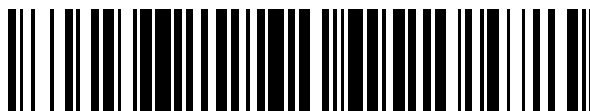


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 590**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/231 (2006.01)
A61K 31/232 (2006.01)
A61K 35/60 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2007 PCT/EP2007/006241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2008 WO08006607**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2007 E 07765188 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2046312**

54 Título: **Productos farmacéuticos y nutracéuticos que comprenden vitamina K2**

30 Prioridad:

14.07.2006 NO 20063291
14.07.2006 NO 20063292
06.09.2006 NO 20063988

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2020

73 Titular/es:

KAYDENCE PHARMA AS (100.0%)
Lilleakerveien 2B
0283 Oslo, NO

72 Inventor/es:

VERMEER, CEES;
SCHURGERS, LEON, J.;
KLAVENESS, JO;
VIK, HOGNE;
VIK, ANNE, BJORNEBYE y
WESTBYE, STEIN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 790 590 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

Productos farmacéuticos y nutricéuticos que comprenden vitamina K₂

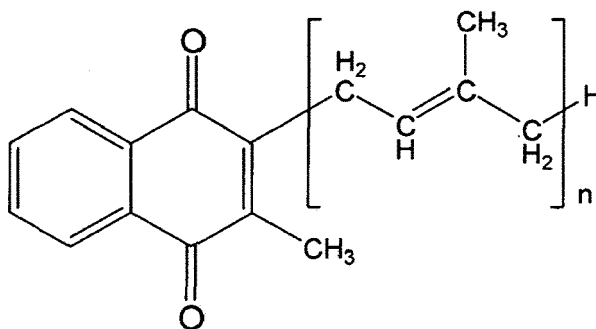
5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a productos farmacéuticos y nutricéuticos que comprenden menaquinona-7 (MK-7) en combinación con uno o más de un ácido graso poliinsaturado, aceite de pescado y aceite de kril en una formulación de comprimido o cápsula en los que MK-7 está en el intervalo de entre 1-10 µg, y a su uso en el tratamiento o la profilaxis de trastornos relacionados con el hueso, el cartílago y el sistema cardiovascular. En particular, la invención se refiere también al uso de tales productos en el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis, aterosclerosis y osteoartritis.

15 **Técnica anterior**Vitamina K₂

La vitamina K₂ es un grupo de compuestos denominados menaquinonas ("MK") que son todos 1,4-naftoquinonas 2-metil-3-todo-trans-polipreniladas que tiene la siguiente fórmula estructural:

20



La diferencia química entre las diferentes MK está relacionada con el número de unidades de isopreno en la cadena lateral. Las diversas MK se denominan normalmente MK-2, MK-3, MK-4, MK-6 y así sucesivamente. El número se refiere al número de unidades de isopreno (n=2, n=3, n=4, n=6,...).

25

El término vitamina K₂ se refiere a la mezcla que se produce de manera natural de las diferentes sustancias de MK. MK-2 a MK-13 están presentes de manera natural en el tejido animal y humano. Fuentes de la dieta de vitamina K₂ son alimentos fermentados normalmente, en particular queso y requesón. También determinados peces planos y la anguila pueden contener algo de vitamina K₂. "Natto", que se produce a partir de frijoles de soja fermentados, es una fuente popular de vitamina K₂ como "producto saludable" en Japón. La ingesta diaria de vitamina K₂ puede variar en un amplio intervalo y puede ser normalmente de desde unos pocos µg hasta varios miligramos; generalmente por debajo de 50 µg. Se reivindica que la vitamina K₂ tiene diversos efectos beneficiosos para la salud humana, principalmente relacionados con el sistema cardiovascular y el metabolismo óseo.

35

Osteoporosis

La osteoporosis es una afección médica caracterizada por masa ósea reducida y cambios en la microarquitectura del hueso. Se estima que más de 200 millones de mujeres tienen osteoporosis en todo el mundo. La osteoporosis y las fracturas osteoporóticas están aumentando en todo el mundo, principalmente como resultado del rápido crecimiento de la población de edad avanzada. El tratamiento de la osteoporosis actualmente incluye terapia hormonal habitual, ingesta de calcio y vitamina D y tratamiento con fármacos usando bisfosfonatos.

40

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular que puede afectar a las arterias de varios órganos vitales, incluyendo el cerebro, el corazón, los riñones, así como los brazos y las piernas. En la mayoría de países occidentales, la aterosclerosis es la principal causa de muerte. El número de muertes por aterosclerosis es aproximadamente el doble del número de muertes por todas las enfermedades cancerígenas juntas. La aterosclerosis es una enfermedad lenta y progresiva que puede comenzar tan pronto como en la infancia. En la aterosclerosis, las arterias pierden su elasticidad y se endurecen. Hay varias afecciones asociadas con el desarrollo y la progresión de la enfermedad, incluyendo factores de riesgo como obesidad, diabetes, hipertensión y tabaquismo. Mientras que la aterosclerosis, desde el punto de vista estrictamente médico, se define generalmente como una enfermedad inflamatoria de la túnica íntima arterial, la arteriosclerosis se define más ampliamente y también comprende otras formas de enfermedad vascular tales como esclerosis de Mönckeberg de la capa media.

45

50

55

Artrosis y artritis

5 La artrosis, la artritis inflamatoria, la artritis reumatoide y la osteoartritis son enfermedades del cartílago y se caracterizan por degeneración articular. Patológicamente, hay una alteración en la estructura del cartílago. Estas enfermedades afectan a las articulaciones y la enfermedad a menudo puede diagnosticarse fácilmente por rayos X. Varios tipos de medicamentos se usan actualmente para el tratamiento de estas enfermedades. Estos incluyen analgésicos simples, AINE, inhibidores de COX 2, corticosteroides y glucosamina.

10 Efecto de la vitamina K₂ sobre la osteoporosis, aterosclerosis, artrosis y artritis

Durante los últimos años, varias publicaciones describen un efecto positivo de la ingesta de vitamina K₂ en osteoporosis; véanse, por ejemplo, W. Sakamoto *et al.* en *Osteoporosis International* 16, 1604-1610 (2005); M. Kaneki en *Clinical Calcium* 15, 605-610 (2005); J. Iwamoto *et al.* en *Current Pharmaceutical Design* 10, 2557-2576 (2004); K. Nakayama en *Horumon to Rinsho* 52, 339-349 (2004); S. Shiomi *et al.* en *American Journal of Gastroenterology* 97, 978-981 (2002) y T. Hosoi en *Bone (Osaka)* 14, 95-97 (2000).

Hay varias publicaciones relacionadas con el uso de vitamina K₂ o Natto para el tratamiento de aterosclerosis o afecciones similares; véanse, por ejemplo, Y. Ozawa en *Gifu Daigaku Igakubu* 50, 20-26 (2002); L. J. Schurgers *et al.* en *Zeitschrift für Kardiologie* 90 (Supl. 3), iii57-iii63 (2001); Y. Seyama en *Clinical Calcium* 9, 873-878 (1999); H. Kawashima *et al.* en *Jap. Journal of Pharmacology* 75, 135-143 (1997) y J. M. Geleijnse *et al.* en *the Journal of Nutrition* 134, 3100-3105 (2004).

25 En un artículo reciente, T. Neoqi *et al.* (*Arthritis & Rheumatism* 54, 1255-1261 (2006)) notificaron que bajos niveles de vitamina K sérica están asociados con una mayor prevalencia de osteoartritis.

Aceite de pescado, aceite de kril y PUFA n-3

30 Los ácidos grasos poliinsaturados, o PUFA, son ácidos grasos de cadena larga que contienen dos o más dobles enlaces. El interés por los mismos surge de su potencial en aplicaciones terapéuticas y en aplicaciones alimentarias y nutricionales. Se producen en todos los animales, plantas, algas, hongos y bacterias y se encuentran ampliamente en muchos compuestos lipídicos tales como membranas, aceites de almacenamiento, glucolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y lipoproteínas. Se producen comercialmente a partir de plantas de semillas seleccionadas y de algunas fuentes marinas.

35 Los PUFA se agrupan en dos series basándose en la posición del enlace doble terminal que es 3C o 6C desde el átomo de carbono terminal de la cadena de ácidos grasos. Algunos ejemplos son: El PUFA de serie 3, también conocido como PUFA (n-3) u omega-3, incluye aceites de la dieta ricos en ácidos grasos omega-3, tales como aceite de pescado, aceite de kril, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido linolénico (LA) y ácido alfa-linolénico (ALA). El PUFA de serie 6 incluye ácido gammalinolénico (GLA) y ácido araquidónico (AA).

40 El kril es un grupo de animales marinos similares a los camarones que viven en las regiones árticas y antárticas. El tamaño del kril está normalmente entre 5 y 50 mm. Hay varias especies de kril. Las especies árticas incluyen *T. inermis*, *T. rushii*, *T. longicauda* y *M. norvegia*, mientras que las especies antárticas incluyen *E. superba* y *E. crystallorhynchus*. Se han sugerido kril y productos relacionados con kril como componentes en pienso para peces; véanse, por ejemplo, los documentos KR 2005031319, KR 2004087618, JP 2003070426, US 6153251, EP 729708, SU 1784152, JP 05030923, JP 0465454 y JP 61274653.

45 Además, se usan kril y productos a base de kril como cebos de pesca (véase, por ejemplo, el documento NC 1820626), en combinación con ácido linoleico conjugado para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades (documento US 2006078625), como aditivos para inhibir la oxidación de lípidos (documento WO 2005075613), como fertilizante (documento CN 1502589), en productos alimenticios (documentos JP 2004065152 y WO 2003/003857), para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, artritis, cáncer de piel, diabetes y síndrome premenstrual (documento WO 2002/102394), como fuente de enzimas para el tratamiento de acné y otras enfermedades (documentos US 5958406, US 5945102, US 6030612, WO 96/24371 y WO 93/24142) y como fuente de enzimas multifuncionales (documento US 6030612). Se han sugerido además enzimas de kril para el tratamiento de la trombosis (documento WO 95/33471) y en su uso para la fabricación de composiciones para uso dental (documento WO 95/33470).

50 También se sugieren kril o productos a base de kril como fungicidas (documento JP 07033619), como agentes antidiabéticos (documento JP 04042369), y se han sugerido proteínas de kril para la fabricación de alimentos saludables (documento JP 01137952). Otros documentos de patente relacionados con kril y componentes de kril son: dentífricos que comprenden ácidos grasos de kril (documento JP 2568833), cosméticos que contienen proteasas extraídas de kril para la limpieza de la piel (documento JP 63218610), proteinasa antiinflamatoria de kril (documento JP 61068419), disolvente de trombos (documento EP 170115), composición enzimática como promotor de la digestión (documento WO 85/04809), preparación de quitina (documento PL 114387), preparaciones de carotenoides (documento PL 113328, alimentos similares a carne de cangrejo (documentos JP 57125677, JP 57079863 y JP

67050848), antihipertensivos (documento JP 54119011) y alimentos a base de kril (documentos JP 60046947, JP 61023987 y JP 55040218).

El contenido total de lípidos del kril varía de una especie a otra. También hay variaciones del contenido total de lípidos durante el año. La composición lipídica del kril también varía para cada especie durante el año. Los lípidos totales en kril están normalmente entre el 5 y el 60%. El porcentaje de triglicéridos totales y ésteres de cera de lípidos totales en kril puede variar a lo largo de un amplio intervalo; cada uno desde casi cero hasta el 70%. Además de triglicéridos y ésteres de cera, lípidos de kril, a continuación en el presente documento aceite de kril, comprende fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos libres y alcoholes grasos. Los fosfolípidos típicos incluyen compuestos como fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. El aceite de kril puede estar en forma de aceite sin procesar obtenido a partir de kril o en forma de aceite purificado o modificado. Los compuestos insaturados y compuestos poliinsaturados forman una gran parte de los compuestos grasos en el aceite de kril. Los principales constituyentes de ácidos grasos en aceite de kril son los siguientes ácidos grasos: 14 : 0, 16 : 0, 16 : 1 (n-7), 18 : 0, 18 : 1, 18 : 1 (n-9), 18 : 1 (n-7), 18 : 2 15 (n-6), 18 : 3 (n-3), 18 : 4 (n-3), 20 : 1 (n-9), 20 : 5 (n-3), 22 : 1 (n-11), 22 : 6 (n-3).

Para referencias sobre la composición de aceite de kril, véanse, por ejemplo: S. Falk-Perdersen *et al.* en Can. J. Fish Aquat. Sci. 57 (Supl. 3) 178-191 (2000), F. Alonzo *et al.* en Marine Ecology: Progress Series 296, 65-79 (2005), N. Kusumoto *et al.* en J. Oleo Science 53, 45-51(2004) y referencias en el presente documento.

Técnica anterior adicional

El documento JP 03254658A se refiere a un producto alimenticio a base de Natto mezclado con una sustancia, por ejemplo, material (semi)seco tal como judías, granos, almidón, carne de pescado, carne de animales, algas marinas o condimentos.

El documento JP 2003169632A se refiere a productos que aumentan la utilidad de los alimentos saludables por el sinergismo de la sustancia componente contenida en arroz, aceite de embrión/germen y la sustancia componente en aceite de yema de huevo y fosfatidilserina.

El documento JP 2003313142 se refiere a una composición líquida o en polvo altamente nutricional para su uso en la nutrición de pacientes que no pueden tomar comidas normales, especialmente personas de edad avanzada y receptores de cuidados. La composición nutricional comprende, como ingredientes nutricionales, lactoproteínas, proteínas de soja, lípidos, fibras dietéticas, digosacáridos, catequinas o polifenoles, vitaminas, minerales y microelementos.

El documento WO 02/01969 A1 se refiere a formulación nutricional y farmacéutica que comprende en combinación de vitamina K y una fuente de al menos un ácido graso esencial (EFA) como ingredientes esenciales, y se proporcionan productos alimenticios que contienen EFA y una cantidad artificialmente elevada de vitamina K para el tratamiento o la prevención de una variedad de enfermedades o afecciones.

El documento WO 02/074308 A1 se refiere a una composición útil en la prevención de osteoporosis, en la que dicha composición comprende (a) al menos una isoflavona y/o glucósido de isoflavona, preferiblemente genisteína y/o genistina; (b) al menos un ácido graso poliinsaturado; (c) opcionalmente vitamina D y/o uno o más derivados de la misma y/o vitamina K y/o uno o más derivados de la misma; y (d) opcionalmente adyuvantes y excipientes en cantidades según se requiera, preferiblemente dentro del intervalo del 0,1 al 20% en peso, basándose en el peso total de la composición.

El documento JP 2005237300 se refiere a un material alimenticio y a un método de fabricación del mismo. El producto alimenticio se obtiene mediante la propagación de *Bacillus natto* en un extracto de planta como material relacionado con la soja para producir vitamina K.

El documento WO 2004/019923 A1 se refiere a una composición farmacéutica o formulación nutricional que comprende vitamina K que puede usarse para combatir la rigidez de las arterias relacionada con la edad, y las consecuencias de la misma, concretamente congestión pulmonar, hipertensión, hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca congestiva (del lado derecho), insuficiencia ventricular izquierda o del lado izquierdo, insuficiencia cardíaca crónica, angina de pecho, infarto de miocardio, esclerosis de Monckeberg y accidente cerebrovascular.

Suzuki *et al.*, 1997, Bone, 21(5): 461-467 se refieren a un estudio de control de caso de fractura de cadera entre ancianos japoneses, que se llevó a cabo con el fin de evaluar los factores de riesgo de las fracturas. Los autores concluyen que algunas características del estilo de vida tradicional japonés pueden prevenir las fracturas de cadera entre los ancianos japoneses.

El documento EP 1 153 548 A1 se refiere a un producto alimenticio que comprende menaquinona a un nivel de 50 a 5000 µg/100 g de producto.

El documento WO 2005/030190 A1 se refiere a composiciones farmacéuticas y suplementos nutricionales que comprenden una dosis diaria efectiva de menaquinona-7.

5 Plaza *et al.*, 2005, *Alternative Medicine Review* 10(1): 24-35 se refiere a datos *in vitro*, *in vivo* y en seres humanos sobre el efecto positivo de la vitamina K₂ sobre la osteoporosis.

Aunque existen varios productos farmacéuticos en el mercado para el tratamiento de osteoporosis y enfermedad cardiovascular, todavía existe una necesidad urgente de enfoques alternativos.

10 **Sumario de la invención**

El alcance de la invención se determina por las reivindicaciones adjuntas.

15 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la vitamina K₂ y los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pueden formularse juntos en una formulación estable con larga vida útil de almacenamiento.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un producto farmacéutico o nutricional para administración oral que comprende MK-7 en combinación con al menos uno de un PUFA, o bien purificado o bien en forma de aceite de pescado o aceite de kril en el que dicho producto es una formulación de comprimido o un 20 formulación de la cápsula y en el que MK-7 está en el intervalo de entre 1-10 µg.

También se encontró que la vitamina K₂, y en particular MK-7, no contrarresta el efecto anticoagulante de aceites marinos o PUFA n-3.

25 Se encontró además que las menaquinonas superiores, en particular MK-7 y superiores, contrarrestan los posibles efectos inductores de calcificación arterial de aceites marinos.

Se encontró además que las menaquinonas superiores, en particular MK-7 y superiores, contrarrestan aspectos 30 potencialmente negativos de aceites marinos sobre la salud ósea.

Se encontró además que menaquinonas superiores, en particular MK-7 y superiores, contrarrestan aspectos potencialmente negativos de aceites marinos sobre la salud del cartílago.

35 Se encontró además, en estudios de cultivo celular, que MK-7 se capta mejor que otras vitaminas K. MK-8 y MK-9 se captan algo menos, pero a un nivel comparable, mientras que MK-4 y vitamina K₁ se captan en una medida mucho menor.

Se encontró además, en estudios de cultivo celular, que las menaquinonas de cadena larga, en particular MK-8 y MK-9, tienen menos probabilidades de interferir con el tratamiento anticoagulante oral que otras formas de vitamina K.

40 Por tanto, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un producto farmacéutico o nutricional que comprende MK-7 en combinación con al menos uno de un PUFA, o bien purificado o bien en forma de aceite de pescado o aceite de kril, para su uso en un método de prevención o tratamiento de al menos uno de enfermedades o trastornos cardiovasculares, óseos y cartilaginosos en seres humanos y animales, en el que la dosificación de MK-7 45 está en el intervalo de entre 1-10 µg al día.

Se describe además el uso de al menos una de MK-7, MK-8, MK-9 y MK-10, preferiblemente en combinación con al menos uno de un PUFA, o bien purificado o bien en forma de aceite de pescado o aceite de kril, para promover al menos una de salud cardiovascular, salud ósea y salud del cartílago en seres humanos y animales. Un ejemplo típico 50 de dicho uso es para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar al menos uno de enfermedades o trastornos cardiovasculares, óseos y cartilaginosos. El medicamento puede proporcionarse como un solo medicamento o como un kit.

55 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un producto farmacéutico o nutricional tal como se definió anteriormente en el presente documento para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de al menos una de aterosclerosis, arteriosclerosis, osteoporosis, osteoartritis o una enfermedad inflamatoria o degenerativa del cartílago.

60 También se describe contrarrestar determinados aspectos negativos de los alimentos y suplementos alimenticios que contienen aceite de pescado, aceite de kril y PUFA, reforzando por tanto los aspectos beneficiosos de dichos aceites marinos y PUFA para la salud pública.

65 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende los productos farmacéuticos o nutricional que comprenden MK-7 y al menos uno de un PUFA, o bien purificado o bien en forma de aceite de pescado o aceite de kril tal como se describió anteriormente.

En una realización preferida de la invención, un PUFA, tal como se usa en el presente documento, es un PUFA omega-

3, por ejemplo ácido eicosapentanoico (EPA) o ácido docosahexaenoico (DHA).

Estos y otros aspectos de la presente invención se comentarán con más detalle en la siguiente descripción detallada y ejemplos.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el potencial de trombina endógena (ETP), que refleja la actividad de trombina total durante la coagulación. Se monitorizaron especies de proteína Gla de la matriz (MGP) carboxiladas y no carboxiladas usando ELISA de tipo sándwich basados en anticuerpos específicos de conformación con plasma agrupado normal como referencia. El cambio en la carboxilación de MGP fue significativo después de un mes, pero la significación se perdió durante los meses 3 y 4. Véase el experimento 2 a continuación.

10

La figura 2 muestra, en el mismo experimento que en la figura 1, especies de osteocalcina carboxiladas y no carboxiladas en suero usando kits de osteocalcina específicos de conformación. El cambio en la carboxilación de osteocalcina fue significativo después de un mes, pero la significación se perdió durante los meses 3 y 4. Véase el experimento 3 a continuación.

15

La figura 3 muestra la excepcional estabilidad de MK-7 disuelta en aceite de pescado y aceite de kril. Se prepararon muestras en botellas de vidrio selladas y se mantuvieron en un lugar oscuro a temperatura ambiente, 40°C y 100°C, respectivamente. A tiempos regulares, se tomaron muestras y se analizaron por determinar su contenido de MK-7. No se observó pérdida de MK-7, incluso después de 2 semanas a 100°C. Véase el experimento 4 a continuación.

20

La figura 4 muestra la estabilidad de vitaminas K₁, MK-4, MK-7, MK-8 y MK-9 en tres medios de cultivo celular (usados para el crecimiento de los tres tipos de células diferentes descritos a continuación, respectivamente) sin células presentes. Véase el experimento 5 a continuación.

25

Las figuras 5A-C muestran curvas de dosis-respuesta para la captación de vitamina K celular en tres tipos de células diferentes; se hicieron crecer las células hasta un 80% de confluencia después de lo cual se añadió vitamina K (es decir, K₁, MK-4, MK-7, MK-8 y MK-9) en diferentes concentraciones. La figura 5D muestra un gráfico de la captación de MK-7 en los tres tipos de células diferentes en la misma escala. Véase el experimento 6 a continuación.

30

Las figuras 6A-C muestran la captación celular de vitaminas K₁, MK-4, MK-7, MK-8 y MK-9 en los tres tipos de células diferentes en función del tiempo; se hicieron crecer las células en los medios de cultivo descritos en el experimento 5. En todos los casos, se añadió una mezcla de estas vitaminas K a las células después de haberse hecho crecer hasta un 80% de confluencia. Véase el experimento 7 a continuación.

35

Las figuras 7A-C muestran la medida en la que el efecto de la warfarina se evita por las diversas formas de vitamina K (tal como se mide por la formación de epóxido de K). Cuanto más KO se forme, mayor es la medida en la que se evita a través de la enzima DT diaforasa. Véase el experimento 8.

40

Las figuras 8A-C muestran la medida en la que las diversas formas de vitamina K se utilizan en ausencia de warfarina, pero en condiciones de inanición celular. Cuanto más KO se forme, menos se recicla una especie de vitamina K. Véase el experimento 9 a continuación.

45

Definiciones

El término "ácido graso poliinsaturado" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier ácido graso poliinsaturado, ya sea en forma de un triglicérido, un éster fisiológicamente aceptable, un ácido graso libre o una sal fisiológicamente aceptable de un ácido graso poliinsaturado. Más específicamente, el término se usa para indicar ácidos grasos omega-3 y aceites de la dieta ricos en ácidos grasos omega-3, tales como aceite de pescado y aceite de kril. En la bibliografía, los ácidos grasos omega-3 también se conocen como ácidos grasos poliinsaturados (n-3) o PUFA n-3.

50

El término "aceite de kril" tal como se usa en el presente documento pretende indicar todos los componentes lipófilos en el kril y puede ser aceite de kril sin procesar, aceite de kril purificado, compuestos de aceite de kril y derivados de componentes de aceite de kril.

55

Tal como se usa en el presente documento, el aceite de pescado y el aceite de kril se denominan colectivamente "aceites marinos".

60

El término "vitamina K₂", tal como se usa en el presente documento, se refiere a las menaquinonas (MK) que se producen de manera natural o mezclas de las mismas.

El término "compuesto dentro de la clase de compuestos de vitamina K₂", tal como se usa en el presente documento, se refiere a menaquinona-7 (MK-7).

65

El término "principalmente MK-7" tal como se usa en el presente documento se refiere a composiciones en las que al menos el 90% de todos los compuestos de vitamina K₂ en la composición, según análisis de HPLC, es MK-7.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa principalmente en determinados hallazgos sorprendentes en estudios profundos sobre las propiedades farmacológicas de la vitamina K₂, y en particular las menaquinonas superiores (MK-7, MK-8, MK-9 y MK-10), y combinaciones de estos compuestos con PUFA, en forma pura o en forma de aceite de pescado o aceite de kril. Estos hallazgos proporcionan nuevas posibilidades y desafíos para productos mejorados en el campo farmacéutico y nutricional relacionados con la profilaxis o el tratamiento de determinados trastornos cardiovasculares, óseos y cartilaginosos y, más en general, dan como resultado efectos beneficiosos para la salud de seres humanos y animales.

15 Estos hallazgos se comentarán con más detalle a continuación.

Efectos sobre la salud del aceite de pescado, aceite de kril y PUFA n-3

Se han notificado varios aspectos sobre la salud de PUFA n-3, incluyendo un marcado efecto beneficioso sobre enfermedades cardiovasculares. Tal como han revisado Van Schoonbeek *et al.* (Journal of Nutrition 133, 657-660 (2003)), los efectos beneficiosos de PUFA n-3 y aceites marinos se basan en múltiples mecanismos incluyendo la reducción de la actividad plaquetaria sanguínea, un perfil lipídico sanguíneo más favorable y una reducción de coagulabilidad sanguínea.

El efecto hipocoagulante del aceite marino y PUFA n-3 se atribuye principalmente a una disminución del estado de vitamina K hepática y una disminución concomitante de los factores de coagulación dependientes de vitamina K II, VII, IX y X, conduciendo a una disminución del potencial de formación de trombina. C.M.A. Nieuwenhuys *et al.* concluyeron que "la administración prolongada de PUFA n-3 pero no de n-6 puede conducir a un estado hipocoagulable del plasma a través de una capacidad reducida de generación de trombina dependiente de vitamina K con inactivación de trombina sin cambios por antitrombina III". También se notificó una inhibición específica de la síntesis de factores de coagulación dependientes de vitamina K por C. Leray *et al.* (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 22, 459-463 (2001)). Esto concuerda con la observación de L.J. Schurgers *et al.* (Journal of Lipid Research 43, 878-884 (2002)), de que algunos aceites de la dieta pueden interferir con la absorción de vitamina K y el metabolismo en voluntarios humanos. La evidencia directa de la interferencia con el metabolismo de la vitamina K la proporcionaron C.M.A. Nieuwenhuys *et al.* (Thrombosis Research 104, 137-147 (2001)) que muestran que el aceite de pescado y los PUFA n-3 disminuyeron los niveles de vitamina K en el hígado (es decir, el lugar donde se sintetizan los factores de coagulación). Además, M. Andriamampandry *et al.* (Medical Sciences 321, 415-421 (1998)) demostraron que el efecto anticoagulante leve del aceite de pescado se revertía completamente mediante un ligero aumento de la ingesta de vitamina K₁.

Sorprendentemente ahora se ha encontrado que la vitamina K₂, especialmente MK-7, no revierte el efecto beneficioso del aceite de pescado. En dosificaciones normalmente entre 1 y 10 µg/día, MK-7 no afectó al potencial de trombina extrínseca (ETP), que es la medida más sensible para el riesgo de trombosis. Por tanto, mezclas de vitamina K₂ con PUFA n-3 o aceite marino combinan los efectos beneficiosos de ambas clases de compuestos e incluso funcionaron sinérgicamente en modelos animales y voluntarios humanos. En dosis de 100 µg de MK-7 al día y superiores, el efecto reductor de ETP de los aceites marinos se revertió completamente. Debe indicarse que estas dosis de MK-7 se refieren a una ingesta de aceite marino de 5 gramos al día. A mayor consumo de aceite de kril o pescado también es mayor la dosis requerida para la interferencia con el ETP.

Salud cardiovascular

Aunque un estado pobre de vitamina K puede tener un efecto anticoagulante leve (es decir, antitrombótico), la vitamina K se requiere en otro aspecto de la salud vascular. La proteína Gla de la matriz (MGP) es una proteína dependiente de vitamina K sintetizada en la pared de los vasos arteriales. Se activa por carboxilación dependiente de vitamina K y en su forma carboxilada actúa como un poderoso inhibidor de la calcificación vascular. Usando anticuerpos específicos de la conformación, se demostró por Schurgers *et al.* (Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 25, 1629-1633 (2005)) que la aterosclerosis y la calcificación vascular están estrechamente asociadas con el estado pobre de vitamina K de la pared de los vasos, y en un ensayo clínico prospectivo L.A.J.L.M. Braam *et al.* (Thrombosis & Haemostasis 91, 373-380 (2004)) encontraron que la suplementación de vitamina K a dosis alta (1 mg/día) tenía ventajas importantes para la elasticidad vascular. Se encontró que aceite marino y PUFA n-3 no sólo disminuyen favorablemente la producción de proteínas dependientes de vitamina K en el hígado (los factores de coagulación), sino que también disminuyen el estado de vitamina K de tejidos extrahepáticos y por tanto disminuyen la activación (por carboxilación de glutamato) de proteínas dependientes de vitamina K extrahepáticas, incluyendo osteocalcina y proteína Gla de la matriz (MGP). Este es un efecto secundario no deseado de aceites marinos y PUFA n-3 con posibles resultados perjudiciales para la salud cardiovascular, para la salud ósea y para el desarrollo de enfermedades del cartílago. La carboxilación disminuida del inhibidor de la calcificación vascular MGP, por ejemplo, es un factor de riesgo

importante para la calcificación vascular, la hipertensión, el infarto de miocardio y la muerte cardiovascular.

Sorprendentemente se ha encontrado que menaquinonas superiores, en particular MK-7, en dosificaciones de entre 1 y 10 µg/día no contrarrestan el efecto anticoagulante leve de aceites marinos (tal como se miden mediante el ETP), sino que al mismo tiempo estimulan eficazmente la carboxilación de MGP hasta niveles similares a o incluso por encima del nivel en sujetos que no usan aceite marino. Esto se describe en el experimento 2 a continuación. Por tanto, MK-7 es un ingrediente esencial para beneficiarse al máximo de alimentos y suplementos alimenticios que contienen aceite marino y PUFA n-3 directamente aplicados para la salud cardiovascular.

10 Salud ósea

También se ha encontrado que los aceites marinos y PUFA n-3 tienen efectos beneficiosos sobre la salud ósea. En modelos animales experimentales tales aceites disminuyen notablemente la pérdida de hueso en ratones sometidos a ovariectomía y ratas con restricción alimentaria (D. Sun *et al.* Journal of Bone and Mineral Research 18, 1206-1216 (2003); Sun *et al.* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 68, 2613-2615 (2004)). Muchos autores han notificado que la baja ingesta de vitamina K, el mal estado de vitamina K y la alteración de la carboxilación de osteocalcina son factores de riesgo para el desarrollo y la progresión de la osteoporosis. Véanse, por ejemplo: S.L. Booth *et al.* American Journal of Clinical Nutrition 77, 512-516 (2003), P. Szulc *et al.* Journal of Clinical Investigation 91, 1769-1774 (1993), C. Vermeer *et al.* European Journal of Nutrition 43, 325-325 (2004). También se ha demostrado que el aumento de la ingesta de vitamina K da como resultado una tasa reducida de pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas (L.A.J.L.M. Braam *et al.* Calcified Tissue International 73, 21-26 (2003), M. Shiraki *et al.* Journal of Bone and Mineral Research 15, 515-521 (2000)). Las dosificaciones usadas en estos estudios oscilan entre 1 mg/día para K₁ y 45 mg/día para K₂. En este sentido, la disminución inducida por aceite marino de la carboxilación de osteocalcina debe considerarse un efecto secundario perjudicial que puede, en parte, ocultar los beneficios del aceite marino para la salud ósea. El tratamiento con dosis altas de vitamina K del que se informa puede contrarrestar este efecto secundario, pero también aniquilará el efecto anticoagulante leve que se informa que es beneficioso para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Sorprendentemente se ha encontrado que las menaquinonas superiores, en particular MK-7, en el intervalo de dosis entre 1 y 10 µg/día, no contrarrestaban el efecto anticoagulante leve de aceites marinos (tal como se mide mediante el ETP), sino que al mismo tiempo estimulaban eficazmente la carboxilación de la osteocalcina hasta niveles similares o incluso por encima del nivel en sujetos que no usan aceite marino. Esto se describe en el experimento 3 a continuación. Por tanto, MK-7 es un ingrediente esencial para beneficiarse al máximo de alimentos y suplementos alimenticios que contienen aceite marino y PUFA n-3 aplicados directamente para la salud ósea.

35 Salud del cartílago

También se ha encontrado que los aceites marinos y PUFA n-3 contrarrestan enfermedades de articulaciones degenerativas e inflamatorias, tal como se observa en la osteoartritis, la artritis reumatoide y la espondilitis anquilosante. En estudios de cultivo celular se demostró que la suplementación con PUFA n-3, pero no con PUFA n-6, provoca una disminución en aspectos tanto degenerativos como inflamatorios del metabolismo de los condrocitos, mientras que no tiene efecto sobre la homeostasis de tejido normal (C.L. Curtis *et al.*, Proc. Nutr. Soc. 61, 381-389 (2002)). También estudios basados en la población sugieren un papel positivo del aceite de pescado y PUFA n-3 para el tratamiento de la osteoartritis, la artritis reumatoide y otras enfermedades del cartílago (véanse, por ejemplo: L.G. Cleland *et al.*, Drugs 63, 845-853 (2003) y M.J. James *et al.*, Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids 68, 399-405 (2003). Tal como se describió anteriormente, aceites marinos y PUFA n-3 no sólo disminuyen la producción de proteínas dependientes de vitamina K en el hígado (los factores de coagulación), sino que también disminuyen el estado de vitamina K de tejidos extrahepáticos y por tanto disminuyen la activación (por carboxilación de glutamato) de proteínas dependientes de vitamina K extrahepáticas incluyendo la osteocalcina y la proteína Gla de la matriz (MGP). La MGP es una de las proteínas más abundantes sintetizadas por el cartílago, y la vitamina K es necesaria para su activación por carboxilación de glutamato. La baja carboxilación de MGP se ha asociado con osteoartritis, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante. Claramente, se necesita un método para contrarrestar la disminución inducida por aceite marino del estado de vitamina K en el cartílago.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que, a dosis nutricionalmente relevantes, MK-7 contrarresta aspectos potencialmente negativos de aceites marinos sobre la salud del cartílago. El hecho de que menaquinonas superiores, en particular MK-7, en el intervalo de dosis de entre 1 y 10 µg/día, no contrarrestan el efecto anticoagulante leve del aceite marino (tal como se mide mediante el ETP), sino que al mismo tiempo estimulan eficazmente tanto la carboxilación de osteocalcina como la carboxilación de MGP a niveles similares o incluso superiores al nivel en sujetos que no usan aceite marino demuestra que MK-7 es capaz de proporcionar un estado de vitamina K óptimo en el hueso, incluyendo el cartílago en las articulaciones durante la suplementación con aceite marino. Por tanto, MK-7 es un ingrediente esencial para beneficiarse al máximo de alimentos y suplementos alimenticios que contienen aceites marinos y PUFA n-3 aplicados directamente para la salud del cartílago.

65 Estudios de cultivo celular

En una serie de experimentos de cultivo celular, se investigaron la captación y el metabolismo de vitamina K en diversas condiciones. Se compararon las siguientes formas de vitamina K: K₁, MK-4, MK-7, MK-8 y MK-9. Se sometieron a prueba en tres tipos de células diferentes: las células de músculo liso vascular, la línea celular MG-63 similar a osteoblastos y la línea celular HepG2 similar a hepatocitos. En todos los experimentos, las vitaminas se usaron como una mezcla que contenía 1 μmol/l de cada vitamina.

Se encontró que en todas las células MK-7 se capta mejor que otras vitaminas K. MK-8 y MK-9 se captan algo menos, K₁ y MK-4 mucho menos.

También se encontró que, en presencia del anticoagulante warfarina, la enzima unida a membrana VKOR está bloqueada y por tanto la vitamina K no puede reciclarse. Después de la utilización, permanece en forma oxidada (epóxido K); las cantidades de epóxidos representan el grado de utilización. Se encontró que las menaquinonas de cadena larga y, en particular, MK-9 no pueden reducirse, y por tanto no puede usarse como coenzima para la carboxilasa en estas condiciones. Las vitaminas K₁ y MK-4 más solubles en agua, sin embargo, pueden usar la enzima citoplasmática DT-diaforasa para la reducción e interfieren con el tratamiento anticoagulante oral. Por tanto, las menaquinonas de cadena larga tienen menos probabilidades de interferir con el tratamiento anticoagulante oral que otras formas de vitamina K. Este es un aspecto de seguridad importante y es coherente con los experimentos en animales que se han publicado anteriormente (Craciun, A.M., Groenen-van Dooren, M.M.C.L., Thijssen, H.H.W., Vermeer, C. (1998). Induction of prothrombin synthesis by K-vitamins compared in vitamin K-deficient and in brodifacoum-treated rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1380, 75-81.

En ausencia de warfarina y en medio rico, no se forman epóxidos en absoluto. Si se disminuye la concentración de suero de ternero fetal en el medio de cultivo, el estado nutricional de las células se vuelve subóptimo. También en estas condiciones se encontraron principalmente epóxidos de MK-4 y K₁. La conclusión ahora es diferente a la del experimento con warfarina, sin embargo: las menaquinonas de cadena larga se utilizan preferentemente y compiten con éxito con K₁ y MK-4 en el nivel de reducción por VKOR. Por tanto, puede concluirse que las menaquinonas de cadena larga se usan preferentemente para la gamma-carboxilación de diversas proteínas. Esto es consecuente con estudios cinéticos enzimáticos libres de células publicados anteriormente que muestran que la constante de Michaelis (K_m) para la vitamina K disminuye con el aumento de la longitud de su cadena lateral (Buitenhuis, H.C., Soute, B.A.M., Vermeer, C. (1990). Comparison of the vitamins K₁, K₂ and K₃ as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 170-175).

Formulación de productos y dosificaciones

Ahora se ha encontrado que la vitamina K₂ y los ácidos grasos poliinsaturados pueden formularse juntos en una formulación estable con larga vida útil de almacenamiento. Por ejemplo, se mezcló MK-7 con aceite de pescado o aceite de kril en un amplio intervalo de concentraciones y estas composiciones permanecieron estables en estas condiciones durante al menos 2 semanas a 100°C, durante 6 meses a 40°C y durante 3 años a temperatura ambiente. Se muestran detalles de estos estudios en el experimento 4 a continuación.

Tal como se definió anteriormente, el término "ácido graso poliinsaturado" (PUFA) se refiere a cualquier PUFA en forma de un triglicérido, un éster fisiológicamente aceptable, un ácido graso libre o una sal fisiológicamente aceptable del mismo. Composiciones preferidas de PUFA y menaquinonas según la presente invención son PUFA combinados principalmente con MK-7. Una composición más preferida de sustancias de PUFA y MK según la presente invención son composiciones en las que al menos el 95% de todos los compuestos de vitamina K₂ en la composición, según análisis de HPLC, es MK-7 con MK-6 como la principal impureza de vitamina K₂. Una razón habitual entre MK-7 y MK-6 en composiciones según la presente invención está en el intervalo de entre 90 a 10 y 95 a 5.

Composiciones preferidas de un compuesto dentro de la clase de compuestos de vitamina K₂ y PUFA según la presente invención son composiciones que comprenden un PUFA seleccionado de PUFA n-3. PUFA n-3 más preferidos según la presente invención son ácido eicosapentaenoico (EPA) que es un ácido 20:5 y ácido docosahexaenoico (DHA) que es un ácido 22:6.

Un componente incluso más preferido de PUFA n-3 en los productos según la presente invención es una combinación de EPA y DHA. La razón más preferida de EPA : DHA está dentro del intervalo de 2:1 a 1:2.

En la composición más preferida según la presente invención, EPA y DHA están en forma de triglicéridos o ésteres etílicos.

Las formulaciones de los productos y kits de la invención se administran preferiblemente de manera sistemática (por ejemplo, por vía oral o parenteral). La forma de dosificación según la presente invención es una forma de dosificación oral, es decir, cápsulas y comprimidos. La dosificación y la vía de administración dependerán de factores tales como la edad y el sexo del individuo, la gravedad y naturaleza del trastorno o enfermedad, y similares, y pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica, normalmente un médico, o debe seguirse el prospecto de instrucciones del fabricante, que normalmente acompaña al producto.

Pueden prepararse comprimidos y cápsulas de cualquier manera convencional conocida en la técnica. Las cápsulas pueden, por ejemplo, ser cápsulas de gelatina blanda o dura que, además de compuestos de vitamina K₂ o vitamina K₂ y ácido graso poliinsaturado, comprenden componentes farmacéuticamente aceptables inactivos, por ejemplo, almidón. Los comprimidos según la presente invención pueden, por ejemplo, prepararse por compresión directa o por compresión de gránulos usando máquinas de comprimidos convencionales. Los comprimidos según la presente invención, además de compuestos de vitamina K₂ o vitamina K₂ y ácidos grasos insaturados, pueden comprender componentes inactivos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales agentes pueden ser, por ejemplo, derivados de celulosa y estearato de magnesio. Los comprimidos según la presente invención pueden recubrirse con un recubrimiento resistente gástrico, por ejemplo, acetato-ftalato de celulosa.

Las formas de dosificación oral, cápsulas y comprimidos, según la presente invención, tienen cada una un peso de entre 100 mg y 2 gramos. La cantidad de compuestos de vitamina K₂ en cada comprimido o cápsula puede variar en un amplio intervalo, dependiendo, entre otras cosas, de factores tales como la gravedad y naturaleza de la enfermedad o trastorno, y la condición, sexo y edad del paciente. La cantidad de un compuesto de vitamina K₂ dentro de la clase de compuestos de vitamina K₂ en un comprimido o cápsula están entre 1 y 10 µg, las dosificaciones de MK-7 están entre 1-10 µg al día.

La cantidad de ácido graso insaturado en cada comprimido o cápsula también puede variar dependiendo de la naturaleza del ácido graso insaturado, la gravedad y naturaleza de la enfermedad, la edad del paciente y la frecuencia de administración del comprimido o cápsula. La cantidad de ácido graso insaturado en cada comprimido o cápsula está normalmente entre 300 y 1200 mg, preferiblemente entre 400 y 1000 mg, lo más preferiblemente entre 500 y 900 mg.

Los datos presentados muestran que, a dosificaciones de hasta 10 µg al día, pueden combinarse aceite marino (a una dosis de aproximadamente 5 g) y MK-7 sin interferir con el efecto anticoagulante leve del aceite marino. Por tanto, dosificaciones de MK-7 de entre aproximadamente 1 y al menos 10 µg (evidentemente, cuanto mayor mejor dentro de dicho intervalo) han demostrado ser beneficiosas cuando se administra a un ser humano o animal. Dosificaciones de hasta 100 µg al día no son aplicables para el propósito descrito en el presente documento, ya que se encontró que estas dosificaciones contrarrestan el efecto de la warfarina, que es un inhibidor incluso más fuerte de la carboxilación del factor de coagulación de la sangre que los PUFA n-3. Véase, Schurgers, L.J., Teunissen, K.J.F., Hamulyák, K., Knapen, M.H.J., Vik, H., Vermeer, C. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K₁ and natto-derived menaquinone-7. *Blood* 109 (2007) 3279-3283.

Se entenderá que las dosificaciones de vitamina K y aceites marinos también pueden variar dependiendo de la variedad y calidad del aceite marino. Por tanto, se recomienda usar mezclas de aceites marinos para mantener una razón constante en las composiciones

También se entenderá que la vitamina K₂ o un compuesto dentro de la clase de compuestos de vitamina K₂ también puede formularse por separado e independientemente de uno o más ácidos grasos poliinsaturados (incluyendo aceite de pescado y aceite de kril), por ejemplo en una composición farmacéutica o una composición nutricional (suplemento alimenticio). Composiciones farmacéuticas adecuadas y dosificaciones típicas son similares a las descritas anteriormente o las conoce un experto en la técnica. Se describen composiciones nutricionales adecuadas y dosificaciones típicas, por ejemplo en el documento EP1153548.

Las composiciones según la presente invención pueden comprender opcionalmente otros componentes farmacéuticos o nutricionalmente activos; por ejemplo, vitaminas como la vitamina D o derivados de la vitamina D; compuestos farmacológicos activos tales como bisfosfonatos, alendronato normalmente; o fármacos cardiovasculares, tales como inhibidores de ACE, por ejemplo enalapril, antagonistas del receptor de angiotensina II, por ejemplo losartán, betabloqueantes, por ejemplo, propranolol, componentes reductores de lípidos plasmáticos, tales como estatinas, simvastatina normalmente, y otros fármacos.

El uso de MK-7 es generalmente el más preferido, tal como se entenderá a partir de la divulgación en el presente documento. También se describe MK-9, tanto por sus propiedades beneficiosas y prometedoras como por su disponibilidad dado que se fabrica fácilmente de manera sintética.

La presente invención se describirá ahora además con referencia a los siguientes ejemplos y trabajo experimental.

Ejemplo 1. Cápsula que comprende éster etílico de EPA, éster etílico de DHA y MK-7 (no dentro del alcance de la invención)

Un aceite que comprende el 97% de MK-7 y el 3% de MK-6 se mezcla con éster etílico de EPA y éster etílico de DHA. Se añade alfa-tocoferol, y con el aceite resultante se llenan 5 cápsulas de gelatina dura.

Cada cápsula contiene:

MK-7	97 µg
MK-6	3 µg
Éster etílico de EPA	463 mg;
Éster etílico de DHA	375 mg
Alfa-tocoferol	4 mg

Ejemplo 2. Aceite de hígado de bacalao que comprende vitamina K₂

5 La vitamina K₂ se disuelve en aceite de hígado de bacalao (de EPAX, Noruega) y se llenan botellas de vidrio verdes (250 ml) con un sellado metálico. Las botellas se etiquetan como "Vitamin K₂ tran" para su venta en el mercado noruego.

Una dosis diaria (5 ml) de este producto contiene:

Vitamina A:	250 µg
Vitamina D:	10 µg
Vitamina K ₂ (MK-7):	10 µg
Aceite de pescado:	1,2 g, de los cuales DHA fueron 0,4 g y EPA fueron 0,6 g
Alfa-tocoferol:	4 mg

10

Ejemplo 3: Cápsula que comprende aceite de kril y MK-7. (No dentro del alcance de la invención)

15 Aceite de kril que comprende ácidos grasos poliinsaturados en forma de triglicérol, fosfolípidos y otros componentes naturales (obtenidos de Enzymotec, Israel) se mezcla con MK 7 y alfa-tocoferol. Con la composición de aceite resultante se llenan cápsulas de gel blando o gelatina dura o se prepara como granulado o disolvente que contiene aceite.

Cada cápsula contiene:

MK-7	97 µg
MK-6	3 µg
Aceite de kril	700 mg
Alfa-tocoferol	4 mg

20

Ejemplo 4: Aceite de kril que comprende vitamina K₂ (no dentro del alcance de la invención)

25 La vitamina K₂ se disuelve en aceite de kril y se llenan botellas de vidrio (250 ml) con sellado metálico. Las botellas se etiquetan como "Kriloljetran med Vitamin K" para su venta en el mercado noruego o "Kril oil including vitamin K" para el mercado de EE.UU. y Reino Unido. Una dosis diaria (5 ml de aceite de kril) contiene en el intervalo de entre 5 y 500 µg de vitamina K₂.

Ejemplo 5: Pienso para peces que comprende aceite de kril y vitamina K₂ (no dentro del alcance de la invención)

30 La vitamina K₂ (100 mg) se disuelve en aceite de kril (1 kg). Se tritura el pienso para peces (de Skretting AS, Stavanger, Noruega). Se mezcla pienso para peces triturado (20 kg) con aceite de kril que comprende vitamina K₂ (1 kg) usando una mezcladora. Se añade agua y se tamiza el material semihúmedo (3 mm) y se prueba durante 24 horas a 40°C para obtener un granulado de pienso para peces.

35 El granulado de pienso contiene aproximadamente el 5% aceite de kril y 2-100 ppm de vitamina K₂.

Ejemplo 6: Cápsulas de MK-8 (no dentro del alcance de la invención)

40 Con un aceite que comprende MK-8 (el análisis de HPCL muestra MK-8 superior al 70% de la vitamina K₂ total) se llenan cápsulas de gelatina blanda. Cada cápsula contiene 5 µg de MK 8.

Ejemplo 7: Cápsulas que comprenden éster etílico de EPA, éster etílico de DHA y mezcla de MK-8, MK-9 y MK-10. (No dentro del alcance de la invención)

45 Un aceite que comprende una mezcla de MK-8, MK-9, MK-10 se mezcla con éster etílico de EPA y éster etílico de DHA. Se añade alfa-tocoferol y con el aceite resultante se llenan cápsulas de gelatina dura.

Cada cápsula contiene:

MK-8, MK-9, MK-10	50 µg
Éster etílico de EPA	463 mg

Éster etílico de DHA	375 mg
Alfa-tocoferol	4 mg

Ejemplo 8: Aceite de hígado de bacalao que comprende MK8 (no dentro del alcance de la invención)

5 Se disuelve MK8 (más del 65% según el análisis de HPLC) en aceite de hígado de bacalao y se llenan botellas de vidrio verdes (250 ml) con sellado metálico. Las botellas se etiquetan como "Vitamin K₂ tran" para su venta en el mercado noruego.

Una dosis diaria (5 ml) de este producto contiene:

Vitamina A	250 µg
Vitamina D	10 µg
MK-8	10 µg
Ácidos grasos omega-3	1,2 g, de los cuales DHA fueron 0,6 g y EPA fueron 0,4 g
Acetato de DL-alfa-tocoferilo	6 mg

10

Experimento 1: El grado de carboxilación de osteocalcina en osteoartritis, osteopatía y artritis reumatoide.

15 Se reclutaron tres grupos de pacientes y se compararon con sujetos sanos de edad y sexo coincidentes. El estado de vitamina K de cada sujeto se registró midiendo la proporción entre osteocalcina carboxilada y no carboxilada (razón de cOC/ucOC), que es el biomarcador más sensible para el estado de vitamina K extrahepática (B. Panis *et al.*, Bone 2006; 39:1123-1129). Los pacientes que padecen osteoartritis y condropatía eran relativamente jóvenes y se compararon con un grupo de referencia joven (A), los pacientes con artritis reumatoide eran más mayores y por tanto se compararon con un grupo de referencia más mayor (B). Se obtuvieron ensayos específicos de conformación para osteocalcina de Takara (Japón). Véase la tabla 1 a continuación.

20

Este experimento demuestra que el estado de vitamina K (expresado como el grado de carboxilación de la osteocalcina circulante) disminuye significativamente en sujetos con osteoartritis, condropatía y artritis reumatoide en comparación con la población sana.

25 Tabla 1

	Control A	Control B	Osteoartritis	Condropatía	Artritis reumatoide
Edad (años)	32	45	34	31	48
Género (% de hombres)	48	51	42	54	45
Número por grupo	30	30	27	49	29
Razón de cOC/ucOC	1,39	1,28	1,04	0,71	0,38
Intervalo	0,52-2,49	0,48-2,34	0,14-2,0	0,12-1,95	0,16-1,67
Diferencia Cntr A			P < 0,05	P < 0,005	
Diferencia Cntr B					P < 0,002

30 Experimento 2: Carboxilación de MGP durante la ingesta de aceite de pescado a largo plazo y los efectos de la ingesta de MK-7 a 10 µg/día.

35 Veinte varones sanos (43 ± 8 años de edad) se inscribieron en el estudio. El índice de masa corporal medio fue de 25,1 ± 3,5 kg/m². Todos los sujetos recibieron 5 gramos de aceite de pescado (que contenía el 35% de EPA, el 25% de DHA y el 10% de otros PUFA n-3) al día durante 4 meses. Durante los últimos 3 meses del estudio, todos los voluntarios recibieron adicionalmente una cápsula de gel blando al día, proporcionando 10 µg de MK-7. Se recogieron muestras de sangre en citrato cada mes para preparar plasma rico en plaquetas. El potencial de trombina endógena (ETP), que refleja la actividad de trombina total durante la coagulación, se monitorizó según H.C. Hemker *et al.* (Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 2003;33:4-15). Se monitorizaron las especies de proteína Gla de la matriz (MGP) carboxiladas y no carboxiladas usando ELISA de tipo sándwich basándose en anticuerpos específicos de conformación obtenidos de VitaK BV (Maastricht, Países Bajos) con plasma normal agrupado como referencia. Véase la figura 1. La razón entre MGP carboxilada y no carboxilada se toma como medida para el estado de vitamina K vascular. Todos los valores se expresan como un porcentaje de aquellos en el plasma de referencia agrupado. El cambio en ETP fue estadísticamente significativo (p<0,05) después de un mes y permaneció así durante los meses posteriores. El cambio en la carboxilación de MGP también fue significativo después de un mes, pero la significación se perdió durante los meses 2, 3 y 4.

Este experimento demuestra que la hipocoagulabilidad inducida por aceite de pescado no se contrarresta por las dosis bajas de MK-7 requeridas para mantener la carboxilación de MGP en su nivel original.

50 Experimento 3: Carboxilación de osteocalcina durante la ingesta de aceite de pescado a largo plazo y los efectos de la ingesta de MK-7 a 10 µg/día.

En el mismo experimento descrito anteriormente, también se recogió suero, en el que se monitorizaron especies de osteocalcina carboxiladas y no carboxiladas usando los kits de osteocalcina específicos de conformación de Takara (Japón). El cambio en la carboxilación de osteocalcina fue significativo después de un mes, pero la significación se perdió durante los meses 3 y 4. Véase la figura 2. Este experimento demuestra que la hipocoagulabilidad inducida por aceite de pescado no se contrarresta por las dosis bajas de MK-7 requeridas para mantener la carboxilación de osteocalcina en su nivel original.

Experimento 4: Estabilidad de MK-7 en aceite de pescado y aceite de kril.

Se prepararon composiciones tal como se describe en los ejemplos 2 y 4 (MK-7 disuelta en aceite de pescado y aceite de kril, respectivamente) hasta una concentración final de 2 µg de MK-7 por g de aceite. Se prepararon muestras en botellas de vidrio selladas y se mantuvieron en un lugar oscuro a temperatura ambiente, 40°C y 100°C, respectivamente. A tiempos regulares, se tomaron muestras y se analizaron para determinar su contenido de MK-7. Véase la figura 3. No se observó pérdida de MK-7, incluso después de 2 semanas a 100°C. Este experimento demuestra la excepcional estabilidad de MK-7 disuelta en aceite de pescado y aceite de kril.

Experimentos 5-9: Estudios de cultivo celular

Esta serie de experimentos de cultivo celular describen la captación de vitamina K y el metabolismo en diversas condiciones. Se compararon las siguientes formas de vitamina K: K₁, MK-4, MK-7, MK-8 y MK-9. Se sometieron a prueba en tres tipos de células diferentes: las células de músculo liso vascular, la línea celular MG-63 similar a osteoblastos y la línea celular HepG2 similar a hepatocitos. En todos los experimentos las vitaminas se usaron como una mezcla que contenía 1 µmol/l de cada vitamina. Todos los datos son las medias de experimentos por triplicado.

La composición (v/v) de los diversos medios de cultivo fue:

	HepG2	VSMC	MG63
EMEM (de Sigma)	87%	78%	87%
Suero de ternero fetal	10%	20%	10%
Penicilina/estreptomicina	1%	1%	1%
L-glutamina	1%	1%	1%
Piruvato de sodio	-	-	1%
Aminoácidos no esenciales	1%	-	-

Experimento 5

En el presente documento se ha comprobado la estabilidad de las diversas formas de vitamina K (1 µM de cada) en los tres medios de cultivo celular sin células presentes. Los datos se proporcionan en la figura 4. Conclusión: En los tres medios de crecimiento, las vitaminas K₁, MK-7, MK-8 y MK-9 fueron bastante estables durante 48 horas, mientras que MK-4 mostró una disminución hasta valores de entre el 70 y 80% del valor inicial durante las primeras 24 horas y entre el 60 y 70% del valor inicial después de 48 horas. El motivo de esta disminución aún no está claro, pero las afecciones deben elegirse de tal manera que la desaparición de MK-4 no influya en los datos para la captación celular de vitamina K. Para mantener al mínimo la pérdida de MK-4, todos los experimentos adicionales se realizaron durante no más de 24 horas.

Experimento 6

Las células se hicieron crecer hasta una confluencia del 80%, después de lo cual se añadió vitamina K en diferentes concentraciones (véanse las figuras 5A-C). La concentración de vitamina K añadida se proporciona como nmol/l de medio de cultivo, la vitamina K recuperada se proporciona como nmol/g de proteína celular. Obsérvense las diferentes escalas para cada vitamina.

Conclusiones:

1. Las curvas de dosis-respuesta para todas las vitaminas son horizontales entre 500 y 1000 nmol/l; por tanto se trabaja en condiciones de saturación e incluso la disminución de MK4 (actualmente no entendida) no afectará a los resultados de estudios adicionales.

2. Sorprendentemente, hubo una enorme diferencia en la captación de vitamina K por las diversas células, proporcionando células de músculo liso vascular los valores más altos y MG63 los más bajos. Esto se demuestra en la figura 5D, donde se representó gráficamente la captación de MK-7 en los tres tipos de células a la misma escala.

3. En todos los sistemas, pero especialmente en las células extrahepáticas, MK-7 se captó sorprendentemente mejor que las otras vitaminas K. Esto se demuestra adicionalmente en los siguientes experimentos.

Experimento 7

La captación celular de vitaminas K se siguió en el tiempo. En todos los casos, se añadió una mezcla de las diversas vitaminas K (concentración final de 1 $\mu\text{mol/l}$ en el medio de cultivo) a las células después de haberse hecho crecer hasta el 80% de confluencia. Los datos se proporcionan en la figura 6. Sorprendentemente, MK-7 se captó mejor que cualquiera de las otras vitaminas K. El mecanismo detrás de esta preferencia celular por MK-7 no está del todo claro.

Conclusiones:

1. La captación se nivela después de 4 h y alcanza niveles de meseta a las 8 h;
2. La tasa de captación y el valor de los niveles de meseta son diferentes para cada vitamina;
3. MK-7 se capta mejor que cualquiera de las otras vitaminas en los tres sistemas celulares.

Experimento 8

En condiciones normales, todas las formas de vitamina K se captan en su forma de quinona, y se reducen a la hidroquinona antes de ser activas como cofactor para la enzima gammaglutamilcarboxilasa. Durante la carboxilación se oxidan para dar epóxidos, que pueden reducirse mediante la enzima unida a membrana VKOR. VKOR forma la diana de fármacos conocidos como derivados de cumarina, que inactivan la enzima y por tanto bloquean el reciclaje de epóxidos de K. Las quinonas de vitamina K (y no los epóxidos) pueden reducirse mediante un segundo sistema enzimático, conocido como DT diaforasa. Por tanto, la acción de los derivados de cumarina, tales como la warfarina, se antagoniza por vitamina K adicional. Además, cada molécula de vitamina K que se usa en presencia de warfarina, se convierte en el epóxido correspondiente, que no puede usarse ninguna vez más. Por tanto, la concentración de epóxido K es una medida directa de la cantidad de vitamina K usada durante el tratamiento con warfarina. Los derivados de cumarina se usan ampliamente como anticoagulantes orales; su modo de acción se basa en la inhibición de la carboxilación de factores de coagulación en el hígado. La interferencia con derivados de cumarina es por tanto un riesgo potencial de los suplementos de vitamina K. Por tanto, se ha investigado si y en qué grado las diversas vitaminas K interfieren con la warfarina. En el estudio descrito, se añadieron 10 $\mu\text{mol/l}$ de warfarina a los medios de cultivo 18 h antes de añadir vitamina K. También durante la incubación con vitaminas K esta concentración de warfarina estaba presente. Los resultados se muestran en la figura 7.

En la línea celular MG63 solo pudo identificarse el epóxido de MK-4 (MK4-O), en los otros sistemas se detectaron más vitaminas K en su forma de epóxido. En todos los casos es obvio que las formas más solubles en agua de la vitamina K (MK-4 y K₁) son capaces de sortear el efecto de la warfarina, mientras que al aumentar la hidrofobicidad la interferencia con warfarina pasa a ser menor. El tipo celular más importante de esta serie es la línea celular HepG2, dado que esta representa los hepatocitos, el lugar donde se sintetizan los factores de coagulación sanguínea. Es obvio a partir de la figura 7 que hay una correlación inversa entre la interferencia con warfarina y la hidrofobicidad de las especies de vitamina K. Apenas se formaron epóxidos de MK-9. En este momento, MK-10 y MK-11 no están disponibles comercialmente, pero puede esperarse por extrapolación que estas menaquinonas de cadena larga no interferirán en absoluto, y pueden administrarse de forma segura como suplemento incluso a pacientes en tratamiento anticoagulante oral (cumarina).

Conclusiones:

1. Las vitaminas K de cadena corta K₁ y MK-4 interfieren sustancialmente con la warfarina, mientras que la interferencia de las menaquinonas de cadena larga es menor.
2. La utilización de vitaminas K en presencia de warfarina está inversamente relacionada con la longitud de la cadena lateral: MK-7 > MK-8 > MK-9.
3. Basándose en estos experimentos, puede esperarse que MK-9 y MK-10 no interferirán en una forma clínicamente relevante con el tratamiento anticoagulante oral.

Experimento 9

Después de haber demostrado que las menaquinonas de cadena larga se absorben bien por las diversas células, y que apenas se usan durante el tratamiento con warfarina, queda por demostrar que estas especies de vitamina K se usan activamente en condiciones no inhibidas (libres de warfarina). Dado que en condiciones de cultivo celular convencional no se forman epóxidos, se han aplicado condiciones de crecimiento subóptimas disminuyendo el suero de ternero fetal en el medio de cultivo hasta el 1% (v/v). Esto dio como resultado una formación de epóxido sustancial. Los resultados se muestran en la figura 8. Una vez más, se encontró que los epóxidos de vitamina K de cadena corta se acumulaban, especialmente en las células de músculo liso vascular MG63. Se interpretaron estos datos como un reciclaje preferente de las menaquinonas de cadena larga en condiciones de inanición celular. Alternativamente, estos

5 datos pueden explicarse como que no hubo utilización de las menaquinonas de cadena larga. Esto se descartó en un experimento en el que VSMC y MG63 se hicieron crecer al 1% de FCS y con una sola forma de vitamina K presente (1 $\mu\text{mol/l}$). Utilizando kits de prueba específicos de conformación de osteocalcina carboxilada (Takara, Japón) y proteína Gla de la matriz carboxilada (VitaK, Países Bajos), se encontró que en células de músculo liso vascular la carboxilación MGP se estimuló mediante vitamina K₁, MK-4 y MK-7 hasta alcanzar los siguientes niveles de MGP en el medio de cultivo después de 24 horas de incubación:

- Proteína Gla de la matriz carboxilada en presencia de K₁: 12,4 ng/ml, MK-4: 10,7 ng/ml, MK-7: 13,5 ng/ml.
- 10 ➤ Osteocalcina carboxilada en presencia de K₁: 3,2 ng/ml, MK-4: 4,1 ng/ml, MK-7: 3,9 ng/ml.

Estos datos demuestran que menaquinonas de cadena larga, así como K₁ y MK-4, son cofactores activos para la carboxilasa dependiente de vitamina K, y que la ausencia de epóxidos debe ser el resultado de un reciclaje preferente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Producto farmacéutico o nutricional para administración oral que comprende menaquinona-7 (MK-7) en combinación con al menos uno de un ácido graso poliinsaturado, o bien purificado o bien en forma de un aceite marino, en el que dicho producto es una formulación de comprimido o formulación de cápsula y en el que MK-7 está en el intervalo de entre 1-10 µg.
- 10 2. Producto farmacéutico o nutricional que comprende MK-7 en combinación con al menos uno de un ácido graso poliinsaturado, o bien purificado o bien en forma de un aceite marino, para su uso en un método de prevención o tratamiento de al menos una de enfermedades o trastornos cardiovasculares, óseos y cartilagosos en seres humanos y animales, en el que la dosificación de MK-7 está en el intervalo de entre 1-10 µg al día.
- 15 3. Producto según la reivindicación 1 para su uso en un método de prevención o tratamiento de al menos una de enfermedades o trastornos cardiovasculares, óseos y cartilagosos.
- 20 4. Producto según la reivindicación 1 para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de al menos una de aterosclerosis, arteriosclerosis, osteoporosis, osteoartritis o una enfermedad inflamatoria o degenerativa del cartílago.
- 5 5. Producto según la reivindicación 1 que se proporciona en forma de un kit.
- 25 6. Producto según la reivindicación 1, en el que dicho ácido graso poliinsaturado está en forma de aceite de pescado o aceite de kril, o en el que dicho ácido graso poliinsaturado es un ácido graso poliinsaturado n-3, preferiblemente EPA o DHA o una mezcla de los mismos, o en el que dicho ácido graso es una combinación de EPA y DHA en forma de sus triglicéridos o ésteres etílicos.
- 30 7. Producto para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho ácido graso poliinsaturado está en forma de aceite de pescado o aceite de kril, o en el que dicho ácido graso poliinsaturado es un ácido graso poliinsaturado n-3, preferiblemente EPA o DHA o una mezcla de los mismos, o en el que dicho ácido graso es una combinación de EPA y DHA en forma de sus triglicéridos o ésteres etílicos.
- 35 8. Producto según las reivindicaciones 1 o 6, en el que dicho MK-7 y dicho ácido graso se proporcionan en la misma composición farmacéutica.

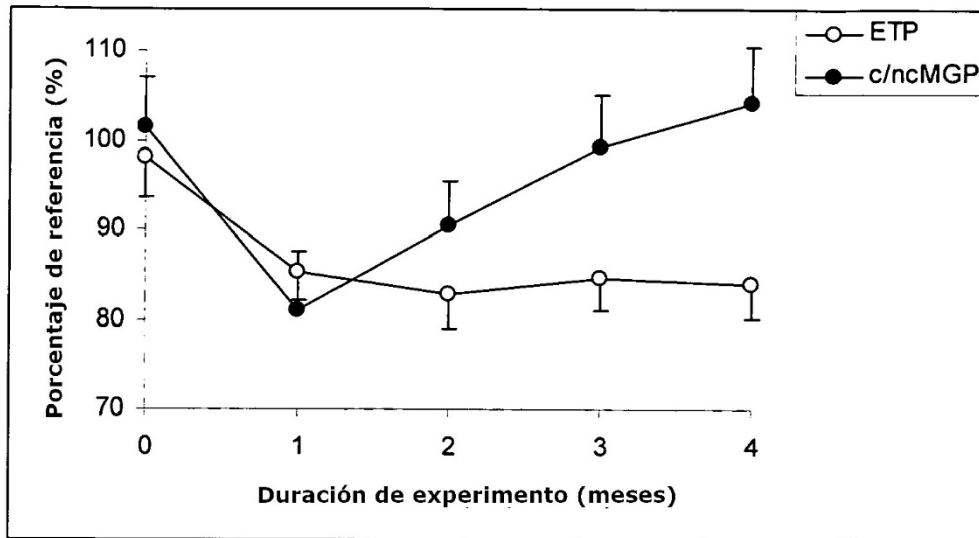


Fig. 1

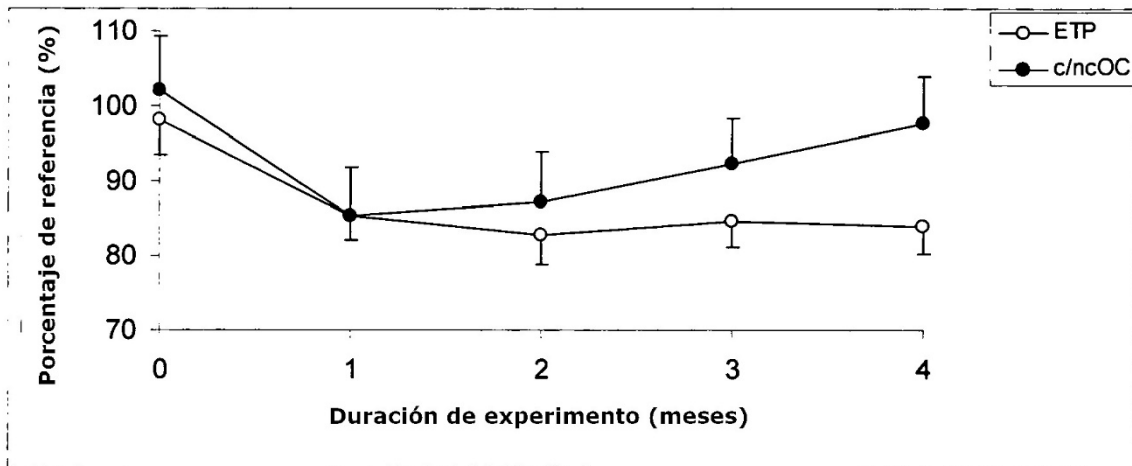


Fig. 2

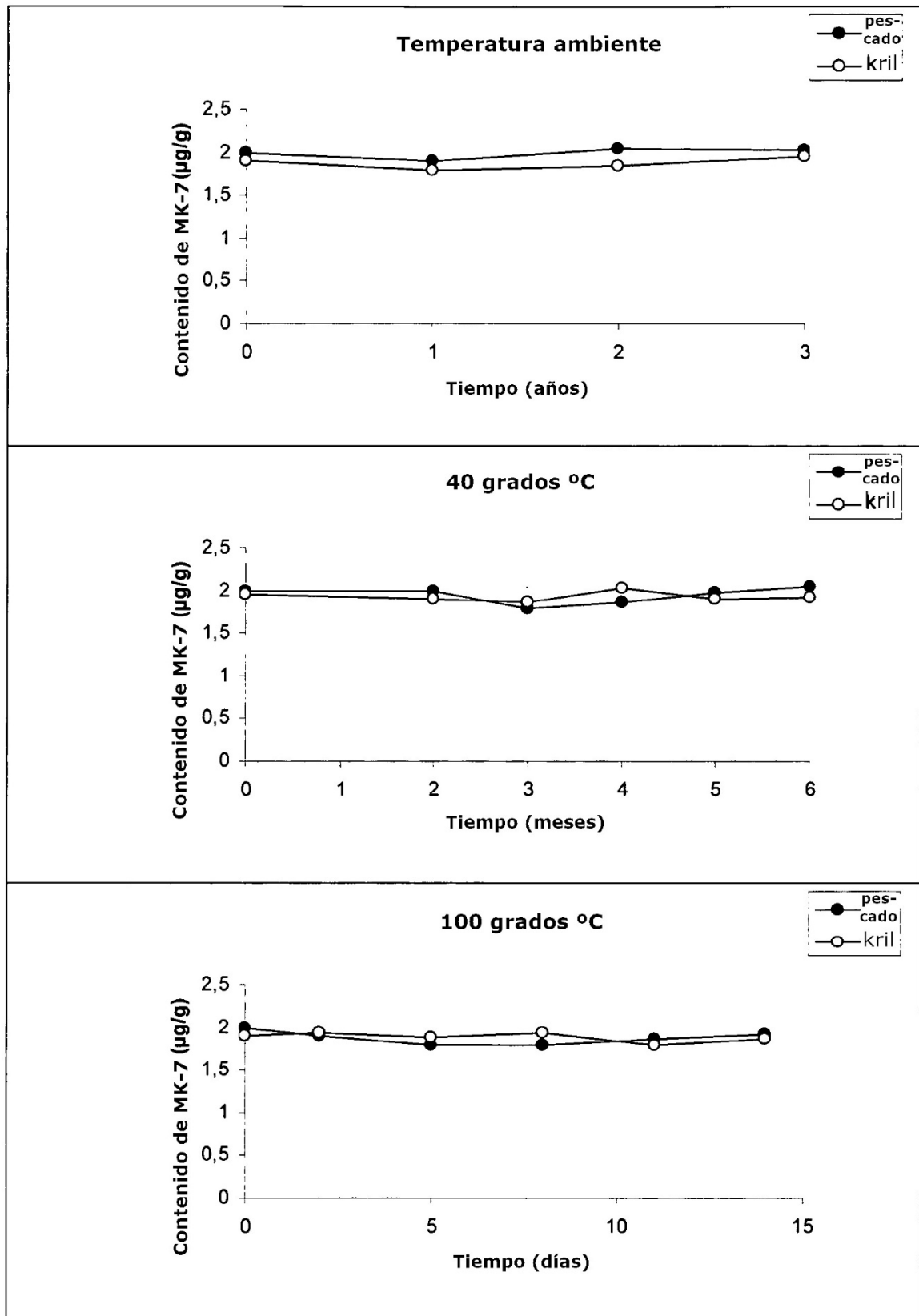


Fig. 3

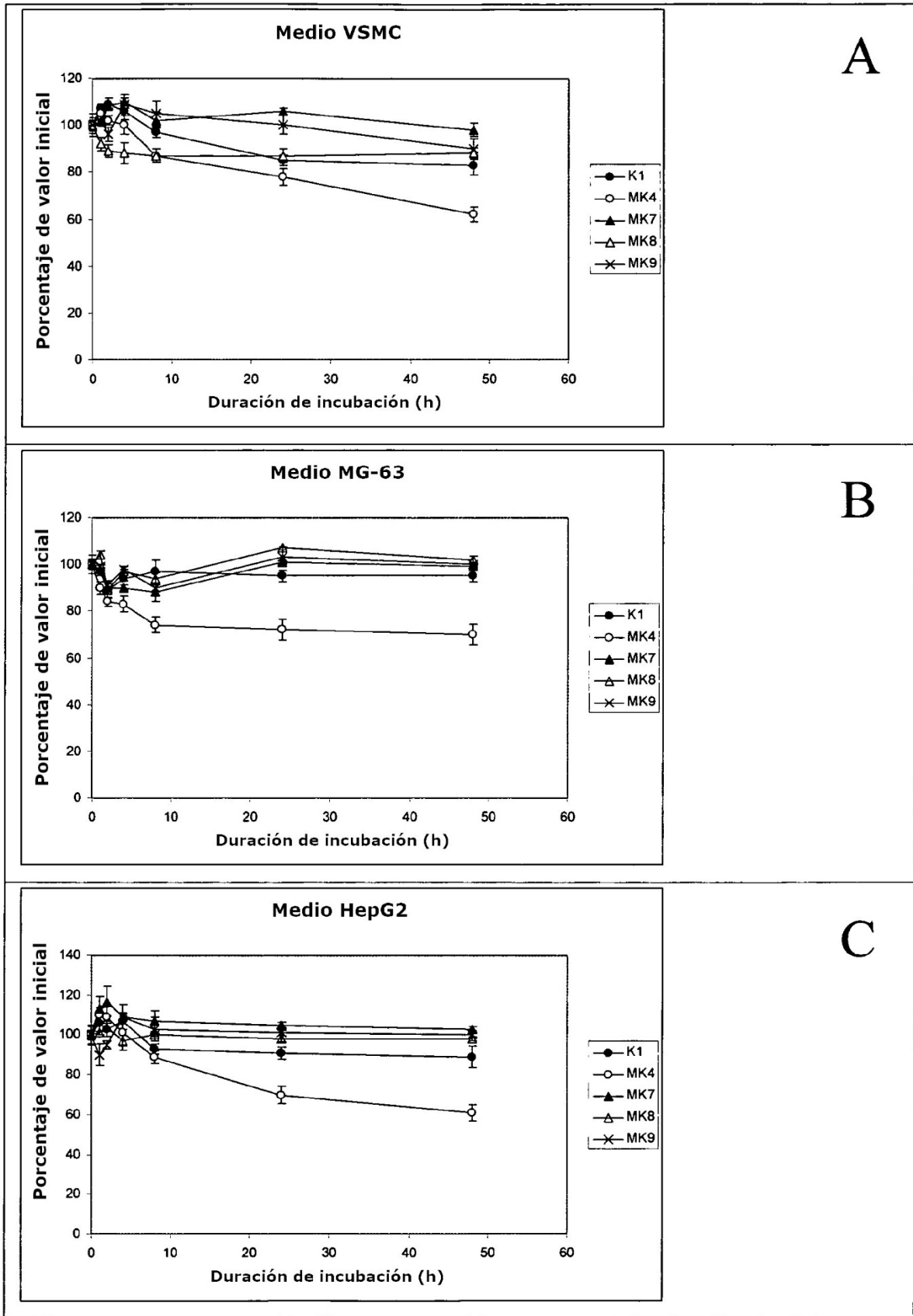


Fig. 4

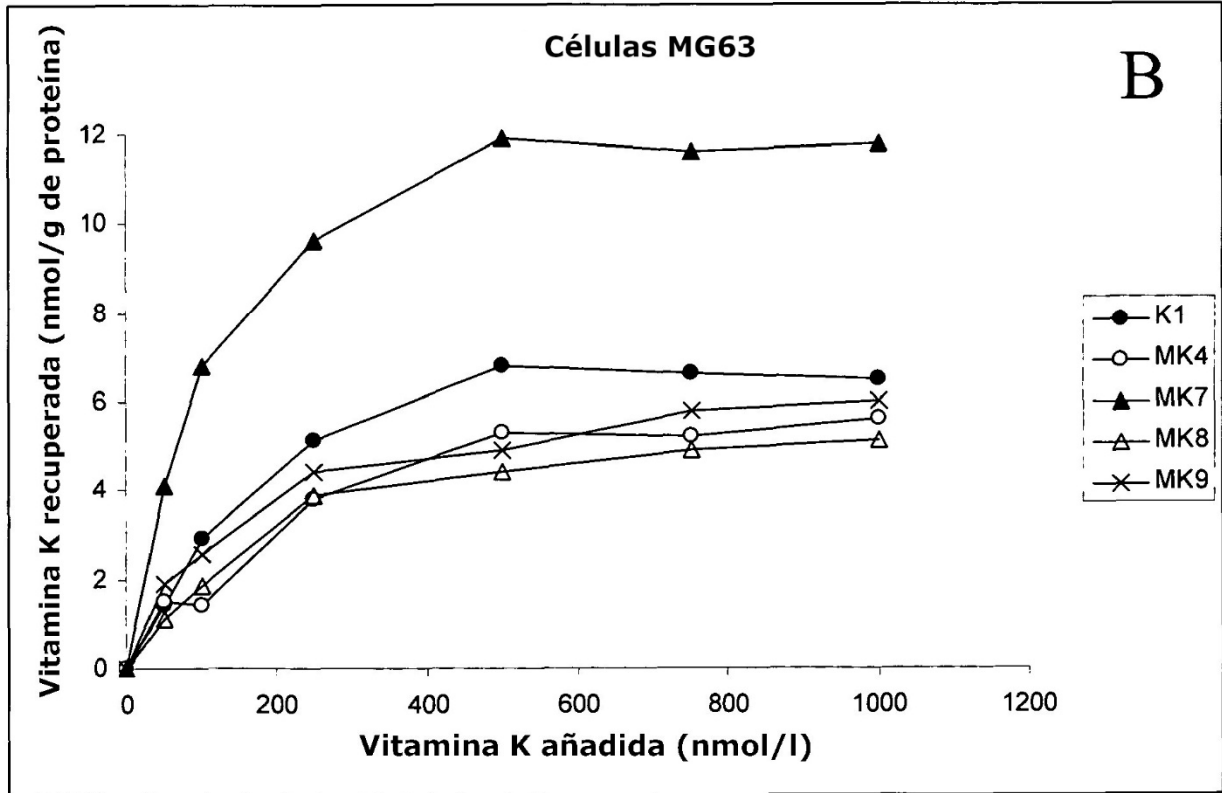
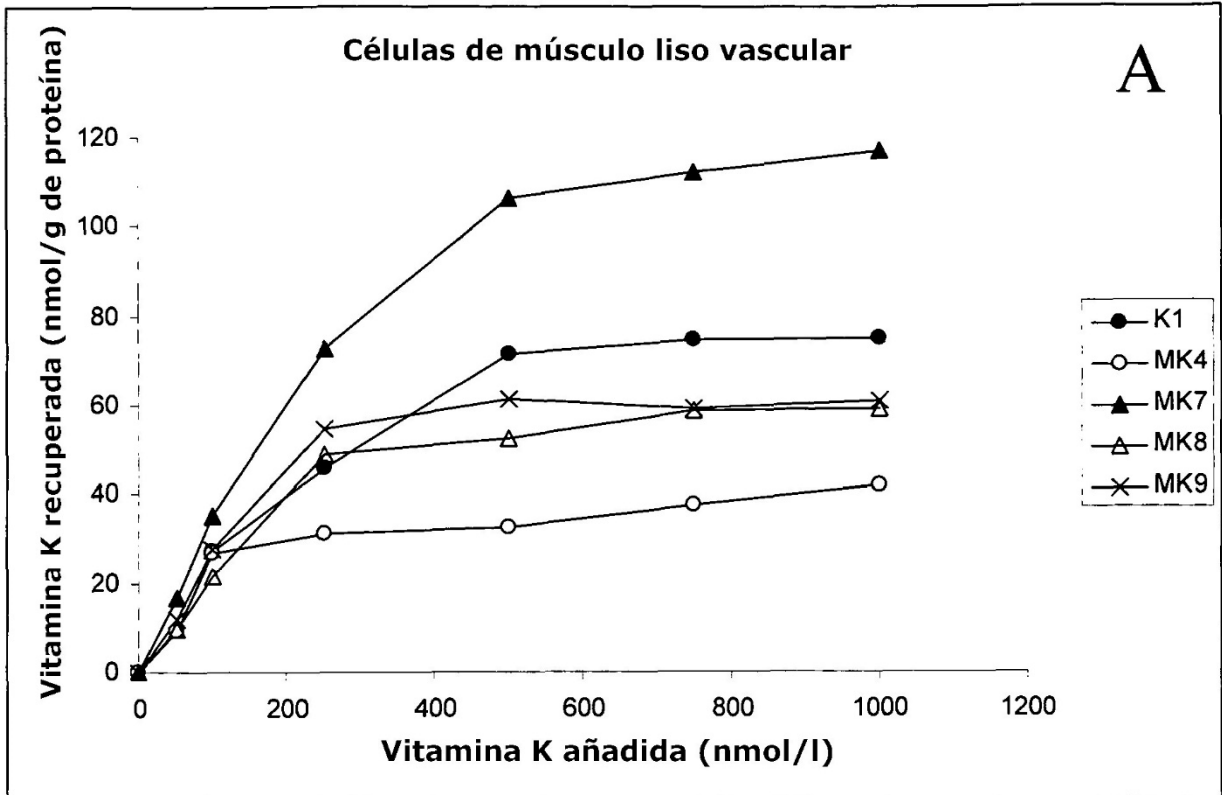


Fig. 5

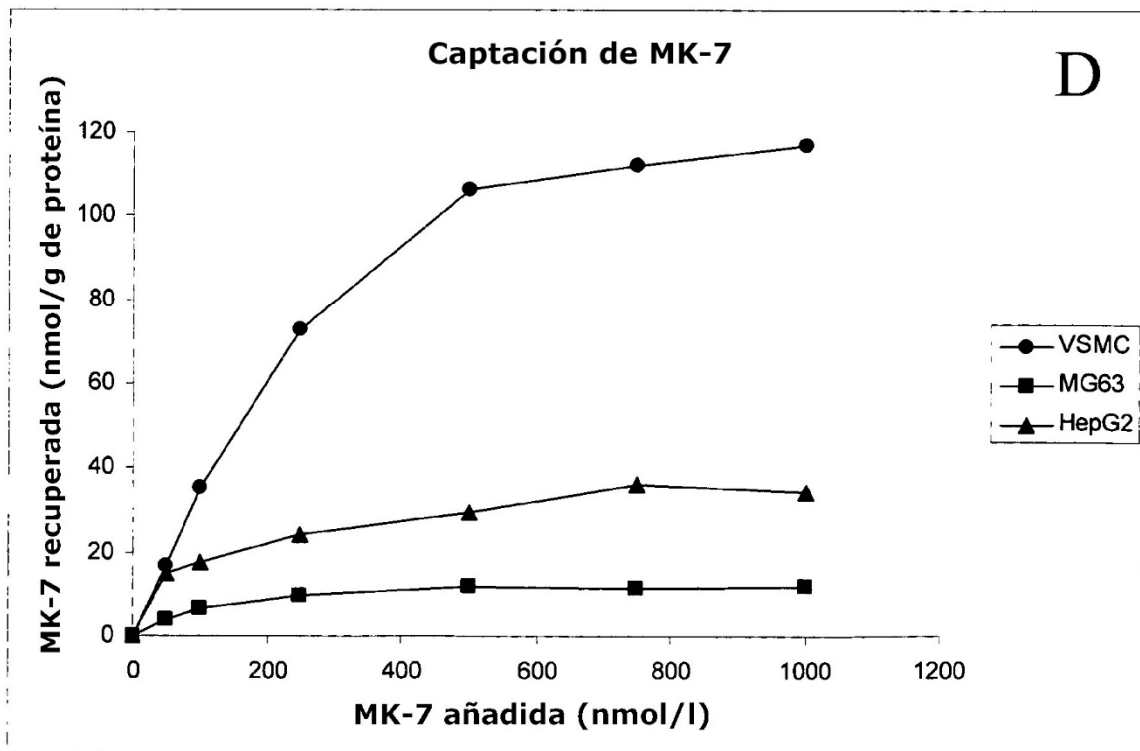
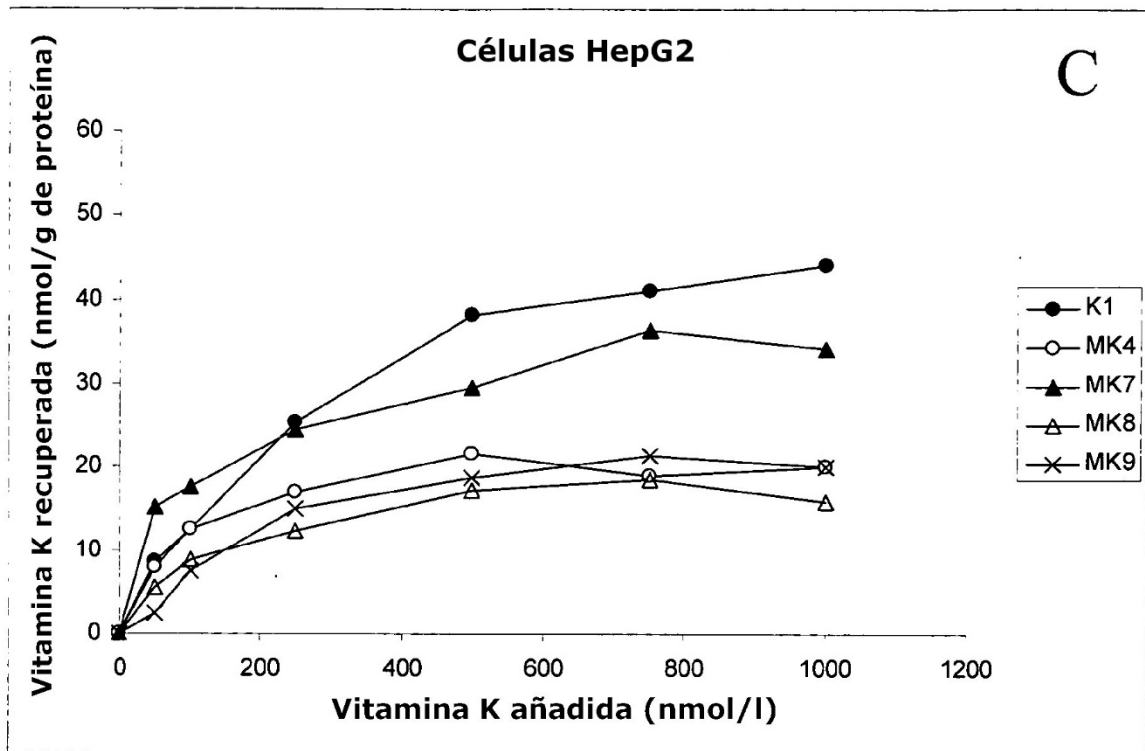


Fig. 5 (continuada)

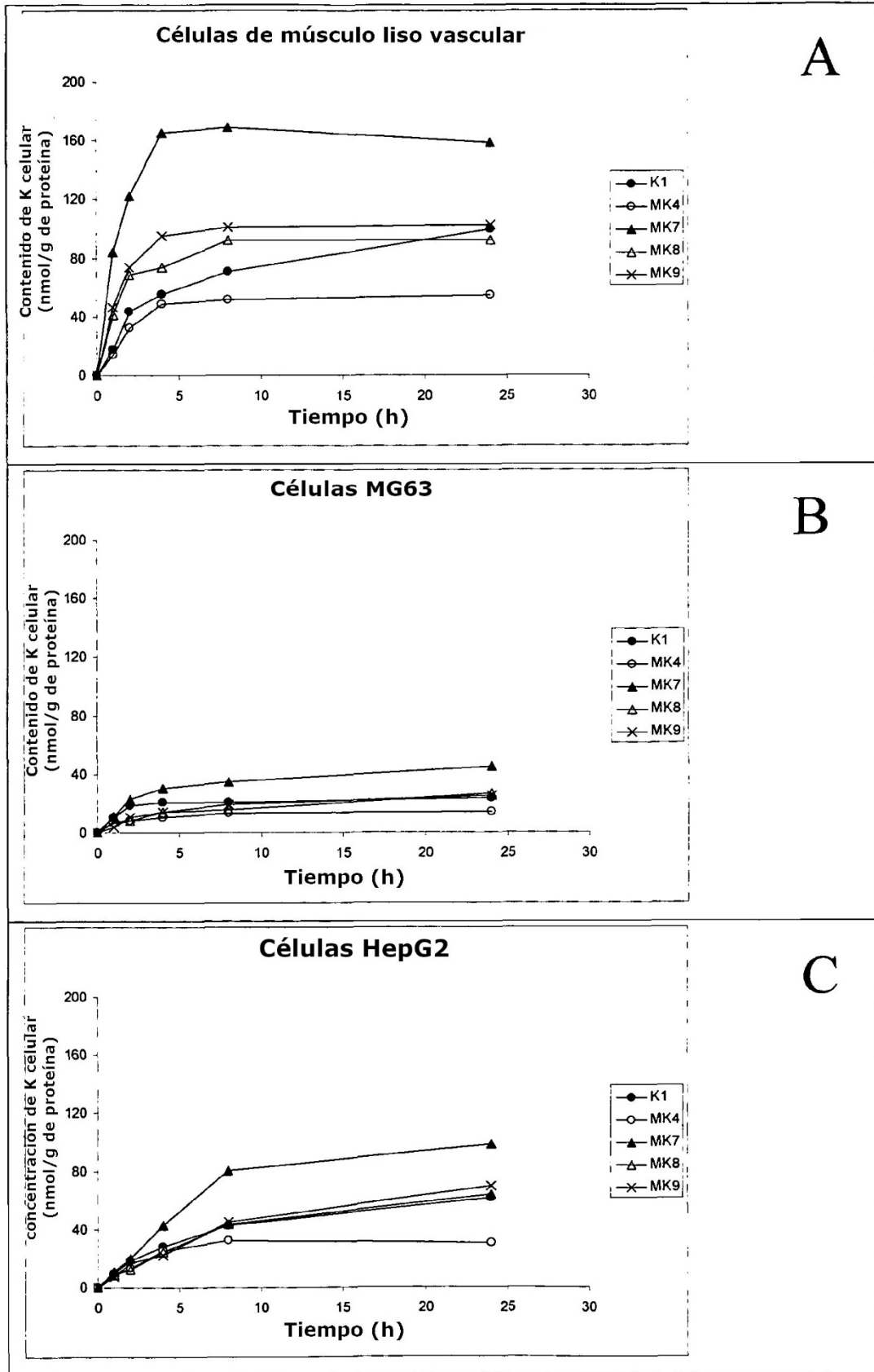


Fig. 6

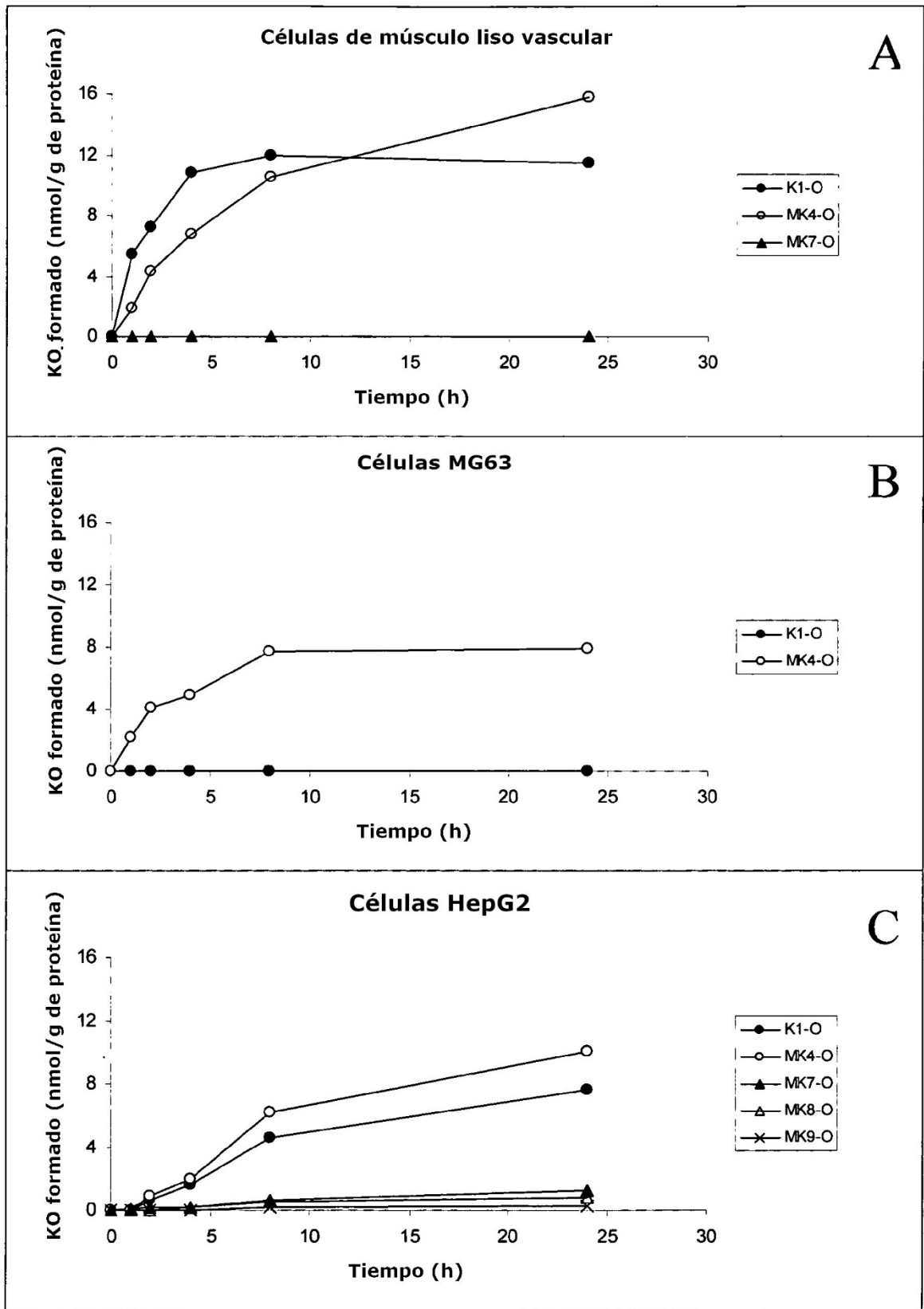


Fig. 7

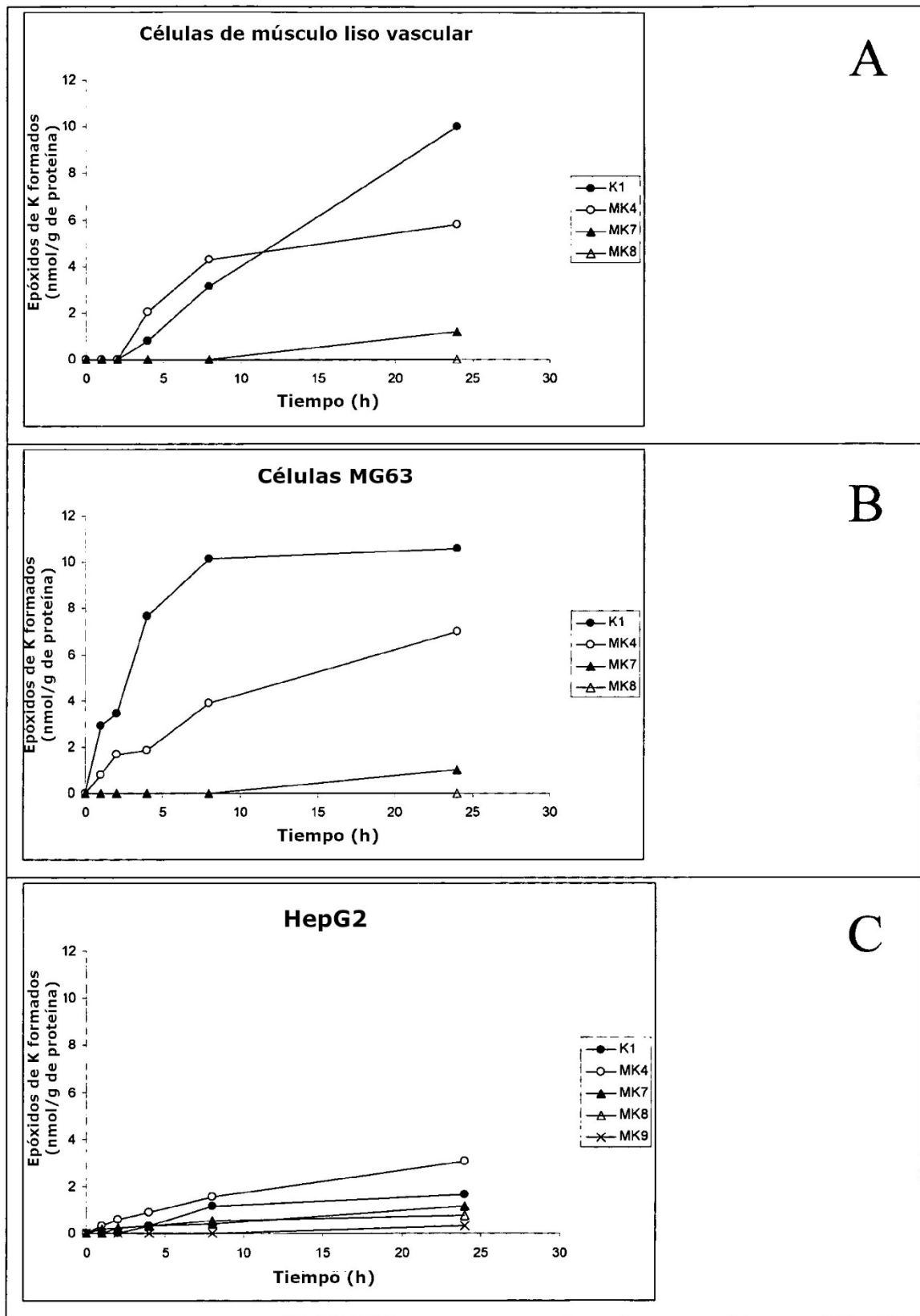


Fig. 8