



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 368**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/593 (2006.01)

A23L 1/302 (2006.01)

A23L 1/303 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06076172 .3**

96 Fecha de presentación : **06.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1728507**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

54

Título: **Utilización de vitamina K para revertir la calcificación de los vasos sanguíneos.**

30

Prioridad: **03.06.2005 US 144853**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.08.2011

73

Titular/es: **NATTOPHARMA ASA**
Henrik Ibsen Gate 100
0230 Oslo, NO

72

Inventor/es: **Vermeer, Cees**

74

Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 363 368 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

Utilización de vitamina k para revertir la calcificación de los vasos sanguíneos

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a la utilización de vitamina K para revertir la calcificación de los vasos sanguíneos.

Antecedentes de la invención

10 El proceso de envejecimiento está asociado a cambios fisiológicos irreversibles del sistema circulatorio que conducen a un alto riesgo de trastornos de la presión sanguínea, Enfermedad Coronaria del Corazón (CHD) y derrame cerebral. En las mujeres, este riesgo se eleva dramáticamente tras iniciarse la menopausia. Estas condiciones tienen un impacto significativo sobre la calidad de vida de las personas de mediana edad y ancianos y explican gran parte de las muertes y de las enfermedades crónicas en las sociedades modernas.

15 Con frecuencia a los pacientes que sufren de trastornos cardiovasculares se les prescriben anticoagulantes, agentes antihipertensivos, medicamentos para bajar el colesterol y similares. Estas medicaciones presentan habitualmente efectos secundarios nocivos o riesgos para la salud y, además, los efectos crónicos debidos a la toma de esta medicación regularmente durante años o décadas no han sido bien estudiados. Debido a que la esperanza de vida es cada vez mayor, sería conveniente encontrar terapias naturales a largo plazo, seguras y fiables, para prevenir, tratar o incluso revertir las consecuencias del envejecimiento sobre la vasculatura.

20 Se ha reconocido durante mucho tiempo que la vitamina K es un componente esencial de la dieta. Se identificó primero como elemento necesario para prevenir hemorragias mediante la activación de los factores de coagulación sanguíneos. Los vitámeros K naturales son derivados de menadiona que difieren entre sí en la cadena lateral poliisoprenoide unida en la posición 3 de la estructura del anillo. La vitamina K puede ser suministrada a la dieta con verduras de hoja verde oscuro (K₁ o filoquinona) y alimentos fermentados, tales como queso y cuajada (K₂ o menaquinona). Las vitaminas K₂ son sintetizadas también en el intestino delgado por bacterias simbióticas residentes. La vitamina K es necesaria también para la carboxilación de dos proteínas de la matriz ósea necesarias para el metabolismo óseo normal.

25 En la EP-A-0 679 394 y también en Jpn. J. Pharmacol (1997) 75:135-143, se describe que un alto consumo alimenticio de vitamina K y de moléculas relacionadas puede reducir además la calcificación arterial, pero no revertirla, de lo cual se concluye que la arteriosclerosis se puede tratar mediante la vitamina K. La arteriosclerosis es una enfermedad de las arterias caracterizada por la inflamación, invasión de macrófagos, formación de células espumosas, espesamiento de la íntima, aumento del colesterol y formación de placas ateroscleróticas, que, con el tiempo, puede calcificarse. El inicio de la aterosclerosis se produce invariablemente en las grandes arterias, tales como la aorta y arterias coronarias. En grado más avanzado, se puede observar una ruptura de placas que conduce a la oclusión vascular súbita, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (infarto cerebral).

35 Un proceso completamente diferente es el del endurecimiento vascular debido a la pérdida de elasticidad de las arterias. El endurecimiento vascular se asocia con el envejecimiento, la diabetes mellitus y la disfunción renal; es el resultado de la degradación de las láminas elásticas en la túnica media, que produce una pérdida de elasticidad. Generalmente el inicio del endurecimiento vascular se observa en los vasos más pequeños, pero se extiende a las arterias más grandes. Esto conduce a un aumento de la presión sanguínea, a un ensanchamiento vascular y, en etapas posteriores, a la ruptura de las arterias (principalmente las pequeñas) y capilares.

40 La WO 2004/019923 describe que la vitamina K es eficaz para contrarrestar la reducción de la elasticidad arterial normalmente asociada al envejecimiento.

Ciertos estudios han demostrado que, también a nivel molecular, el endurecimiento de las arterias relacionado con la edad se puede distinguir de la calcificación arteriosclerótica/aterosclerótica.

45 Existe una necesidad de composiciones y métodos eficaces para revertir la calcificación de los vasos sanguíneos.

Sumario de la Invención

50 En un aspecto, la presente invención proporciona la utilización de la vitamina K para la preparación de una formulación farmacéutica o nutricional para revertir la calcificación de un vaso sanguíneo en un mamífero que sufre de calcificación de un vaso sanguíneo, cuando se administra al mamífero una cantidad efectiva de dicha vitamina K para revertir la calcificación de un vaso sanguíneo.

55 Se ha descubierto específicamente que un alto consumo de vitamina K puede conducir a la eliminación de precipitados calcificados en los vasos sanguíneos que se han visto ya afectados por una calcificación preexistente. Se trata de un descubrimiento nuevo e impactante de gran importancia para pacientes con enfermedad arterial declarada. Las implicaciones para la industria de la alimentación son que se pueden desarrollar alimentos enriquecidos con vitamina K y suplementos alimenticios.

La calcificación de un vaso sanguíneo está asociada a una enfermedad seleccionada de entre el grupo consistente en arteriosclerosis, incluida la esclerosis de Mönckeberg, osteoartritis, calcificación inducida por inflamación, incluyendo la enfermedad de Bechterev, calcificación inducida por tumores, calcificación de la piel, incluyendo Pseudoxantoma elástico (PXE) y calcifilaxis en la enfermedad renal terminal.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición para promover la salud arterial que comprende vitamina K o un derivado de la misma, y opcionalmente vitamina D o un derivado de la misma, así como uno o varios componentes adicionales seleccionados de entre polifenoles, vitamina C, vitamina E (tocoferoles y/o tocotrienoles), L-arginina, fitoesteroles, péptidos antihipertensivos, fibras solubles (por ejemplo goma guar, pectina), ácidos grasos omega-3, omega-6 y/u omega-9, carnitina, taurina, coenzima Q10, creatina, ácido fólico, folatos, magnesio, potasio, vitamina B6 y vitamina B12.

10 En todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende vitamina K o un derivado de la misma, y opcionalmente vitamina D o un derivado de la misma, así como un medicamento, para su administración simultánea, separada o secuencial, donde dicho medicamento se selecciona del grupo consistente en anticoagulantes, antitrombóticos, fibrinolíticos, antihipertensivos, diuréticos, antianginales, agentes hipolipidémicos, beta bloqueantes, inhibidores de ACE, glucósidos cardíacos, inhibidores de la fosfodiesterasa, antiarrítmicos y antagonistas del calcio.

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para revertir la calcificación de un vaso sanguíneo en un humano, que comprende aproximadamente de 50 microgramos a 50 miligramos de vitamina K.

20 Se enuncian características y ventajas adicionales de varias realizaciones en parte en la descripción que sigue, y en parte se evidenciarán a partir de la descripción, o se pueden aprender a través de la práctica de varias realizaciones. Los objetivos y otras ventajas de las realizaciones se llevarán a cabo y alcanzarán por medio de los elementos y combinaciones particularmente señaladas en la descripción y reivindicaciones adjuntas.

Breve Descripción de las Figuras

25 Figura 1: muestra cómo el Coeficiente de Distensibilidad (CD) varía durante un período de estudio de 3 años cuando se administran placebo, vitamina D (MD) y vitaminas K más D (MDK) a un grupo de mujeres postmenopáusicas.

Figura 2: muestra cómo el Coeficiente de Elasticidad (CC) varía durante un período de estudio de 3 años cuando se administran placebo, vitamina D (MD) y vitaminas K más D (MDK) a un grupo de mujeres postmenopáusicas.

30 En cada caso, la barra negra representa la medición de la línea base (100%) y las barras sombreadas representan el cambio porcentual en relación con la línea base después de 3 años.

Figura 3: gráfico que muestra los datos de 18 ratas en una dieta de control (que contiene 5 µg/g de vitamina K). Se mataron 6 ratas en la línea base, seis después de 6 semanas y seis después de 12 semanas. Aparte del calcio celular, no se observó ningún incremento de calcio durante el período de prueba.

35 Figura 4: gráfico que muestra los resultados obtenidos cuando las ratas recibieron un tratamiento de 6 semanas con warfarina como antagonista de la vitamina K (indicado como "baja K") en un protocolo que no influye en la coagulación sanguínea, sino que afecta principalmente al estado óseo y vascular de la vitamina K. Se mataron seis ratas después de 6 semanas de tratamiento y seis más después de un tratamiento de 12 semanas. Como se muestra, había un incremento constante de calcio en la pared arterial.

40 Figura 5: gráfico que muestra los resultados obtenidos después de haber tratado ratas con warfarina durante seis semanas y posteriormente ser alimentadas con una dieta estándar que contenía 5 µg de vitamina K por gramo de comida (indicado como "K normal"). La calcificación no se interrumpió con la utilización de la dieta normal.

45 Figura 6: gráfico que muestra los resultados obtenidos después de haber tratado ratas con warfarina durante seis semanas y posteriormente ser alimentadas durante seis semanas más con una dieta con mucha vitamina K. Un grupo recibió una dieta que contenía 100 µg/g de vitamina K1, el otro grupo recibió una dieta que contenía 100 µg/g de vitamina K2 (menaquinona-4). Estas dosificaciones representan aproximadamente 20 veces el consumo normal de vitamina K para ratas. El descubrimiento más sorprendente fue que los cristales preformados de calcio se habían disuelto ampliamente, tal como lo indica la disminución en la calcificación aórtica.

Descripción Detallada de la Invención

55 Con el propósito de esta especificación y reivindicaciones adjuntas, salvo indicado de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción y demás valores numéricos utilizados en la especificación y reivindicaciones deben entenderse como siendo modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, salvo indicado en contra, los parámetros numéricos enunciados en la especificación siguiente y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que la presente invención trata de obtener. Como mínimo, y no en un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico

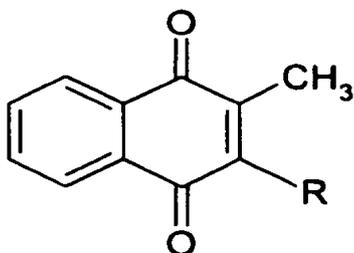
debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos reportados y mediante la aplicación de las técnicas habituales de redondeo.

A pesar de que los rangos y parámetros numéricos enunciados en el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se indican de la forma más precisa posible. Un valor numérico cualquiera, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores que resultan forzosamente de la desviación estándar encontrada en las mediciones de prueba respectivas. Además, se debe entender que todos los rangos aquí descritos abarcan la totalidad y uno cualquiera de los subrangos incluidos. Por ejemplo, un rango del "1 al 10" incluye la totalidad y uno cualquiera de los subrangos entre (e incluyendo) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10, es decir, la totalidad y uno cualquiera de los subrangos con un valor mínimo de igual o superior a 1 y un valor máximo de igual o inferior a 10, por ejemplo, 5,5 a 10.

Se ha de observar que, tal como se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" y "el" incluyen los referentes plurales salvo que se limiten expresa y inequívocamente a un referente. Así, por ejemplo, la referencia a "un monómero" incluye dos o más monómeros.

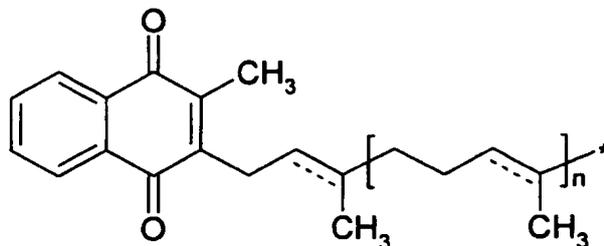
A continuación se hace referencia detalladamente a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos son ilustrados en las figuras adjuntas. Aunque la invención se describe junto con las realizaciones ilustradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a aquellas realizaciones. Al contrario, la invención pretende abarcar todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que pueden estar incluidas en la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Preferentemente, "vitamina K y sus derivados" se refiere a uno o más compuestos de Fórmula 1', y/o sus sales farmacéutica o nutricionalmente aceptables,



Formula 1'

donde R puede ser un grupo orgánico cualquiera enlazado covalentemente que incluye residuos poliisoprenoide, éster, éter, aducto de tiol, etc., y especialmente compuestos del mismo de Fórmula 2:



Formula 2

donde n es un número entero de 1 a 12; y donde las líneas discontinuas indican la presencia opcional de un doble enlace.

La vitamina K y sus derivados, tal como se utilizan aquí, se refieren en particular a filoquinona (también conocida como vitamina K₁), dihidrofiloquinona; menaquinona-4 (MK-4) y menaquinonas de cadena larga. Es generalmente aceptado que la naftoquinona es el grupo funcional, de modo que el mecanismo de acción es similar para todas las vitaminas K. Sin embargo, se pueden esperar diferencias con respecto a la absorción intestinal, transporte, distribución en tejidos y biodisponibilidad. Para su utilización en la presente invención, son preferentes la filoquinona y la MK-4, y en particular filoquinona.

Las fuentes de vitamina K que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen: filoquinona procedente de fuentes naturales tales como extractos vegetales, grasas y aceites; filoquinona sintética, vitamina K₃ sintética (menadiona), distintas formas de vitamina K₂: MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10, MK-11, MK-12 y MK-13 sintéticas, natto (alimento preparado a partir de soja fermentada, rico en MK-7) y otros alimentos fermentados o productos lácteos.

Se pueden fabricar productos nutricionales enriquecidos con vitamina K para proporcionar los requisitos diarios de vitamina K. Por ejemplo, se puede añadir vitamina K a los productos alimenticios, por ejemplo, sustitutos de comidas, helados, salsas, aliños, pastas, barras, dulces, snacks, cereales, bebidas, etc., mediante los métodos descritos en la EP 1 153 548. Asimismo, se puede utilizar la vitamina K en suplementos nutricionales tales como multivitaminas, tabletas, cápsulas y otras formas.

La dosis de vitamina K útil para llevar a cabo la invención no está limitada, pero varía dependiendo, por ejemplo, de la edad del sujeto y del grado de riesgo para desarrollar endurecimiento arterial o del grado de calcificación del vaso sanguíneo. Los actuales valores de AI o de Ingesta Adecuada (según determina el Instituto de Medicina) son de 120 µg para los hombres y 90 µg para las mujeres. Los beneficios pueden derivar de la selección de dosificaciones más altas que los valores AI, particularmente en grupos de población en los que las deficiencias en vitamina K son comunes, por ejemplo entre las mujeres postmenopáusicas. Por ejemplo, las dosificaciones adecuadas pueden situarse en el rango de 10 a 1.000 µg, preferentemente de 50 a 500 µg y especialmente de 100 a 200 µg de vitamina K/día. Cuando la legislación nacional lo permita, puede ser recomendable proporcionar rangos de dosificaciones tan altas como de 1 a 200 mg/día, preferentemente de 5 a 150 mg/día y especialmente de 10 a 100 mg/día.

En diversas realizaciones de la presente invención, el alto consumo de vitamina K indujo la eliminación de depósitos de calcio preexistentes en la pared del vaso sanguíneo. Estas dosificaciones en humanos se situarían entre 50 µg y 2 mg/día.

En términos de peso corporal, la dosificación diaria puede variar entre 0,5 y 200 µg/kg de peso corporal/día, preferentemente de 0,75 a 25 µg/kg de peso corporal/día, en especial de 1 a 15 µg/kg de peso corporal/día.

Tal como se emplea aquí, el término "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" es intercambiable y se refiere a una cantidad que resulta en una mejora, reversión o remedio de los síntomas de la enfermedad o condición. Por ejemplo, una cantidad efectiva de vitamina K para eliminar el calcio, reducir o revertir la calcificación de un vaso sanguíneo en humanos puede situarse entre aproximadamente 50 microgramos/día y un límite superior de aproximadamente 50 miligramos/día. En diversas realizaciones, para eliminar el calcio, reducir o revertir la calcificación de un vaso sanguíneo en humanos es preferente una dosis entre aproximadamente 100 microgramos y aproximadamente 2 miligramos al día. Estas dosis son particularmente útiles en el tratamiento o reversión de enfermedades tales como la arteriosclerosis.

La vitamina D está incluida junto con la vitamina K en la composición utilizada en el estudio clínico y puede desempeñar un papel de refuerzo de la función de la vitamina K en la prevención del endurecimiento arterial. Se puede emplear una forma cualquiera de vitamina D, natural o sintética, incluyendo vitamina D₁, vitamina D₂ (calciferol), vitamina D₃ (colecalfiferol) y análogos de vitamina D (por ejemplo alfacalcidol, dihidrotaquisterol, calcitriol). Las fuentes naturales de vitamina D incluyen pescado marino, vísceras, aceites de hígado de pescado y yema de huevo. Las dosificaciones adecuadas de vitamina D son de 2 a 50 µg/día, preferentemente de 5 a 20 µg/día y especialmente alrededor de 7 a 10 µg/día.

En el estudio clínico descrito en el Ejemplo 1, las mediciones de las propiedades de la pared arterial se tomaron en t=0 y t=3 años. Es un buen soporte para concluir que la ingestión de vitamina K durante largos períodos es una forma eficaz de limitar el incremento del endurecimiento arterial. El período de tratamiento preferente es de al menos 6 meses, en particular de al menos 12 ó 18 meses e idealmente de al menos 36 meses. De hecho, debido a que no existen efectos secundarios negativos asociados a la suplementación alimenticia de vitamina K, se debe considerar como un componente esencial de un estilo de vida sano durante toda la vida, y especialmente en las personas de mediana edad y ancianos.

La vía de administración preferente de vitamina K es la enteral, en especial oral, pero las vías parenterales o tópicas son alternativas viables. "Administración oral" tal como se utiliza aquí incluye la administración oral, bucal, entérica o intragástrica. El término "administración parenteral" tal como se emplea aquí incluye una forma cualquiera de administración en la que la vitamina K es absorbida en el flujo sanguíneo sin implicar la absorción a través del intestino. Ejemplos de administraciones parenterales que se utilizan en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intraocular, subcutánea o intraarticular.

La vitamina K se proporciona convencionalmente en forma de tabletas o cápsulas, es decir, en un formato de suplemento alimenticio o farmacéutico. En cuanto a las preparaciones farmacéuticas o suplementos alimenticios, la vitamina K puede estar compuesta con vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en forma de píldoras, tabletas (recubiertas o no), cápsulas duras o blandas, grageas, comprimidos masticables, soluciones orales, suspensiones y dispersiones, jarabes o preparaciones parenterales estériles. Los excipientes adecuados incluyen diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio, fosfato de sodio; agentes granulantes y desintegrantes tales como almidón de maíz o ácido alginico; agentes de adhesión tales como gelatina de almidón o acacia; efervescentes; y agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

También es posible suministrar o administrar la vitamina K (opcionalmente junto con vitamina D) en un alimento reforzado o bebida. Los formatos de los productos nutricionales preferentes incluyen: bebidas en forma de zumos, bebidas lácteas, bebidas en polvo, bebidas para deportistas, agua mineral, bebidas de soja, chocolate caliente, bebidas de malta, galletas, pan, crackers, repostería, chocolate, chicle, margarinas, pastas, yogures, cereales para el desayuno, barras de snacks, sustitutos de comidas, proteínas en polvo, postres, así como alimentos para la nutrición enteral y suplementos nutricionales.

Se pueden incluir aditivos convencionales en las composiciones de la invención, incluido cualquiera de aquellos seleccionados de entre conservantes, agentes quelantes, agentes efervescentes, edulcorantes naturales o artificiales, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes enmascarantes del sabor, acidulantes, emulsionantes, agentes espesantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes, antioxidantes y similares.

"Presión sanguínea elevada" o "hipertensión" tal como se emplea aquí se refiere a una presión sanguínea que sobrepasa continuamente 140/90 mmHg (sistólica / diastólica).

En diversas realizaciones de la presente invención, la vitamina K induce la eliminación de depósitos de calcio preexistentes en un mamífero. Los vasos sanguíneos están compuestos de tres capas, llamadas desde el exterior del lado luminal, la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia. La calcificación puede ocurrir en o sobre una cualquiera de estas capas. Típicamente, la calcificación del vaso sanguíneo provoca que la pared del vaso se vuelva rígida, frágil y fácil de romperse. Con los propósitos de la presente invención, los vasos sanguíneos incluyen capilares, venas, arterias, vénulas y/o arteriolas.

La calcificación incluye la deposición anormal de cristales de calcio en sitios dentro y/o sobre los vasos sanguíneos. La calcificación preexistente puede tener lugar en enfermedades tales como, por ejemplo, arteriosclerosis, donde la placa aterosclerótica que se ha calcificado puede ocluir parcial o completamente los vasos sanguíneos. En varias etapas de la aterosclerosis, no sólo la placa sino también el tejido vascular que rodea la placa pueden calcificarse.

Para la presente solicitud, "arterioesclerosis" incluye también esclerosis de Mönckeberg. Otras enfermedades asociadas a la calcificación patológica incluyen, pero no se limitan a, calcificación del cartilago (osteoartritis), calcificación inducida por inflamación (por ejemplo en la enfermedad de Bechterev), calcificación inducida por tumores (vista a menudo en el cáncer de pecho), calcificación de la piel tal como en el Pseudoxantoma elástico (PXE) y calcifilaxis en la enfermedad renal terminal.

A menudo, las modalidades de tratamiento nutricional/sin fármacos para la arteriosclerosis implican procedimientos basados en catéteres, tales como angioplastia, que utiliza un catéter insertado en una arteria para comprimir la placa contra las paredes de las arterias con el fin de aumentar el espacio para que la sangre fluya. La colocación de un stent, que se realiza normalmente después de una angioplastia, utiliza un tubo de malla metálica colocado en la arteria dañada para soportar las paredes arteriales y mantiene abierto el vaso. Se puede realizar una aterectomía cuando se utilizan instrumentos insertados a través de un catéter para cortar y eliminar la placa de modo que la sangre pueda fluir más fácilmente.

Se llevan a cabo también procedimientos quirúrgicos para tratar la aterosclerosis. Estos incluyen endarterectomía o eliminación del revestimiento de una arteria obstruida por grandes placas. La arterioplastia, otro tipo de cirugía, implica la corrección de un aneurisma utilizando tejido sintético. Se puede realizar también una cirugía bypass, en la que se restituye el flujo sanguíneo utilizando vasos sanguíneos obtenidos de distintas áreas del cuerpo.

En diversas realizaciones de la presente invención, mediante la administración de vitamina K se puede reducir o evitar la necesidad de un tratamiento quirúrgico o basado en un catéter de la aterosclerosis. Alternativamente, se puede administrar vitamina K como parte de un plan de tratamiento comprensivo de la arteriosclerosis con procedimientos quirúrgicos y/o basados en catéteres para eliminar la calcificación.

Preferentemente, la eliminación de depósitos anormales de calcio del vaso sanguíneo es de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 100%. El período de tratamiento preferente para la eliminación de la calcificación puede ser de un mínimo de 6 a 12 semanas, preferentemente al menos de 6 a 8 meses y especialmente al menos de 12 meses o más. En varias realizaciones, el período de tratamiento para el sujeto puede durar toda la vida.

Clínicamente, la calcificación se puede detectar, por ejemplo, mediante pruebas de esfuerzo con talio, radiografía, exploraciones de calcificación coronaria, fluoroscopia, CT, angioplastia, formación de imágenes por MRI, sonografía, biopsia, histoquímica y similares.

El término "reduciendo la calcificación" o "reducción de la calcificación" incluye la disminución de la velocidad de calcificación en y/o sobre el vaso sanguíneo. Tal como se emplea aquí, el término "reversión de la calcificación" incluye la eliminación del calcio preexistente depositado en y/o sobre el vaso sanguíneo. Aunque no se comprenda totalmente el mecanismo, se piensa que la vitamina K aumenta la MGP (proteína Gla de la matriz) para proteger rigurosamente contra otro aumento de calcio, mientras otras proteínas o células (macrófagos, células musculares lisas de tipo osteoclastos u otras) participan en la eliminación concreta del calcio. Alternativamente, los residuos Gla de la MGP (formados bajo la influencia de la vitamina K) tienen algún parecido estructural con el EDTA y pueden actuar como éste para disolver directamente el calcio. Finalmente, puede que la MGP (a través de sus residuos Gla) se una directamente a los precipitados de calcio (como lo hacen todas las proteínas Gla) y ejerza una actividad quimioattractiva hacia los macrófagos, de los que se piensa eliminan los complejos de calcio-MGP.

En varias realizaciones de la presente invención, se ha descubierto que la vitamina K se puede utilizar para tratar y/o revertir la arteriosclerosis en un mamífero. Típicamente, la arteriosclerosis es una enfermedad de las arterias caracterizada por la inflamación, invasión de macrófagos, formación de células espumosas, espesamiento de la íntima, aumento del colesterol y formación de placas ateroscleróticas que, con el tiempo, pueden calcificarse. El inicio de la aterosclerosis se localiza invariablemente en las grandes arterias, tales como la aorta y las arterias coronarias. En grados más avanzados, se puede observar una ruptura de la placa que conduce a la oclusión vascular súbita, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (infarto cerebral).

En varias realizaciones, la vitamina K se administra a un mamífero que sufre de una enfermedad cardiovascular preexistente que requiere un tratamiento. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos, así como animales domésticos tales como perros y gatos, animales de laboratorio, tales como ratas y ratones, y animales de granja como ovejas, caballos y vacas.

Habiendo descrito la invención en general, ésta se puede entender más fácilmente por medio de la siguiente referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estudio clínico para comparar los efectos de la suplementación de Vitamina D y Vitamina D + Vitamina K en un grupo de mujeres postmenopáusicas sanas

5 Sujetos

Las participantes se inscribieron en un ensayo clínico doble ciego controlado con placebo de 3 años en el que se investigaron los efectos de los suplementos que contenían minerales, vitamina D y vitamina K en la densidad mineral ósea y en las características de las paredes de los vasos. Los criterios de inclusión fueron: mujer aparentemente sana, caucásica, de 50 a 60 años de edad y postmenopáusica desde hace al menos 2 años. Los criterios de exclusión fueron: 10 utilización de anticoagulantes orales, corticoides, terapia de sustitución hormonal, concentrados vitamínicos o suplementos alimenticios y alto consumo de alcohol (> 6 vasos / día). En total 181 mujeres cumplían con los criterios para su participación y se aleatorizaron en el estudio. Antes de iniciar el estudio, se recogió información sobre los factores de riesgo cardiovascular, estado de salud actual, historial médico, utilización de fármacos y comportamiento con respecto al tabaco. En este ensayo, las participantes experimentaron reconocimientos clínicos a los 0, 3, 12, 18, 24 15 y 36 meses. Los reconocimientos vasculares tuvieron lugar en la línea base y al final del estudio a los 3 años.

Todas las participantes dieron su consentimiento informado escrito y el ensayo fue aprobado por el Maastricht University Hospital Medical Ethics Committee.

Diseño del Estudio

Se aleatorizaron los sujetos en tres grupos. En el primer grupo (n=60), las participantes recibieron un placebo (maltodextrina), en el segundo grupo (n=58) las participantes recibieron un suplemento que contenía 500 mg de calcio (complejo natural de calcio derivado de la leche), 10 mg de zinc, 150 mg de magnesio y 8 µg de vitamina D₃ (minerales + vitamina D = grupo MD) y en el tercer grupo (n=63) las participantes recibieron un suplemento que contenía los mismos constituyentes que el grupo MD pero con 1 mg adicional de vitamina K₁ (minerales + vitaminas D+K = grupo MDK). Los tres tipos diferentes de suplementos eran similares en su aspecto y sabor y se dejó que las participantes eligiesen entre un suplemento en forma de polvo insípido (que debía mezclarse con agua antes de la ingesta) o en forma de tabletas recubiertas de chocolate con un núcleo de malta crujiente. Se dieron instrucciones a las participantes para que tomaran un saquito con polvo o tres tabletas al día durante la tarde, preferentemente después de la comida. Asimismo, se les aconsejó que mantuvieran sus dietas habituales y que evitaran tomar suplementos que contuvieran calcio, vitamina D o vitamina K durante dos meses antes y durante el estudio. Novartis Consumer Health SA (Nyon, Suiza) preparó y proporcionó todos los suplementos. 20 25 30

Se investigó la arteria carótida común derecha de cada paciente. El mismo investigador realizó todos los reconocimientos al inicio y al final del estudio y para cada participante se hicieron varias mediciones repetidas (5-7) durante una sesión. Se estimó la reproducibilidad para evaluar la distensión de la arteria carótida común así como su diámetro. 35

Antes del reconocimiento vascular, se midieron la altura y el peso con un equipo estandarizado para estimar el índice de masa corporal (peso/altura²).

Mediciones

Las mediciones primarias de los resultados con los propósitos de este estudio fueron las características de las paredes de los vasos de la arteria carótida común medidas con ultrasonidos (ATL Mark V).

El sistema de seguimiento ultrasónico de la pared del vaso (WTS) para determinar las propiedades de la pared arterial ha sido descrito en detalle anteriormente (Hoeks AP y col., *Ultrasound Med Biol* 1990; 16:121-8, y Kool MJF y col., *Cardiovascular Research* 1994; 28:610-614). Este sistema de ultrasonidos proporciona estimaciones del diámetro diastólico arterial final (d) y del cambio de diámetro desde la diástole hasta la sístole (Δd) normalizado para el diámetro diastólico final (Δd/d) para cada latido capturado del corazón. En paralelo con la medición del cambio de diámetro, se registró la presión arterial sanguínea a la altura de la arteria braquial mediante un dispositivo oscilométrico semi-automático (DINAMAP). La presión del pulso (Δp), definida como presión sanguínea sistólica menos diastólica, se determinó mediante el promedio de las tres mediciones más cercanas a las mediciones de distensión. A partir de d, Δd y Δp, se calcularon la distensibilidad vascular (DC) y la elasticidad (CC) de acuerdo con las siguientes ecuaciones: 40 45

$$DC = (2d\Delta d + \Delta d^2) / (d^2/\Delta p) \quad (\text{Coeficiente de Distensibilidad})$$

$$50 \quad CC = \pi(2d\Delta d + \Delta d^2) / 4\Delta p \quad (\text{Coeficiente de Elasticidad})$$

El espesor de la íntima-media (IMT) de la pared posterior se midió simultáneamente en el mismo lugar (2-3 cm próximos a la bifurcación) de la arteria carótida común donde se midieron el diámetro y los cambios de diámetro. Al final de la sesión, se procesaron los archivos de IMT registrados empleando el programa de espesor de la pared. El umbral para la derivada se mantuvo a 0,025. Cada latido del corazón dentro de un registro resultó en una estimación del espesor de la pared; el valor mediano de las estimaciones por registro se utilizó para otra evaluación. 55

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico mediante Statistical Package SPSS (SPSS Corp, Chicago, IL). Se presentan los resultados como media \pm desviación estándar (SD), salvo indicado de otro modo. Se incluyeron en el análisis solamente las participantes que habían completado el estudio. Además, las participantes que durante el estudio habían empezado a utilizar fármacos conocidos por tener un efecto directo sobre la pared de los vasos, fueron excluidas del análisis. Asimismo, las participantes con placas ateroscleróticas en la arteria carótida común y con alta variabilidad en los resultados (traslación arterial > 2 mm y variación entre latido y latido en la distensión $> 20\%$) fueron excluidas.

Se utilizó una prueba-t pareada para evaluar el cambio en las características de la pared de los vasos dentro de cada grupo durante los tres años. Consideramos que un nivel $p < 0,05$ era estadísticamente significativo. Para cada participante, se calculó el cambio porcentual con respecto a la línea base en todos los parámetros y se calculó el cambio medio con respecto a la línea base para cada grupo. El análisis primario de los resultados consistía en la comparación del cambio en DC, CC, PP e IMT entre el grupo MD y el placebo y entre el grupo MDK y el placebo. Se utilizó un análisis de regresión lineal con el cambio en los parámetros vasculares con relación a la línea base como variable dependiente, así como los grupos de tratamiento y varias covariables como variables explicativas. Los valores de edad de la línea base, fumadoras (sí o no), velocidad del corazón y presión arterial media se eligieron como covariables, debido a que su influencia sobre el cambio en las propiedades vasculares o en la respuesta a la suplementación no se podía excluir.

Parámetros Vasculares de Elasticidad

La Tabla 1 detalla las mediciones de la línea base de cada grupo de estudio. La Tabla 2 resume para cada grupo las diferencias entre los valores medios de la línea base y al final del estudio para todos los parámetros vasculares con sus niveles pareados de significación. Como se podía esperar, los DC y CC en el grupo con placebo disminuyeron significativamente (en un 10% y 6%, respectivamente). El PP, por otra parte, aumentó en un 7%, pero el aumento no alcanzó el nivel de significación. En el grupo MD, el DC disminuyó significativamente (en un 7%) y el CC se redujo en un 4%, mientras que el PP se incrementó en un 6%; sin embargo, estos dos últimos cambios no alcanzaron el nivel de significación. En el grupo MDK, sin embargo, los DC y CC se mantuvieron aproximadamente constantes durante el período de tres años, mostrando incluso el CC una tendencia al incremento (+ 3%). El PP permaneció sin cambios durante todo el período de estudio.

Las Figuras 1 y 2 (véase también la Tabla 3 y la Tabla 3a) ilustran el cambio porcentual en DC y CC respectivamente de los tres grupos. Después del ajuste de la velocidad del corazón en la línea base, la presión arterial media, edad, peso y fumar, los cambios en el placebo con respecto al grupo MDK se mantuvieron estadísticamente significativos y fueron: un 8,8% de reducción del DC (95% CI: 1,9 a 21,4), 8,6% de reducción del CC (95% CI: 1,8 a 20,3) y 6,3% de aumento del PP (95% CI: -17,1 a -0,7). En el mismo análisis no se encontraron diferencias entre los cambios en el placebo y el grupo MD: 2,5% de disminución del DC (95% CI: -14,8 a 6,3), 2,2% de disminución del CC (95% CI: -13,8 a 6,3), y 0,11% de aumento del PP (95% CI: -5,6 a 12,1).

Discusión sobre los Resultados

Los efectos perjudiciales sobre las arterias del envejecimiento durante un período de 3 años son claramente evidentes a partir del grupo de control (placebo) y subrayan lo rápido que la vasculatura puede empezar a disminuir. El médico, al corriente de la relación entre la reducción de la elasticidad arterial y diversas condiciones cardiovasculares, reconocería a partir de estos datos que existe una necesidad urgente de encontrar un método de tratamiento capaz de combatir la rápida disminución de elasticidad arterial, particularmente en mujeres postmenopáusicas.

El grupo MD, que recibió un suplemento de vitamina D, no pudo mostrar ninguna mejora en las mediciones del envejecimiento de la pared vascular con respecto al grupo placebo. Se puede concluir que el suministro de vitamina D sola no es capaz de proporcionar beneficios cardiovasculares a las mujeres postmenopáusicas que satisfacen los criterios aplicados en el presente estudio.

Por contraste absoluto al placebo y grupos MD, el grupo MDK mostró mejoras relativas significativas en la distensibilidad, elasticidad y presión del pulso durante el período de 3 años del estudio. Estos resultados demuestran que el consumo regular de vitamina K, o de la combinación de vitamina K y vitamina D, puede ralentizar y quizá incluso revertir el proceso de endurecimiento de las arterias. Como consecuencia de ralentizar el proceso de endurecimiento arterial, la suplementación con vitamina K tiene un impacto inevitable sobre la incidencia de trastornos cardiovasculares relacionados con el endurecimiento arterial, incluidos aquellos relacionados con el aumento de esfuerzo sobre el corazón y la capacidad de respuesta reducida del sistema circulatorio, muy solicitado a cambios.

Tabla 1

Características de la línea de base (promedio \pm desviación estándar) en los tres grupos de tratamiento			
Características de la línea base	Placebo (n=40) Media \pm SD	Grupo MD (n=30) Media \pm SD	Grupo MDK (n=38) Media \pm SD
Edad (años)	54,1 \pm 3,0	55,9 \pm 2,8*	55,4 \pm 2,8
Peso (kg)	69,5 \pm 11,9	70,6 \pm 11,1	66,3 \pm 9,5
Altura (m)	1,65 \pm 0,05	1,65 \pm 0,07	1,63 \pm 0,06
BMI (kg/m ²)	25,6 \pm 4,3	26,0 \pm 4,4	25,1 \pm 3,1
Edad postmenopáua. (años)	4,6 \pm 3,7	7,6 \pm 5,1**	5,1 \pm 4,3
No fumadoras (%)	75,0	73,9	85,0
Diámetro (μ m)	7162 \pm 562	7314 \pm 582	7173 \pm 411
Distensión (μ m)	372 \pm 118	353 \pm 83	332 \pm 83
Presión de pulso (mmHg)	51,9 \pm 11,1	52,9 \pm 10,1	53,7 \pm 14,3
Velocidad del corazón (latidos/min)	60,8 \pm 9,2	63,1 \pm 8,9	60,6 \pm 6,6
CC (mm ² /kPa)	0,64 \pm 0,23	0,61 \pm 0,20	0,56 \pm 0,17
DC (MPa ⁻¹)	15,8 \pm 5,2	14,5 \pm 4,0	14,0 \pm 4,0
IMT (mm)	0,63 \pm 0,11	0,64 \pm 0,10	0,61 \pm 0,08

* significativamente diferente del placebo (p<0,05)

** significativamente diferente del placebo y del grupo MDK (p<0,05)

Tabla 2

Cambios en las características de la pared de los vasos (promedio \pm SD) en la población del estudio a los 3 años			
Características de la pared de los vasos	Placebo (n=40) Dif. entre T=0 y T=3 años (Prueba-t pareada)	Grupo MD (n=30) Dif. entre T=0 y T=3 años (Prueba t pareada)	Grupo MDK (n=38) Dif. entre T=0 y T=3 años (Prueba t pareada)
Diámetro (μ m)	196 \pm 295 (p=0,00)	154 \pm 179 (p=0,00)	131 \pm 226 (p=0,00)
Distensión (μ m)	-21 \pm 61 (p=0,03)	-12,6 \pm 47 (p=0,15)	-3,9 \pm 49 (p=0,63)
Presión de pulso (mmHg)	2,7 \pm 9,9 (p=0,09)	2,8 \pm 10,1 (p=0,14)	-0,18 \pm 7,6 (p=0,89)
DC (MPa ⁻¹)	-1,8 \pm 3,4 (p=0,00)	-1,4 \pm 3,0 (p=0,02)	-0,39 \pm 3,0 (p=0,43)
CC (mm ² /kPa)	-0,05 \pm 0,1 (p=0,01)	-0,04 \pm 0,11 (p=0,10)	0,01 \pm 0,11 (p=0,75)
IMT (mm)	0,05 \pm 0,08 (p=0,00)	0,02 \pm 0,09 (p=0,32)	0,06 \pm 0,06 (p=0,00)
Velc. corazón (latidos/min)	3,0 \pm 7,0 (p=0,01)		

Tabla 3

% de cambio medio a partir de la línea de base en las características de la pared de los vasos (para cada sujeto, cálculo del % de cambio a partir de la línea base de cada variable y cálculo del promedio de los cambios individuales en cada grupo)			
Características de la pared de los vasos	Placebo (n=40) % de cambio medio a partir de la línea base	Grupo MD (n=30) % de cambio medio a partir de la línea base	Grupo MDK (n=38) % de cambio medio a partir de la línea base
Diámetro (μm)	2,8% \pm 4,1	2,2% \pm 2,5	1,8% \pm 3,1
Distensión (μm)	-4,3% \pm 15,9	-2,4% \pm 13,0	0,3% \pm 15,9
Presión de pulso (mmHg)	6,5% \pm 19,7	6,3% \pm 20,0	0,2% \pm 13,4*
DC (MPa^{-1})	-9,6% \pm 21,4	-7,1% \pm 18,3	-0,8% \pm 21,9*
CC (mm^2/kPa)	-5,9% \pm 19,5	-3,7% \pm 18,6	2,7% \pm 20,4*
IMT (mm)	8,6% \pm 13,5	4,0% \pm 13,9	9,8% \pm 9,8*

*Diferencia significativa con el placebo después de ajustar la edad, peso, fumar, presión arterial media y velc. del corazón (análisis de regresión lineal Tabla 3a)

Tabla 3a

Análisis de regresión multivariante de los efectos del grupo MDK y grupo MD en comparación con el placebo sobre el cambio en las características de la pared de los vasos a los tres años con las siguientes covariables: línea base edad, peso, fumar, velc. corazón y presión arterial media			
Variables	Coef. \pm SEM	P	95% CI
Y = cambio en DC (% con relación a la línea base)			
X = MDK	11,7 \pm 4,9	0,020	1,9 a 21,4
X = MD	4,2 \pm 5,3	0,430	-6,3 a 14,8
Y = cambio en CC (% con relación a la línea base)			
X = MDK	11,1 \pm 4,7	0,019	1,8 a 20,3
X = MD	3,8 \pm 5,0	0,459	-6,3 a 13,8
Y = cambio en PP (% con relación a la línea base)			
X = MDK	-8,9 \pm 4,1	0,034	-17,1 a -0,70
X = MD	-3,3 \pm 4,5	0,465	-12,1 a 5,6
Y = cambio en IMT (% con relación a la línea base)			
X = MDK	3,0 \pm 3,1	0,345	-3,23 a 9,15
X = MD	-2,4 \pm 3,3	0,476	-8,9 a 4,2

Ejemplo 2

En este ejemplo, mostramos que una dieta muy rica en vitamina K induce a la desaparición de calcificaciones arteriales preexistentes. Realizamos un experimento con 48 ratas. Cada punto en las distintas curvas mostradas en las Figuras 3-6 es el promedio de seis ratas, que se sacrificaron. Se diseccionó la aorta torácica, se homogeneizó y se disolvieron las sales de calcio precipitadas en ácido fórmico. La concentración total de calcio en el extracto se evaluó mediante absorciometría atómica y se expresa como microgramo de calcio por gramo de tejido.

La Figura 3 muestra los datos de 18 ratas sobre una dieta control (que contenía 5 µg/g de vitamina K). Se mataron seis de ellas en la línea base, seis a las 6 semanas y las últimas seis a las 12 semanas. Aparte del calcio celular, no se observó ningún aumento de calcio durante el período de prueba. Las 30 ratas restantes recibieron un tratamiento durante 6 semanas con warfarina como antagonista de vitamina K en un protocolo que no influye en la coagulación sanguínea, sino que afecta principalmente al estado óseo y vascular de la vitamina K. El protocolo utilizado implica la administración oral de una mezcla de warfarina (3 mg/g de comida) y vitamina K₁ (1,5 mg/g de comida) y se explica ampliamente en: H.M.H. Spronk y col., Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats, *Journal of Vascular Research* 2003; 40:531-537. Este tratamiento se designa "baja K". Se mataron seis ratas a las 6 semanas del tratamiento y otras seis a las 12 semanas del tratamiento. Como se puede observar en la Figura 4, había un incremento constante de calcio en la pared arterial, que se pudo identificar por histoquímica como precipitados calcificados, donde se fijaron las arterias en un 4% de formalina tamponada con fosfato y se seccionaron completamente los tejidos y cada quinta parte se exploró en busca de calcificación mediante tinción de Von Kossa (30 minutos, 5% de nitrato de plata) (datos no mostrados).

Las demás ratas se trataron primero durante seis semanas con warfarina. Se alimentó posteriormente un grupo de animales con la dieta estándar que contenía 5 µg de vitamina K por gramo de comida (indicado por "K normal"). Sorprendentemente, la calcificación no se interrumpió con el cambio de dieta: la calcificación continuó como en el experimento anterior. Aparentemente, la presencia de precipitados de calcio es un factor desencadenante suficiente para continuar con más calcificación (véase la Figura 5) cuando se utiliza una dieta normal.

Finalmente, utilizamos dos grupos de seis ratas que habían recibido el primer tratamiento de 6 semanas con warfarina y una dieta muy rica en vitamina K en el segundo período de 6 semanas. Un grupo recibió una dieta que contenía 100 µg/g de vitamina K₁ y el otro una dieta que contenía 100 µg/g de vitamina K₂ (menaquinona-4). Como no había diferencia alguna entre los resultados con la K₁ y la K₂, presentamos los promedios de ambos grupos en la Figura 6 (designada como "alta K"). Las conclusiones sorprendentes fueron que no encontramos diferencia alguna entre los efectos de la vitamina K₁ y la K₂, mientras que dichas diferencias se habían encontrado en la prevención de la calcificación. Esto puede estar relacionado con la dosis relativamente alta utilizada y se pueden seguir encontrando distintas eficacias a partir de los experimentos dosis-respuesta. El descubrimiento más sorprendente, sin embargo, fue que los cristales de calcio preformados se habían disuelto en gran medida aun en este período de tratamiento relativamente corto. Se puede esperar que, después del tratamiento prolongado, todos los precipitados calcificados se habrán disuelto por un alto consumo de vitamina K. La dosis utilizada para disolver los precipitados calcificados en la aorta fue 20 veces la dosis normal utilizada (en comparación con la dosis recomendada en los humanos). Si se extrapola a los humanos, el consumo efectivo de vitamina K debería incrementarse por tanto de 100 µg/día a 2 mg/día. Se iniciarán experimentos en los que se utilizan dosis inferiores. Sin embargo, es probable que se observe un efecto similar a dosis más bajas, incluso tan bajas como 1-2 veces el consumo diario normal. Resultó que esto tenía relación con la dosis relativamente alta utilizada. Se repitió el experimento cinco veces con dosis más bajas de K₁ y MK-4. Resultó que a dosis de 20 µg/g de comida, la K₁ no disminuyó significativamente la velocidad de calcificación de la arteria, resultando en un contenido en calcio de 2,8 µg/g de tejido arterial. Con la suplementación de la comida con cantidades similares de K₂ (menaquinona-4), por otra parte, resultaron concentraciones de calcio en el tejido de 0,8 µg/g de tejido arterial, lo que se encontraba significativamente por debajo del contenido en calcio del tejido antes del tratamiento (1,7 µg/g de tejido). El descubrimiento más sorprendente de estos experimentos fue que los cristales de calcio preformados se habían disuelto en gran medida, incluso en este período relativamente corto de tratamiento. Se puede esperar que después, de un tratamiento prolongado, todos los precipitados calcificados se disolverán por el alto consumo de vitamina K. La dosis utilizada para disolver los precipitados calcificados en la aorta fue 4-20 veces la dosis normal utilizada (en comparación con la dosis recomendada en los humanos). Si se extrapola a los humanos, el consumo efectivo de vitamina K debería incrementarse por tanto de 100 µg/día a 2 mg/día para la K₁ y a 400 µg/día para la K₂. Se empezarán experimentos en los que se utilizan dosis todavía más bajas. Es probable que se observe un efecto similar a dosis más bajas de vitamina K, incluso tan bajas como 1-2 veces el consumo diario normal. Esto dependerá de factores tales como la absorción de vitamina K, ya que la suplementación de vitamina K sintética se absorbe típicamente mejor (por ejemplo, 10-20 veces) que la vitamina K nutricional (que puede estar unida, por ejemplo, a cloroplastos en la matriz del alimento).

Ejemplo 3

En otro experimento, se indujo la calcificación vascular en ratas (n=30) mediante su alimentación con la dieta descrita anteriormente que contenía warfarina (3 mg/g de comida) y vitamina K₁ (1,5 mg/g de comida). Estos animales son designados grupo W&K. Las ratas de control (n=18) no recibieron warfarina, sino una dosis normal de vitamina K₁ (5 µg/g de comida: ~ 10 veces la cantidad mínima necesaria para una coagulación sanguínea óptima). Del grupo de control, se sacrificaron seis ratas al inicio del experimento para medir el contenido en calcio de la línea base de la aorta abdominal y la arteria carótida izquierda. Después de seis semanas de tratamiento, 6 ratas de control y 6 ratas W&K se

sacrificaron para monitorear el efecto del tratamiento. Las ratas restantes en el grupo W&K (n=24) se subdividieron en cuatro grupos de seis ratas para otro tratamiento de seis semanas. Un grupo continuó con la dieta W&K, mientras que se suspendió la warfarina en los tres grupos restantes: un grupo recibió vitamina K₁ normal (5 µg/g de comida), un grupo recibió alta vitamina K₁ (100 µg/g de comida: ~ 200 veces la dosis mínima necesaria) y el último grupo recibió alta vitamina K₂ (menaquinona-4, 100 µg/g de comida). Además, las 6 ratas de control restantes continuaron con su dieta durante seis semanas más. Se diseccionó la arteria carótida derecha de todos los animales y se utilizó para determinar la distensibilidad arterial. Se montaron segmentos de arteria (3-4 mm) en un arteriógrafo (Living System Instrumentation, Burlington, USA) en el que se podía monitorear continuamente el diámetro arterial. Ambos extremos de los vasos se canularon en micropipetas de vidrio de 120 a 150 µm de ancho y se sujetaron con dos hilos finos de nylon de 17 µm. Los segmentos arteriales se bañaron en una cámara para órganos de 10 ml cargada con una solución salina fisiológica sin calcio (composición en mmol/l: 144 de NaCl, 4,7 de KCl, 1,2 de MgSO₄, 1,2 de KH₂PO₄, HEPES 14,9, y 5,5 de glucosa, pH 7,4) que se mantuvo a 37°C y se gaseó con un 95% de O₂ y un 5% de CO₂. Tras la administración de 10 µmol/l de nitroprusiato sódico para asegurar la máxima vasodilatación, se incrementó progresivamente la presión intrarterial de 10 a 200 mmHg. La distensibilidad arterial o el cambio relativo de volumen del lumen arterial inducido por tal aumento de presión se estimó mediante: $DC = \Delta A/A_{n-1} * \Delta P$ (DC = distensibilidad, A = área, P = presión). La Tabla 4 resume la relación presión-diámetro de las arterias carótidas aisladas durante la máxima vasodilatación (cinco grupos procedentes del experimento de 7-12 semanas). Dentro de un rango de presión fisiológica (80 - 120 mm Hg), la distensibilidad arterial fue significativamente más pequeña en los grupos W&K y K normal que en los grupos de control y de alta vitamina K. A 100 mm Hg, la distensibilidad promedió 0,59 ± 0,31, 0,34 ± 0,09, 0,41 ± 0,08, 0,60 ± 0,12, y 0,80 ± 0,07 mm Hg⁻¹ para el control, W&K, K₁ normal, alta K₁ y alta K₂, respectivamente (significación p<0,02 en comparación con W&K). A niveles de presión sanguínea > 100 mm Hg, la distensibilidad en el grupo K₂ fue sustancial y significativamente más alta (p<0,01) que en el grupo de alta K₁ o en los animales de control.

Colectivamente, estos descubrimientos indican que el tratamiento con W&K aumentó el endurecimiento arterial y que éste se revirtió solamente por medio del alto consumo de vitamina K y no con la dieta normal con vitamina K, y que K₂ tenía un efecto más pronunciado que K₁. Medimos la distensibilidad arterial como parámetro clínico de elasticidad vascular. El experimento mostrado en la Tabla 4 demuestra que la warfarina indujo el endurecimiento de la pared de los vasos arteriales. Esto es coherente con el trabajo de Essahili y col. (Essahili R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. Am J Hypertens. 2003; 16:103-10) que demostraron que el tratamiento con warfarina resultó en incrementos de la presión aórtica del pulso, presión del pulso y presión sistólica sanguínea. En nuestro modelo, la vitamina K₁ normal en la dieta no fue capaz de afectar a la elasticidad vascular. Sorprendentemente, sin embargo, durante la dieta con alta vitamina K (tanto K₁ como K₂), se restablecieron las propiedades vasculares que se habían perdido por la calcificación inducida por la warfarina.

Tabla 4

Presión sanguínea	Control	K&W	K ₁ normal	K ₁ alta	K ₂ alta
Mm Hg	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
80	0,52 ± 0,03	0,47 ± 0,11	0,42 ± 0,13	0,54 ± 0,17	0,47 ± 0,24
85	0,65 ± 0,07	0,51 ± 0,14	0,41 ± 0,15	0,45 ± 0,17	0,77 ± 0,09
90	0,40 ± 0,04	0,49 ± 0,14	0,52 ± 0,21	0,74 ± 0,18	0,70 ± 0,19
95	0,56 ± 0,14	0,49 ± 0,24	0,45 ± 0,18	0,45 ± 0,04	0,61 ± 0,17
100	0,59 ± 0,31	0,34 ± 0,09	0,41 ± 0,08	0,60 ± 0,12	0,80 ± 0,07
105	0,53 ± 0,28	0,33 ± 0,25	0,38 ± 0,17	0,54 ± 0,12	0,57 ± 0,04
110	0,56 ± 0,12	0,26 ± 0,17	0,31 ± 0,25	0,41 ± 0,19	0,83 ± 0,10
115	0,37 ± 0,03	0,17 ± 0,15	0,23 ± 0,14	0,33 ± 0,17	0,56 ± 0,12
120	0,28 ± 0,03	0,11 ± 0,09	0,15 ± 0,12	0,22 ± 0,16	0,48 ± 0,08

Tabla 4: Efectos del estado con vitamina K sobre las propiedades mecánicas de las arterias carótidas aisladas de rata. La relación presión-diámetro se monitoreó para los animales en el punto de tiempo de 12 semanas, que recibieron la dieta de control (n=6), los que recibieron la dieta con W&K (n=6), la vitamina K normal (n=6) y los animales con alta vitamina K₁ o K₂ (n=6 por grupo). El diámetro arterial se expresa como función de la presión creciente. Los datos se presentan como promedio ± SD.

El modelo animal que utilizamos imita la esclerosis arterial de la media (también conocida como esclerosis de Mönckeberg). La esclerosis de la media es particularmente común en la diabetes mellitus, enfermedad renal terminal y envejecimiento. Notablemente, los pacientes con enfermedad renal crónica (CKD) tienen alto riesgo de enfermedad

5 cardiovascular. Estos pacientes reciben a menudo una dieta alta en calcio (al fosfato complejo), vitamina D y warfarina (para prevenir eventos trombóticos). Se ha demostrado recientemente, sin embargo, que cada uno de estos tratamientos se asocia a un riesgo incremental de calcificación arterial. Dado el hecho de que las calcificaciones arteriales son predictivas de eventos cardiovasculares, la regresión de la calcificación arterial por el consumo de vitamina K puede ayudar a reducir el riesgo de muerte en pacientes con CKD y enfermedad de las arterias coronarias. Es obvio que dicho tratamiento sólo es posible en pacientes que no reciben tratamiento anticoagulante oral.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de la vitamina K para la preparación de una formulación farmacéutica o nutricional para revertir la calcificación de un vaso sanguíneo en un mamífero que sufre de calcificación de un vaso sanguíneo, cuando se administra al mamífero una cantidad efectiva de dicha vitamina K para revertir la calcificación del vaso sanguíneo.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la reversión de la calcificación de un vaso sanguíneo incluye la eliminación de depósitos de calcio preexistentes en y/o sobre el vaso sanguíneo.
- 10 3. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la calcificación de un vaso sanguíneo está asociada a una enfermedad seleccionada del grupo consistente en arteriosclerosis, incluida la esclerosis de Mönckeberg, osteoartritis, calcificación inducida por inflamación, incluyendo la enfermedad de Bechterev, calcificación inducida por tumores, calcificación de la piel, incluyendo Pseudoxantoma elástico (PXE), y calcifilaxis en la enfermedad renal terminal.
4. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la vitamina K está contenida en un alimento o bebida o en un suplemento alimenticio.
- 15 5. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la formulación comprende además vitamina D.
6. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la calcificación es de la túnica media de la aorta o de la arteria carótida común.
7. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la vitamina K comprende vitamina K₁ (filloquinona), vitamina K₂ (menaquinona) o una combinación de las mismas.
- 20 8. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la dosificación diaria de vitamina K es de 50 µg a 2.000 µg.
9. Utilización según la reivindicación 5, caracterizada porque la vitamina D es vitamina D₃ (colecalfiferol).
10. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque el mamífero es un humano.
- 25 11. Utilización según la reivindicación 2, caracterizada porque la vitamina K se administra al mamífero en un consumo efectivo de vitamina K₁ de 2 mg/día o un consumo efectivo de vitamina K₂ de 400 µg/día.

% de cambio en DC
con respecto a la
línea base

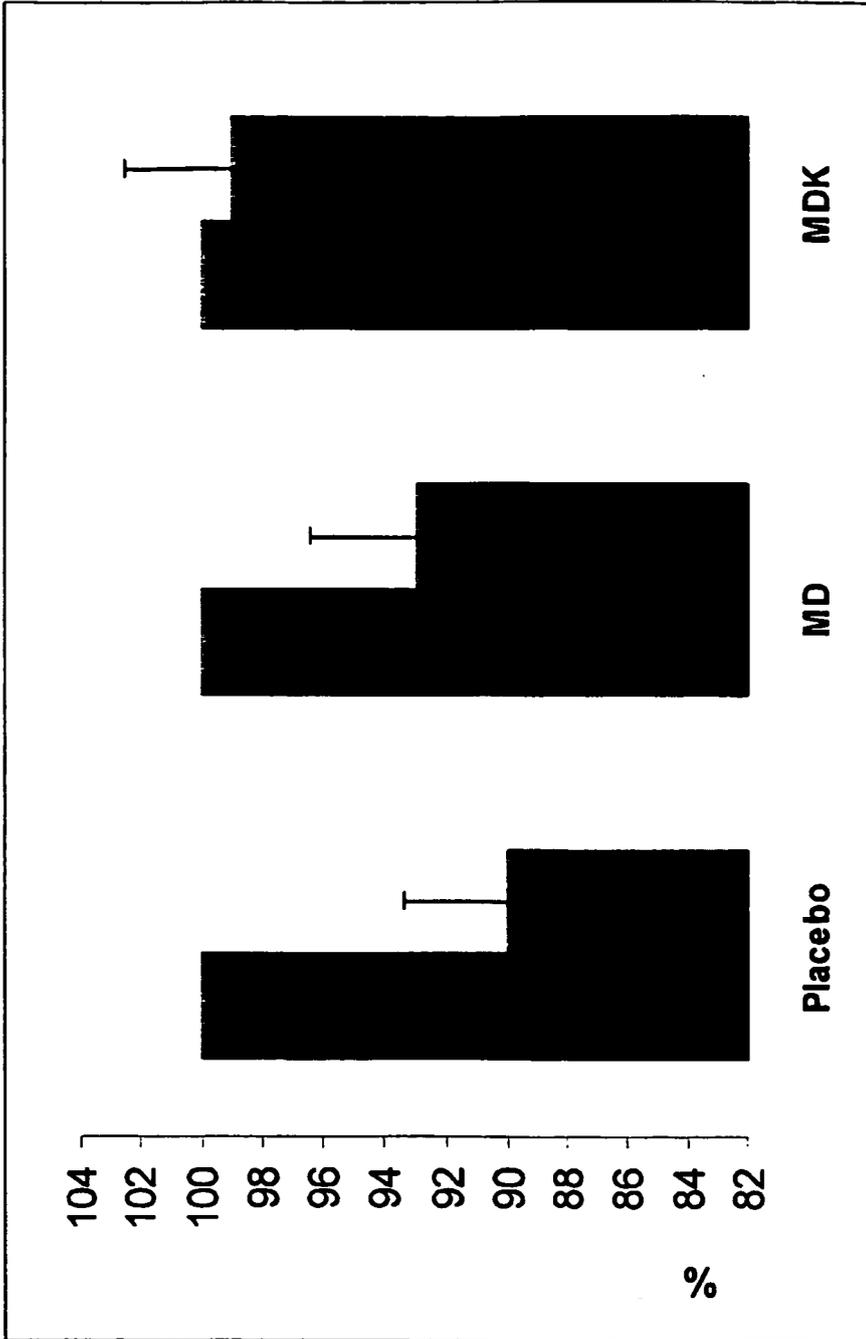


FIG. 1

% de cambio en DC
con respecto a la
línea base

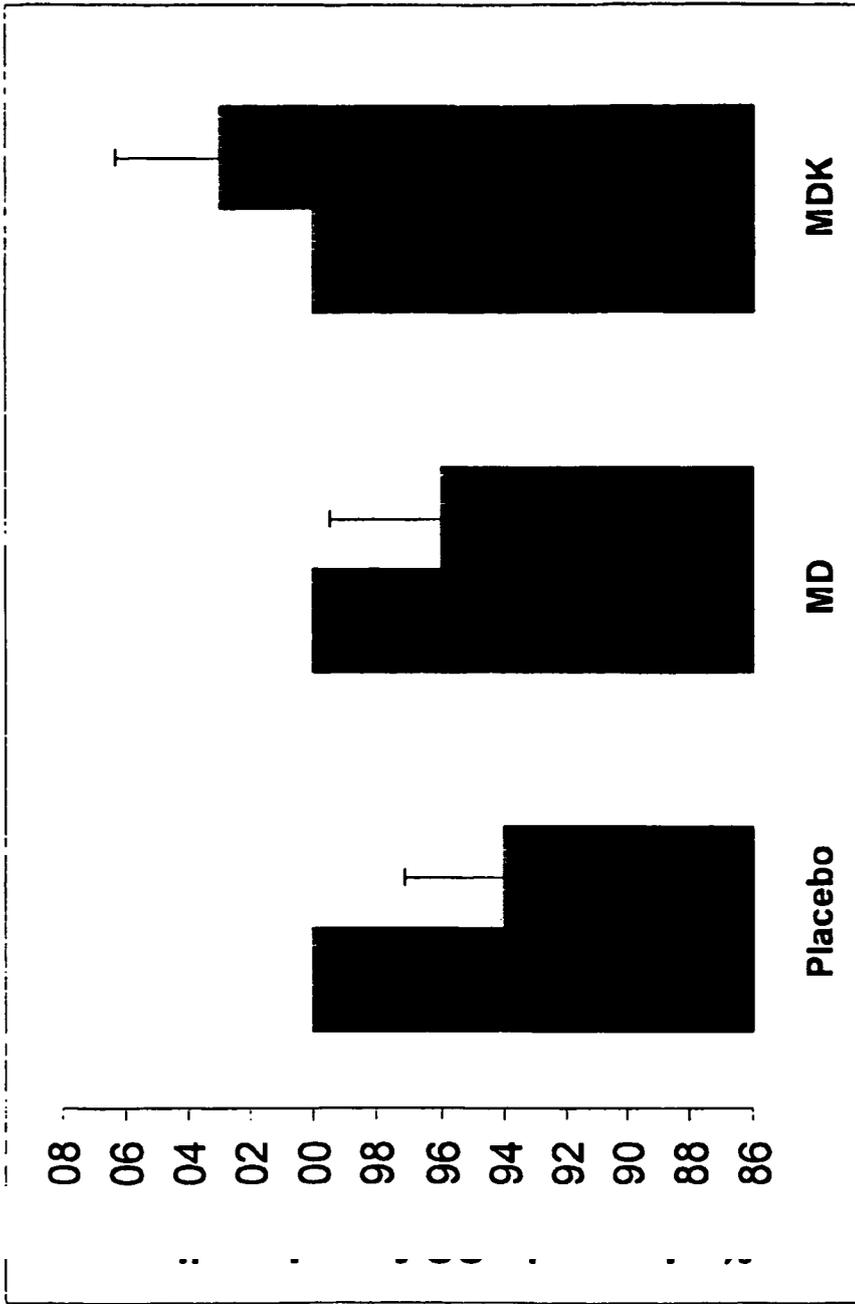


FIG. 2

Calcificación aórtica
($\mu\text{g/g}$ de tejido)

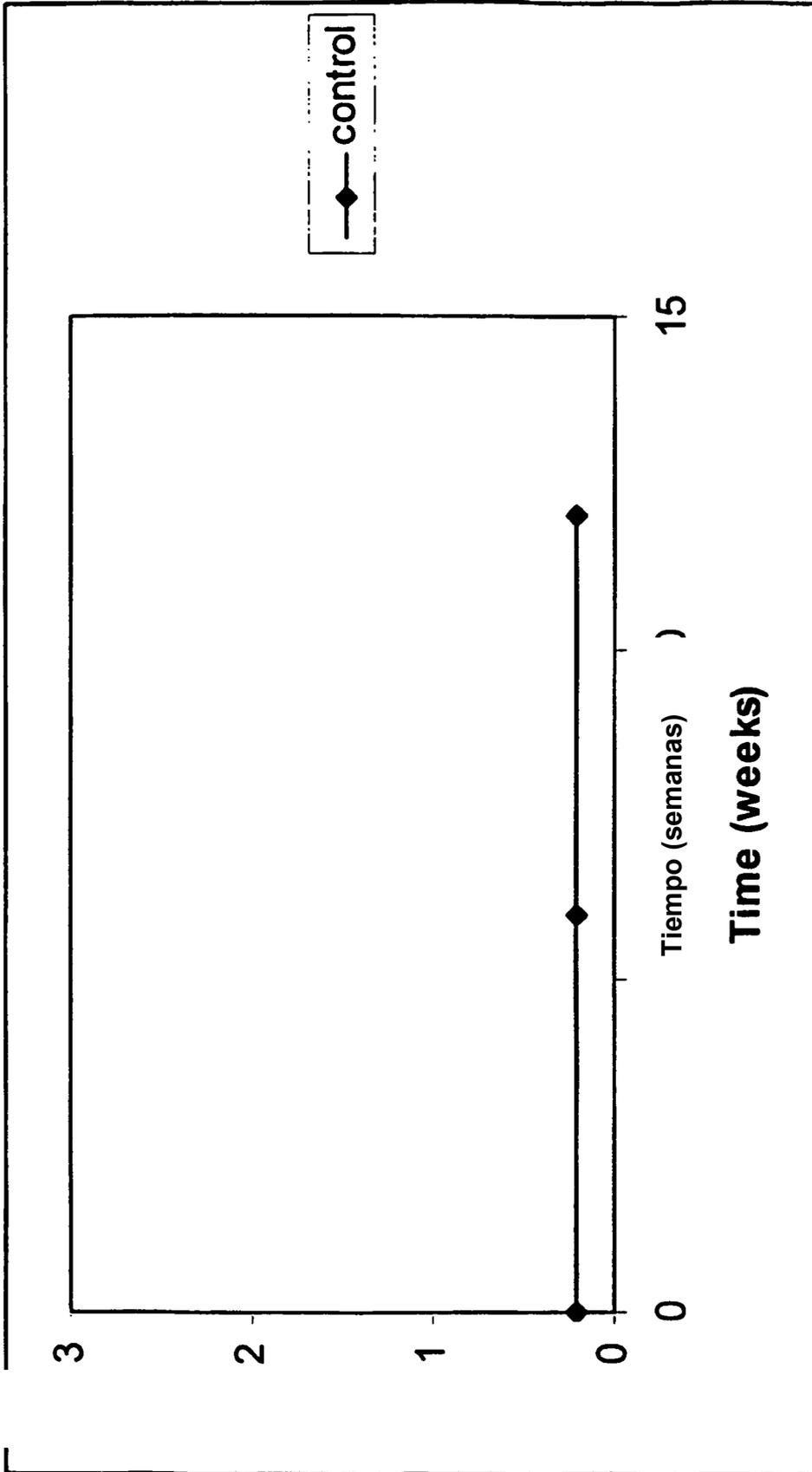


FIG. 3

Calcificación aórtica
($\mu\text{g/g}$ de tejido)

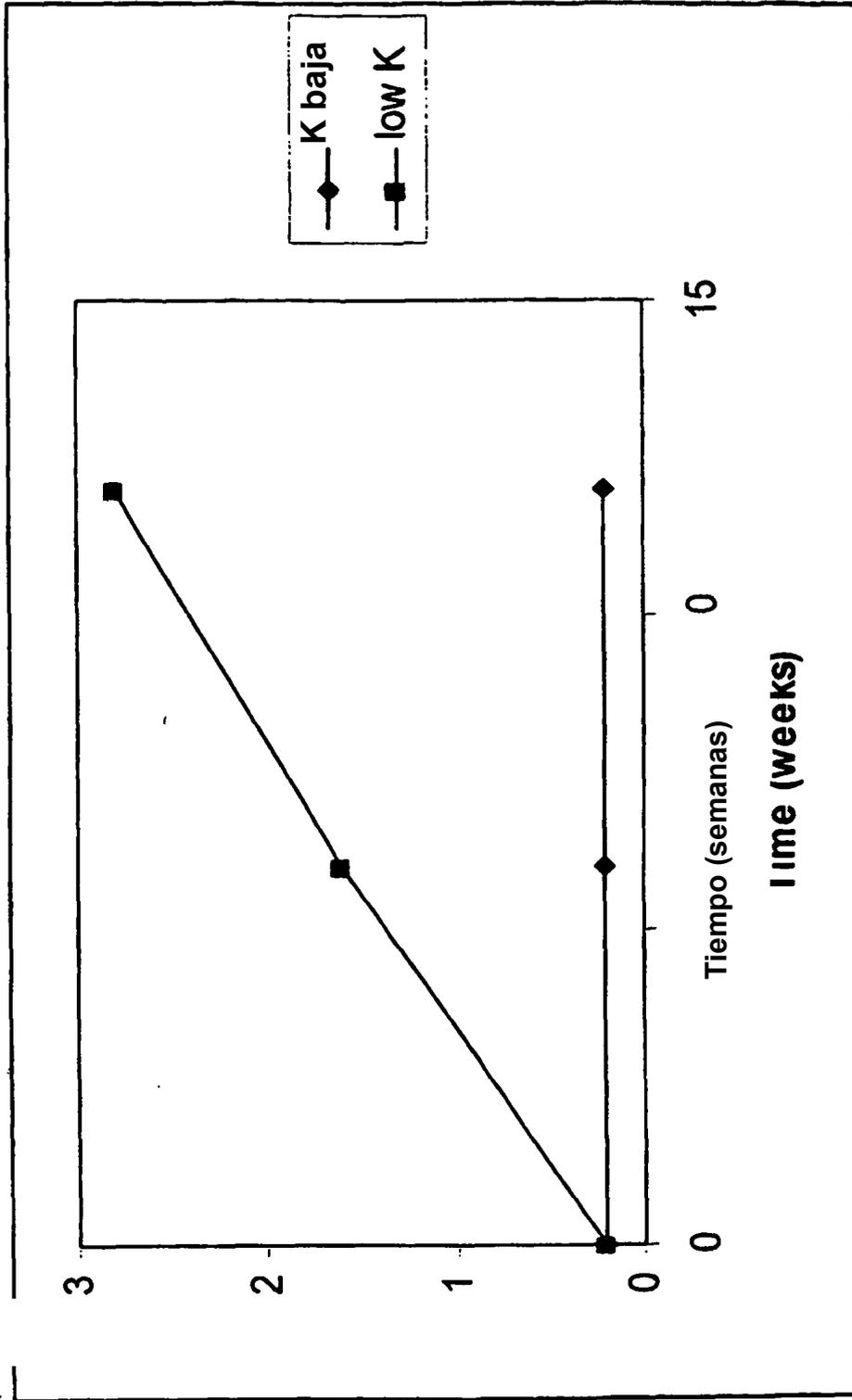


FIG. 4

Calcificación aórtica
($\mu\text{g/g}$ de tejido)

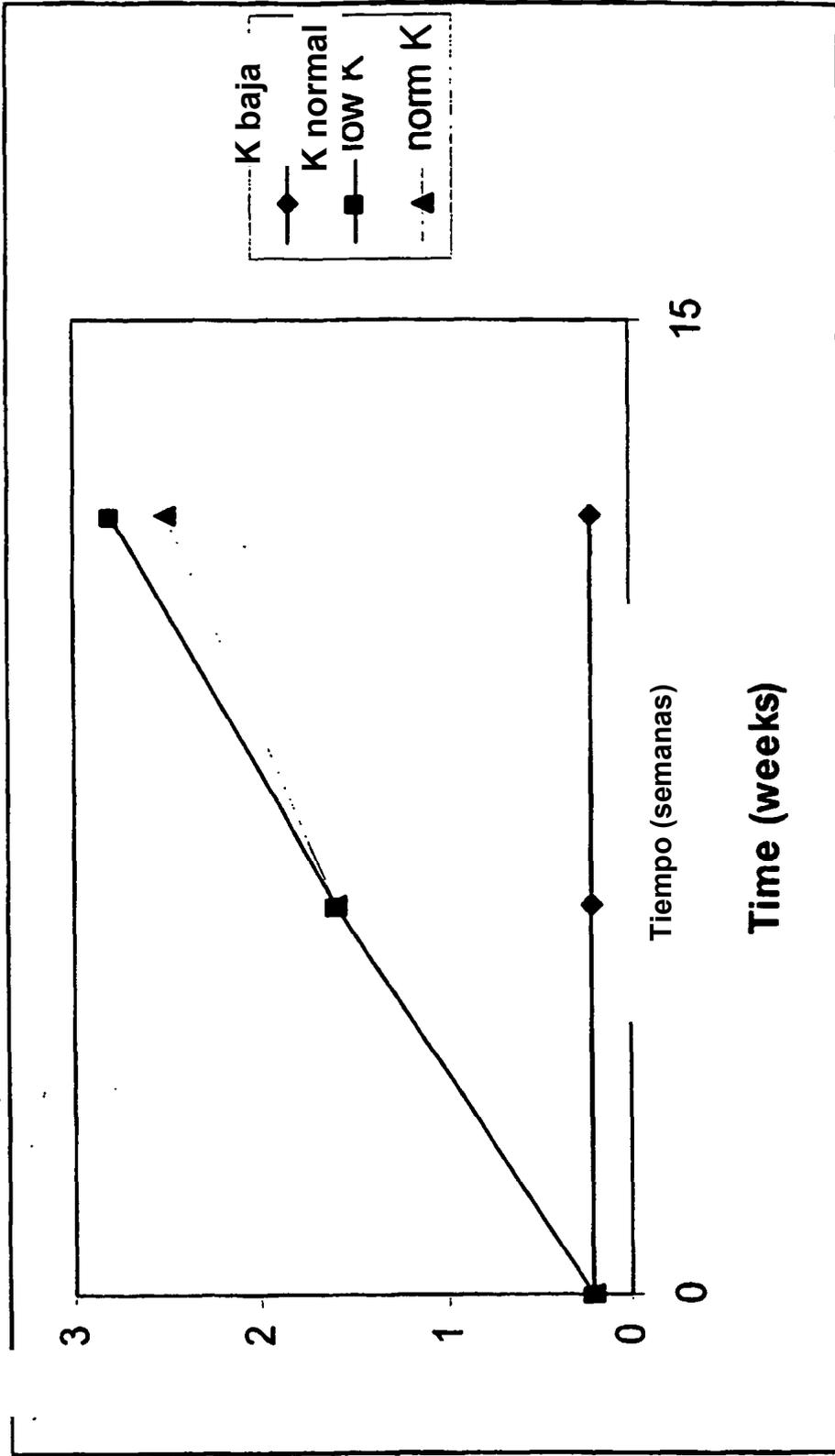


FIG. 5

Calcificación aórtica
($\mu\text{g/g}$ de tejido)

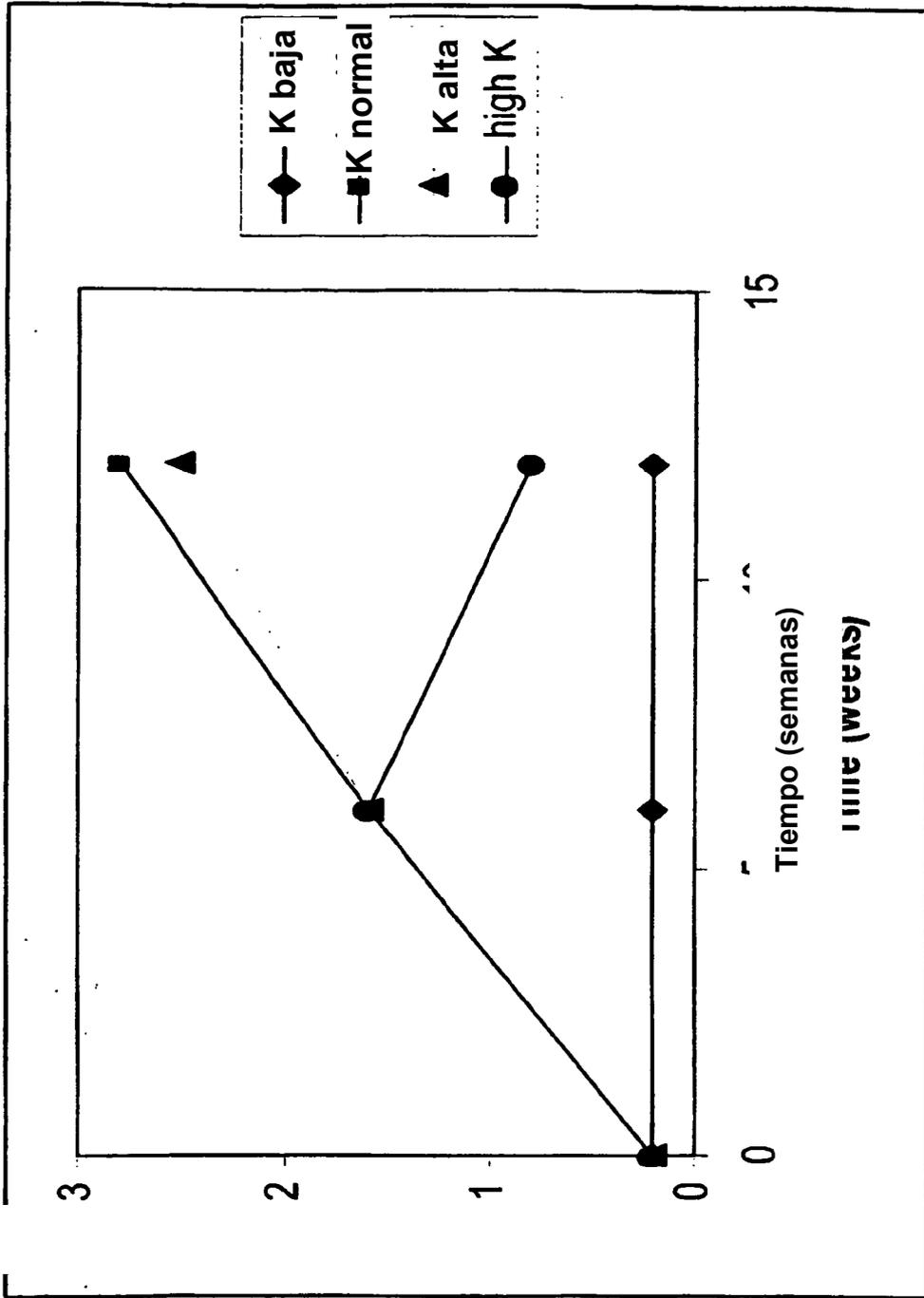


FIG. 6