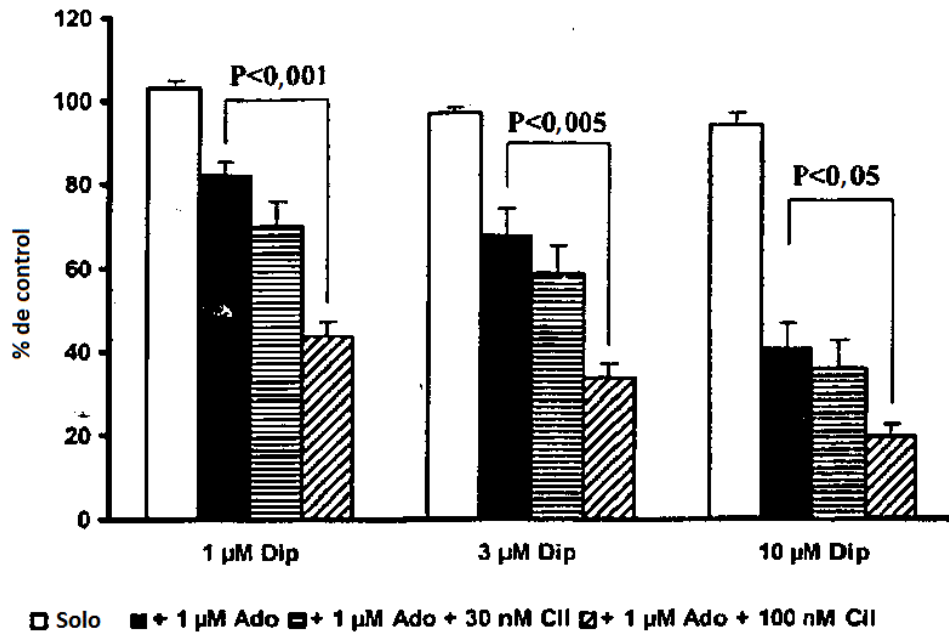


Figura 4

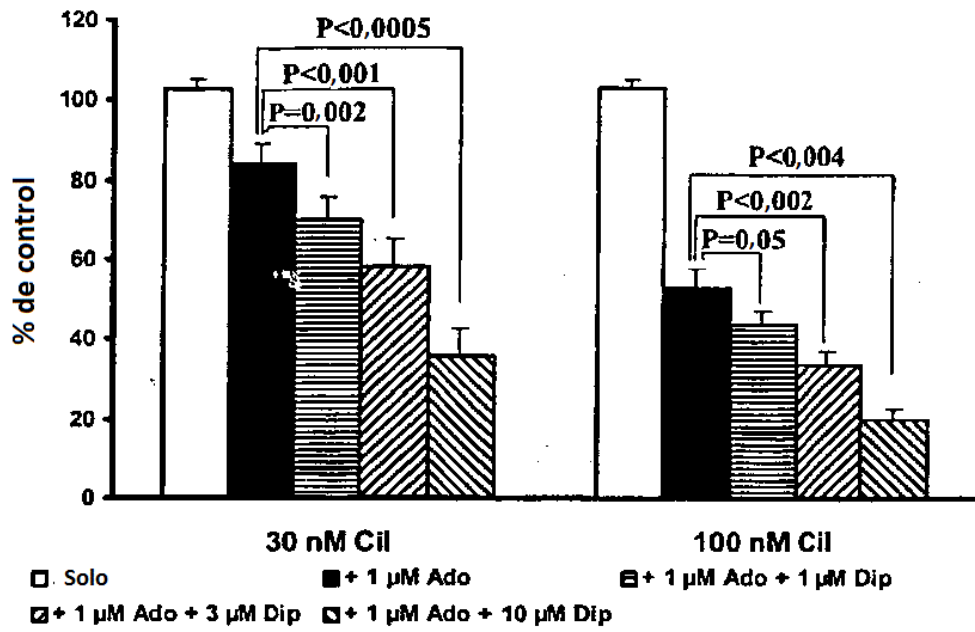


Figura 5

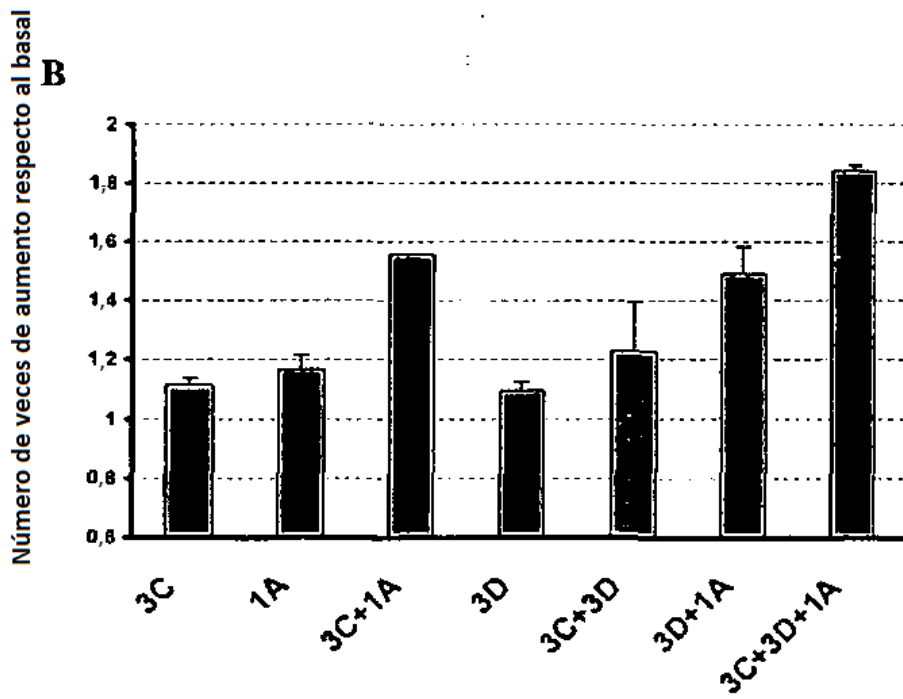
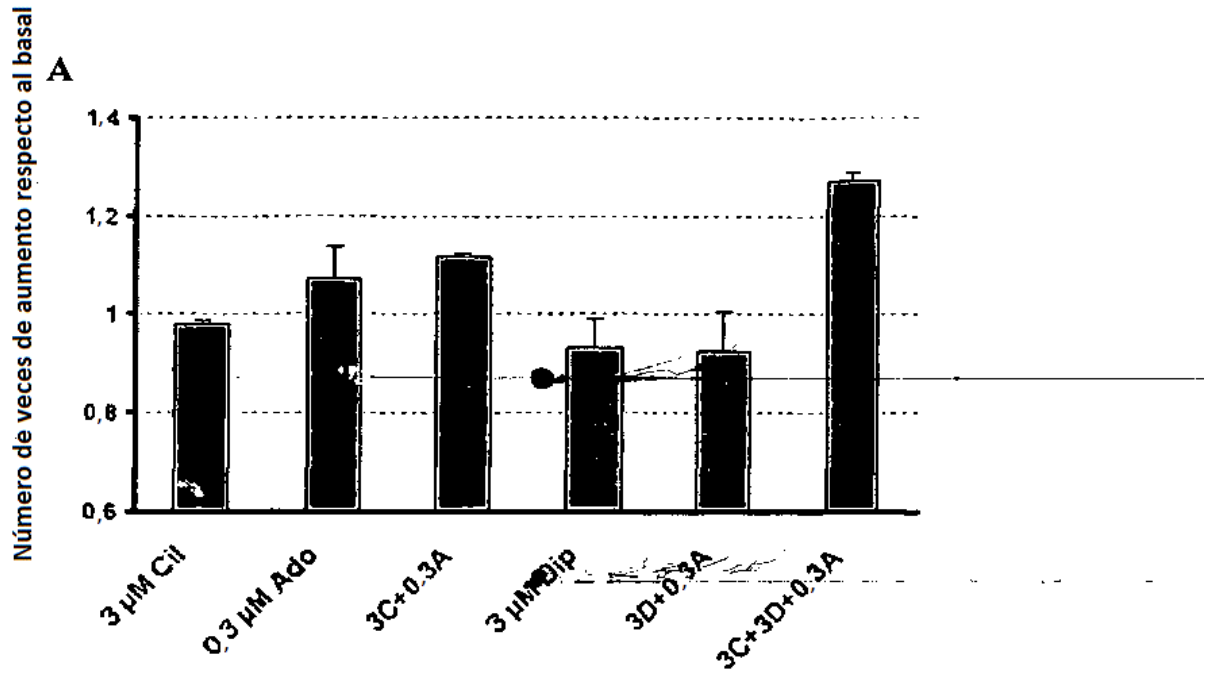


Figura 6

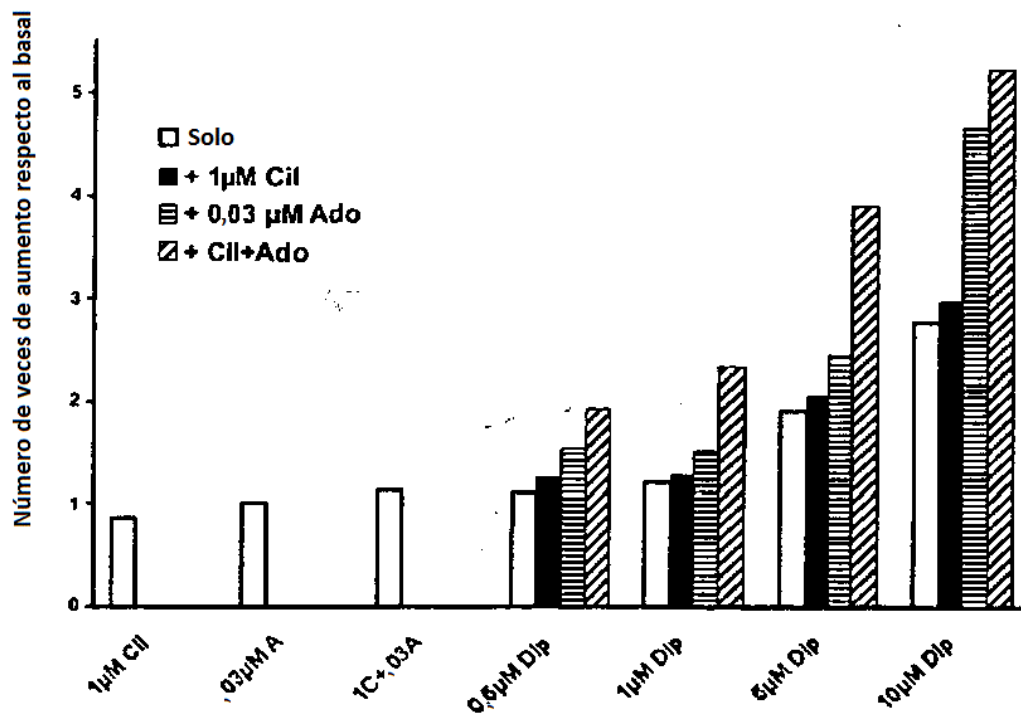


Figura 7

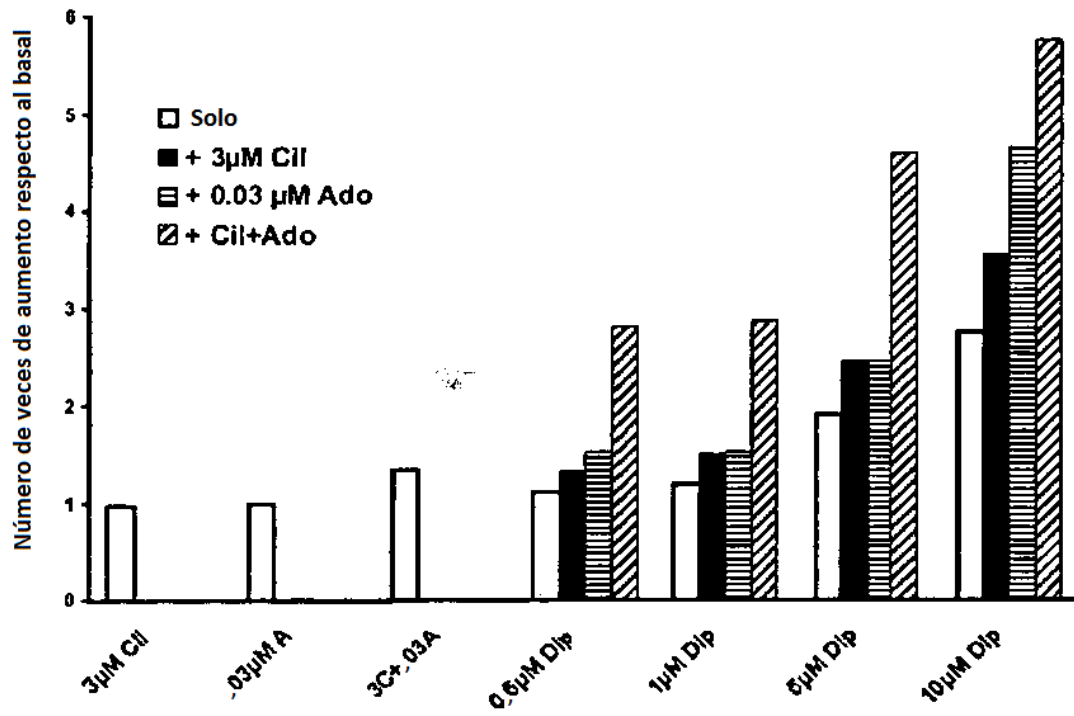


Figura 8

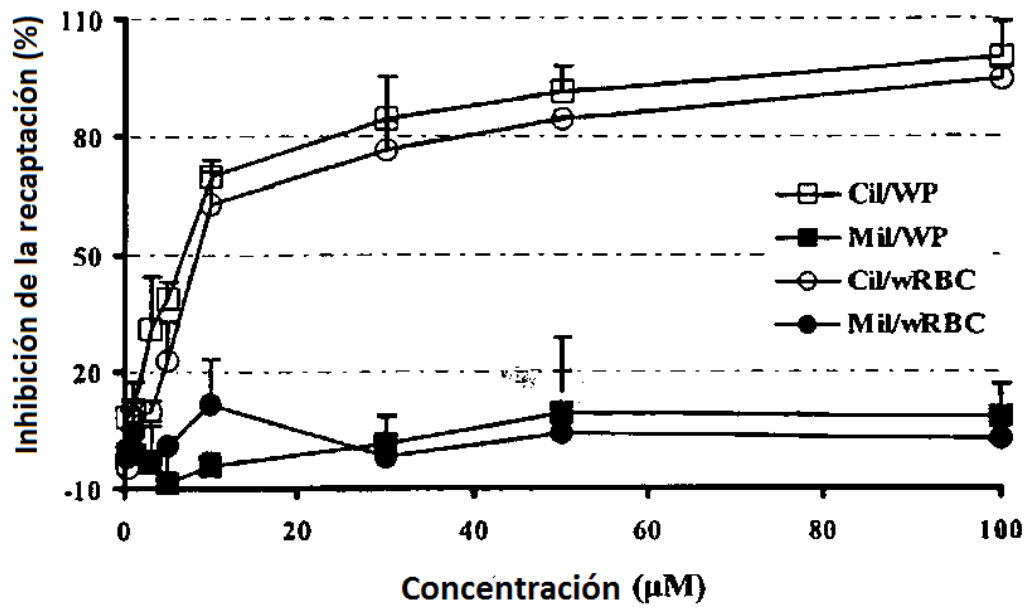


Figura 9

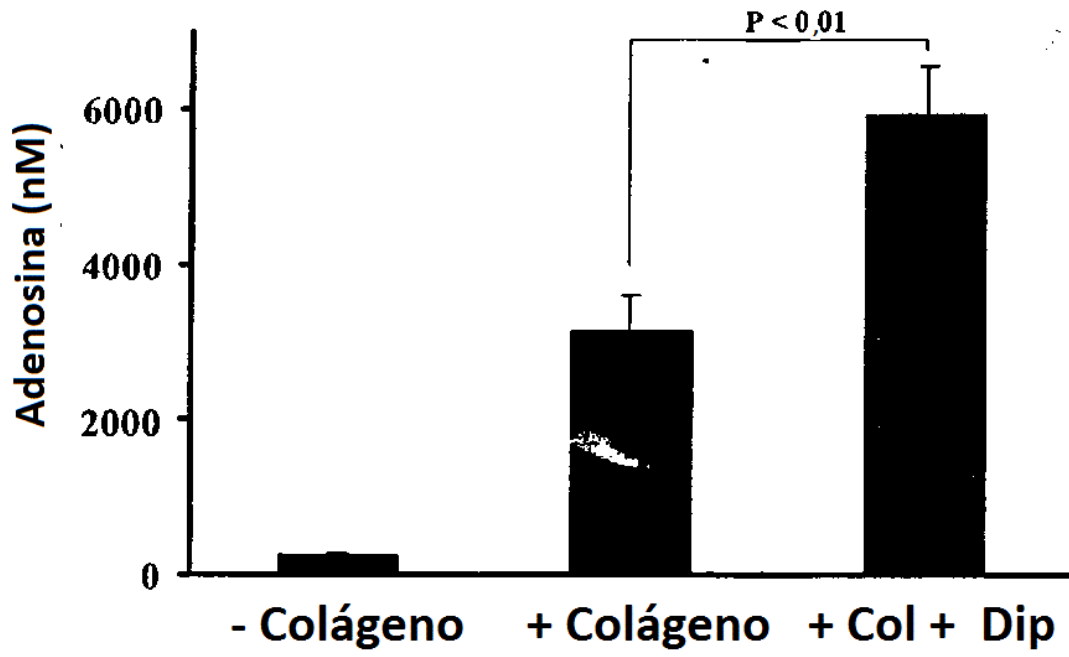
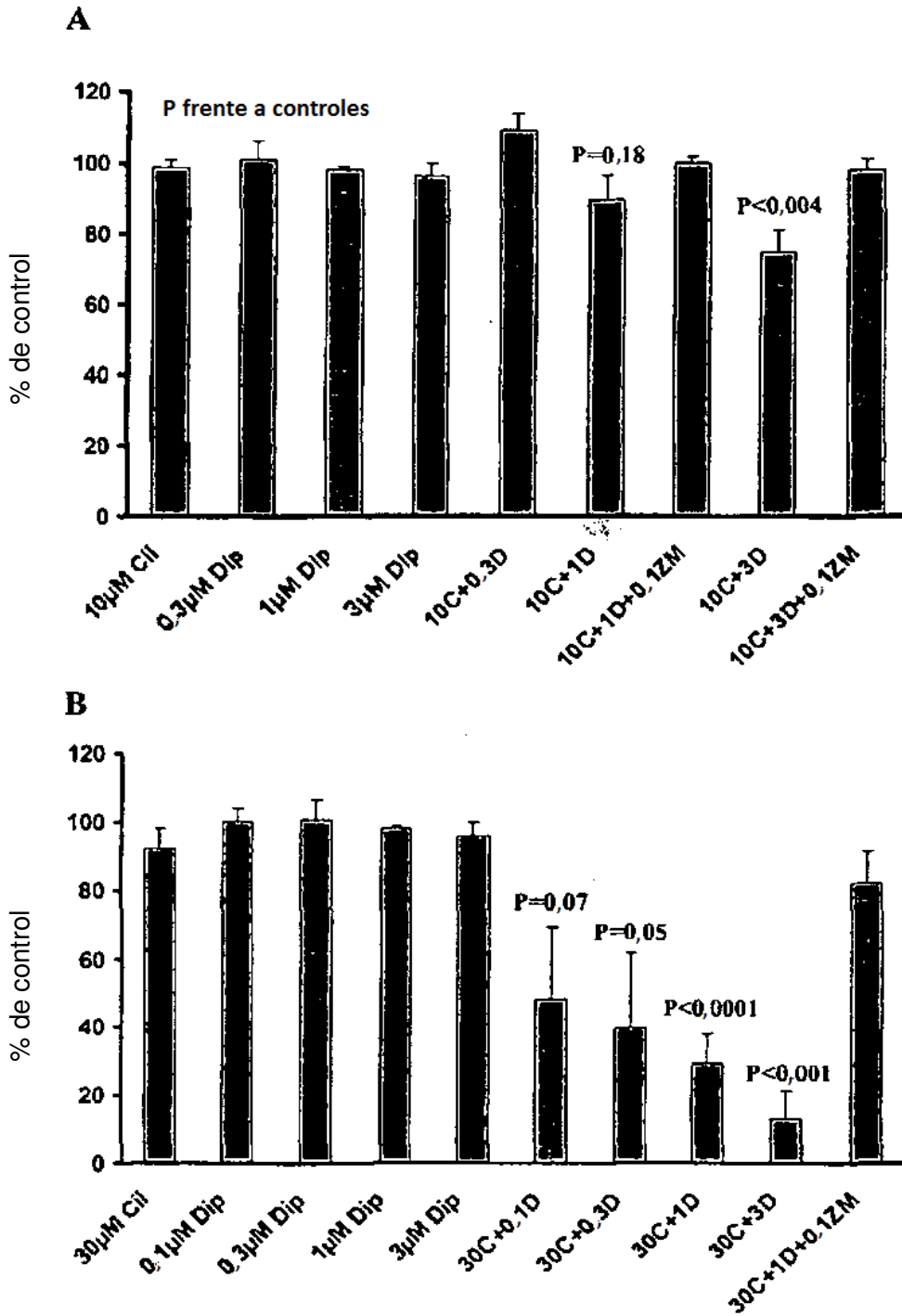


Figura 10



ES 2 525 418 T3

Figura 11

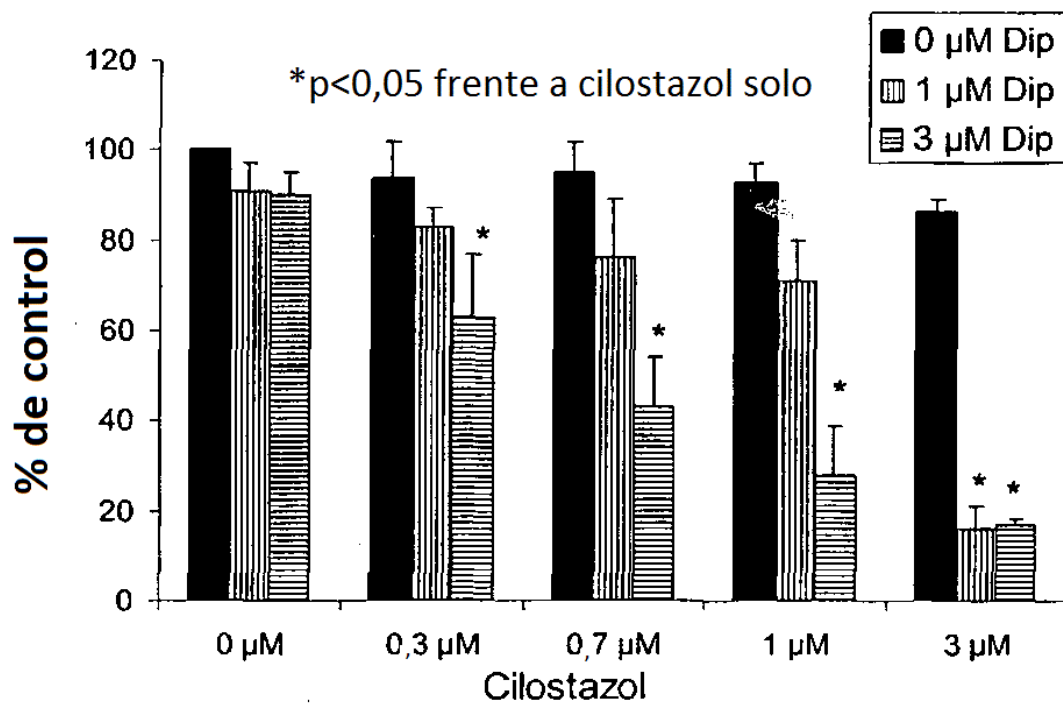


Figura 12

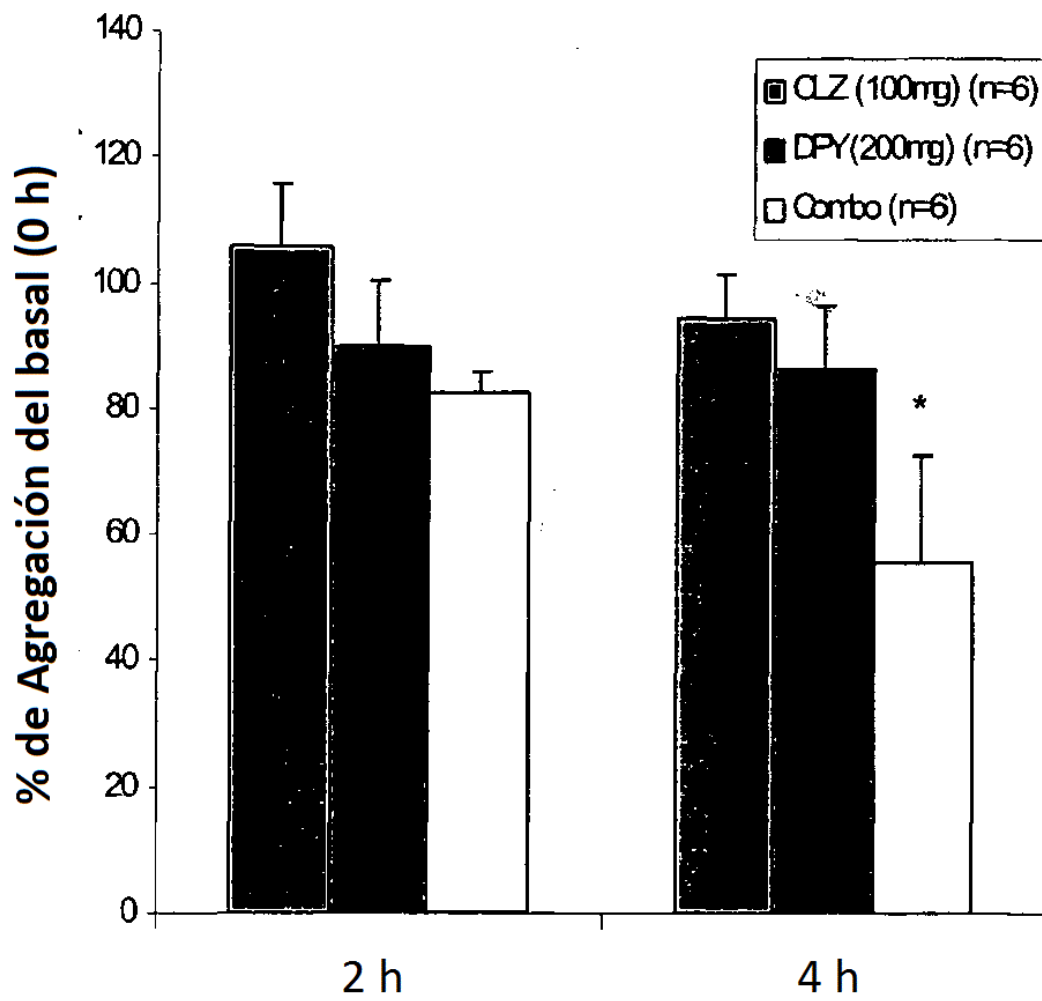


Figura 13

Protocolo de corazón aislado de conejo

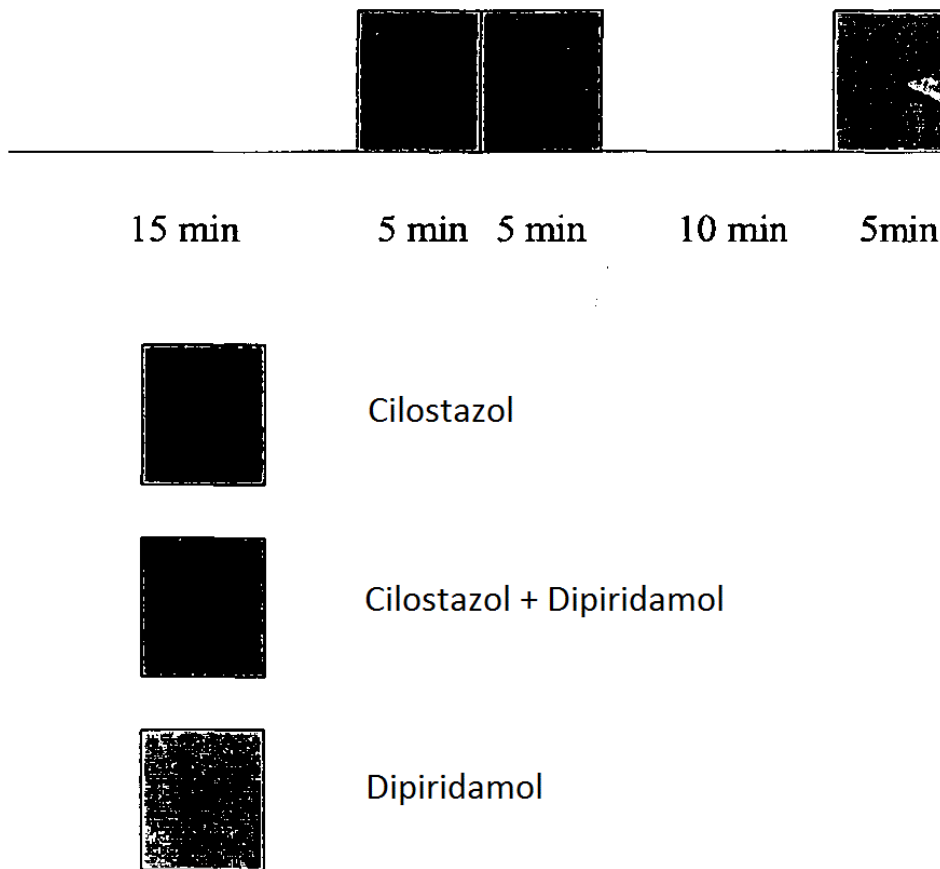


Figura 14

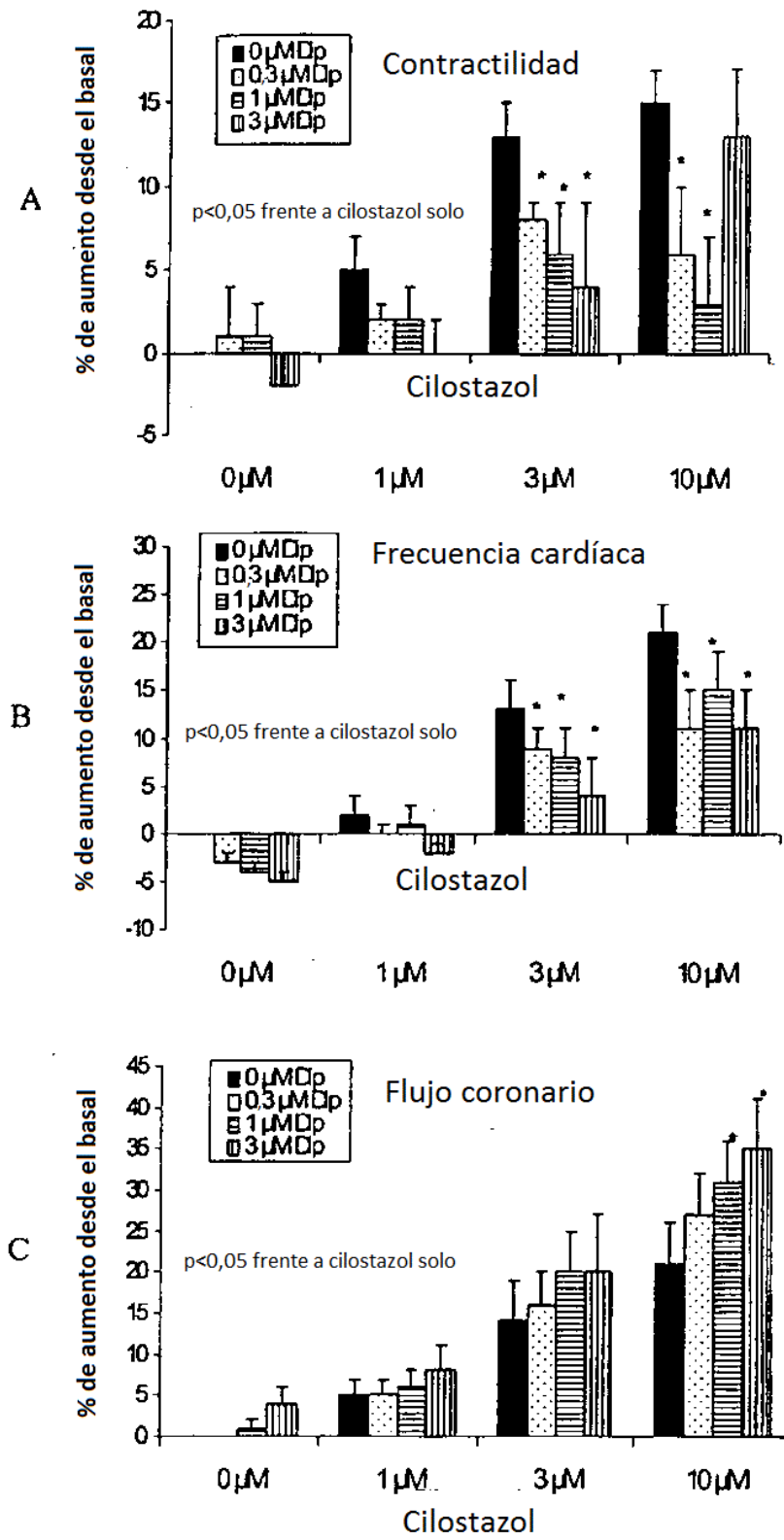
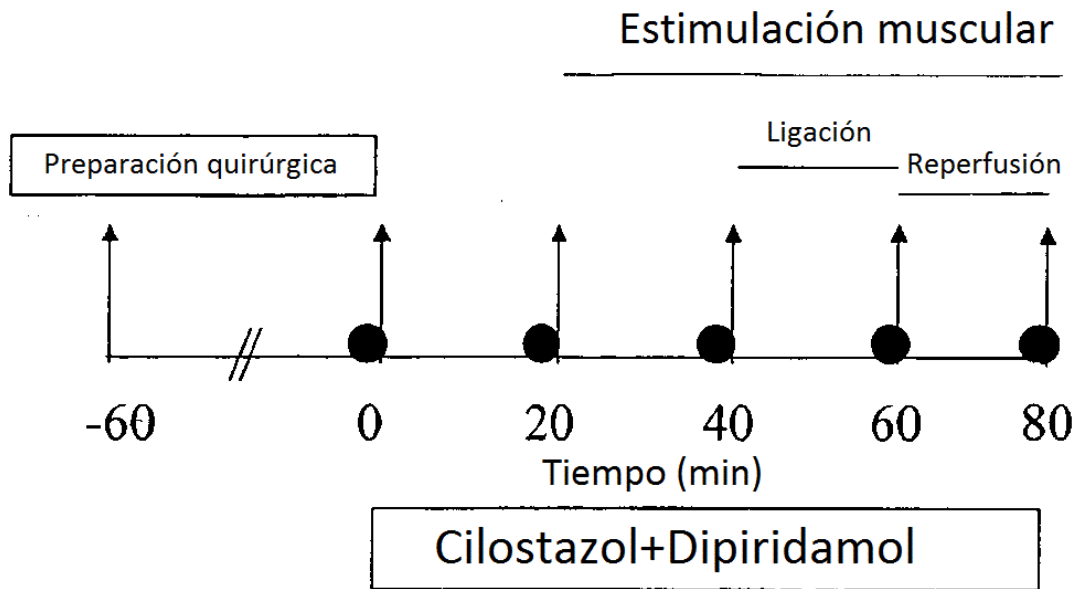


Figura 15



- Determinación del flujo sanguíneo regional mediante microsféricas fluorescentes

Figura 16

