



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112955131 A

(43) 申请公布日 2021.06.11

(21) 申请号 201980052691.0

(22) 申请日 2019.06.07

(30) 优先权数据

62/682,794 2018.06.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/036139 2019.06.07

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/237054 EN 2019.12.12

(71) 申请人 埃皮松制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 詹姆斯·A·图姆林

保罗·L·达克 约翰·M·鲁迪

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 李杰

(51) Int.Cl.

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61P 3/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

权利要求书3页 说明书24页 附图2页

(54) 发明名称

用于预防或治疗钙化防御的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)对其有需要的受试者中的钙化防御的方法和组合物,并且更具体地,本发明涉及使用甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)来预防或治疗患有以下:糖尿病、慢性肾病、终末期肾衰竭和COPD中的一种或多种的受试者或正在经历血液透析和/或接受抗凝剂疗法和/或抑制素疗法的受试者中的钙化防御的方法。

1. 一种在对其有需要的受试者中预防钙化防御、减缓钙化防御的发展、抑制钙化防御和/或使钙化防御逆转的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含基本纯的甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7) 的组合物,由此预防钙化防御,减缓钙化防御的发展,抑制钙化防御和/或使钙化防御逆转。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述受试者患有远端钙化防御和/或中央钙化防御。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述受试者患有糖尿病、慢性肾病或终末期肾病。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述受试者患有3期慢性肾病。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述受试者患有4期慢性肾病。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述受试者患有5期慢性肾病。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述受试者正在经历血液透析。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中,所述受试者正在接受非基于华法林的抗凝剂疗法。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述抗凝剂疗法为口服抗凝疗法。

10. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述抗凝疗法包括因子Xa活性抑制剂(例如,阿哌沙班、利伐沙班、贝曲西班、依度沙班、奥米沙班、利达沙班、伊利巴西班或磺达肝素)或因子IIa活性抑制剂(例如,达比加群或阿加曲班)。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,所述受试者患有慢性阻塞性肺病(COPD)。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中,所述受试者患有钙化防御相关皮肤病变。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述组合物的施用减小了所述皮肤病变的尺寸。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述组合物的施用将所述皮肤病变的总表面积减小了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中,相对于施用MK-7和/或MKH2-7之前所述受试者的血清T50值,在向所述受试者施用MK-7和/或MKH2-7之后提高了所述受试者的血清T50值(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,相对于施用MK-7和/或MKH2-7之前存在的比率或量,MK-7和/或MKH2-7的施用(a)提高了所述受试者的血浆中羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率,或(b)降低了所述受试者的血浆中的非羧化维生素K依赖性蛋白的量。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述维生素K依赖性蛋白选自基质G1a蛋白、生长抑制特异性基因6 (Gas-6) 蛋白、PIVKA-II蛋白、骨钙素、激活蛋白C或激活蛋白S。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中,相对于施用MK-7和/或MKH2-7之前的骨保护素或胎球蛋白A的血浆水平,在向所述受试者施用MK-7和/或MKH2-7之后提高了骨

保护素或胎球蛋白A的血浆水平。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中,相对于施用MK-7和/或MKH2-7之前的D-二聚体或超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆水平,在向所述受试者施用MK-7和/或MKH2-7之后降低了D-二聚体或超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆水平。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的方法,其中,在施用所述组合物之前,所述受试者患有尿毒症氧化阻滞。

21. 一种在对其有需要的受试者中预防慢性阻塞性肺病(COPD)的一种或多种症状、减缓慢性阻塞性肺病(COPD)的一种或多种症状的发展和/或使慢性阻塞性肺病(COPD)的一种或多种症状逆转的方法,所述方法包括每天向所述受试者施用至少2mg基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7),由此预防COPD的一种或多种症状,或减缓COPD的一种或多种症状的发展,或使COPD的一种或多种症状逆转,其中,MK7和/或MKH2-7以药物组合物施用。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中,所述一种或多种症状选自由下述组成的组:呼吸困难、咳嗽、粘液产生、气喘和弹性蛋白溶解。

23. 一种在对其有需要的受试者中预防钙化防御或在患有钙化防御的受试者中减缓组织钙化的发展、抑制组织钙化和/或使组织钙化逆转的方法,所述方法包括向所述受试者施用

(a) 每天至少2mg的基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7);和

(b) 抑制素。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中,所述抑制素选自辛伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀、匹伐他汀、罗素伐他汀、以及氟伐他汀。

25. 根据权利要求23或24所述的方法,其中,在与所述抑制素相同的剂型中施用MK-7和/或MKH2-7。

26. 根据权利要求23或24所述的方法,其中,在与所述抑制素分开的剂型中施用MK-7和/或MKH2-7。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中,每天向所述受试者施用至少2mg MK-7和/或MKH2-7。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法,其中,每天向所述受试者施用约5mg至约100mg MK-7和/或MKH2-7。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中,每天向所述受试者施用约10mg至约50mg MK-7和/或MKH2-7。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的方法,其中,每天向所述受试者施用10、25、50、75或100mg MK-7和/或MKH2-7。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法,其中,向所述受试者施用所述组合物持续至少2周。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中,向所述受试者施用所述组合物持续至少6周。

33. 根据权利要求7-32中任一项所述的方法,其中,向所述受试者施用所述组合物持续包括血液透析期间的一段时间。

34. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法,其中,每天施用所述组合物。
35. 根据权利要求1-34中任一项所述的方法,其中,口服施用所述组合物。
36. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中,将所述组合物置于片剂、囊片或胶囊剂中。
37. 根据权利要求1-36中任一项所述的方法,其中,所述组合物包含MK-7和/或MKH2-7和药学上可接受的赋形剂。
38. 一种用于在受试者中预防钙化防御或在患有钙化防御的受试者中减缓组织钙化的发展、抑制组织钙化和/或使组织钙化逆转的方法,所述方法包括每天向所述受试者施用至少2mg基本纯的甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7),其中,所述受试者正在服用钙基磷酸盐结合剂和/或维生素D类似物。
39. 根据权利要求38所述的方法,其中,所述受试者患有甲状旁腺机能亢进。
40. 根据权利要求38或39所述的方法,其中,每天向所述受试者施用至少2mg MK-7和/或MKH2-7。
41. 根据权利要求38-40中任一项所述的方法,其中,每天向所述受试者施用约5mg至约100mg MK-7和/或MKH2-7。
42. 根据权利要求38-41中任一项所述的方法,其中,每天向所述受试者施用约10mg至约50mg MK-7和/或MKH2-7。
43. 根据权利要求38-41中任一项所述的方法,其中,每天向所述受试者施用10、25、50、75或100mg MK-7和/或MKH2-7。
44. 根据权利要求38-43中任一项所述的方法,其中,向所述受试者施用组合物持续至少2周。
45. 根据权利要求38-44中任一项所述的方法,其中,向所述受试者施用所述组合物持续至少6周。
46. 根据权利要求38-45中任一项所述的方法,其中,每天施用所述组合物。
47. 根据权利要求38-46中任一项所述的方法,其中,口服施用所述组合物。
48. 根据权利要求38-47中任一项所述的方法,其中,将所述组合物置于片剂、囊片或胶囊剂中。
49. 根据权利要求38-48中任一项所述的方法,其中,所述组合物包含MK-7和/或MKH2-7和药学上可接受的赋形剂。

用于预防或治疗钙化防御的方法和组合物

[0001] 相关申请的引证

[0002] 本申请要求2018年6月8日提交的美国临时专利申请号62/682,794的优先权和权益,通过引证将其以其全部内容并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及用于预防或治疗(例如,减缓发展、抑制(arresting,停止,阻止,控制)和/或逆转)对其有需要的受试者中的钙化防御(calciphylaxis)的方法和组合物,并且更具体地,本发明涉及使用甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(menaquinol-7,甲基萘醇-7,甲基萘醌醇-7)(MKH2-7)用于预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)患有糖尿病、慢性肾病、终末期肾病的受试者中或者经历血液透析和/或接受抗凝剂疗法的受试者中和/或已进行或目前正在进行抑制素疗法和/或患有慢性阻塞性肺病(COPD)的受试者中的钙化防御的方法。

背景技术

[0004] 在正常生理条件下,血浆钙和磷酸盐以接近于过饱和水平的浓度存在,并因此可能预期在软组织(例如,血管)中作为结晶羟基磷灰石沉淀。该过程在健康受试者中不发生的观察结果表明存在阻断病理性钙化的有效的化学和生物方式(Price等人(2002)“Discovery of a High Molecular Weight Complex of Calcium,Phosphate,Fetuin,and Matrix-Carboxyglutamic Acid Protein in the Serum of Etidronate-treated Rats,”JOURNAL BIOL.CHEM.277(6):3926-3934)。

[0005] 当钙化抑制被破坏时,如在糖尿病和慢性肾病(CKD)受试者中,可以发生软组织(例如,血管)的病理性钙化。应理解糖尿病可以导致CKD和终末期肾病(ESRD),其特征在于尿毒症。尿毒症可以促进维生素K氢醌(KH2)氧化,借此破坏维生素K的循环再生以及其它影响(参见,图1)。另外,某些治疗可以导致或促成维生素K调控异常,包括基于华法林的抗凝剂疗法和抑制素疗法。功能性维生素K的丧失导致重要的矿化调节剂的丧失,从而导致组织病理性钙化。就动脉钙化来说,观察到皮内微血管血栓形成发生,从而导致小血管堵塞和周围组织死亡。

[0006] 钙化防御(也称为钙性尿毒症性小动脉病(CUA))是罕见,但潜在致死的慢性肾病(CKD)并发症,其主要影响进行血液透析的终末期肾病(ESRD)患者。所述病况的特征在于皮下小动脉钙化和邻近皮下组织和皮肤梗死(Janigan等人(2000)“Calcified subcutaneous arterioles with infarcts of the subcutis and skin(“calciphylaxis”)in chronic renal failure,”AMERICAN JOURNAL OF KIDNEY DISEASES 35(4):588-97;Brandenburg等人(2016)“ERA-EDTA Working Group on CKD-MBD and EUCALNET.Lack of evidence does not justify neglect:how can we address unmet medical needs in calciphylaxis?”NEPHROL DIAL TRANSPLANT.31(8):1211-9;Brandenburg等人(2017)“Calcific uraemic arteriolopathy(calciphylaxis):data from a large nationwide registry,”NEPHROL

DIAL TRANSPLANT.32(1):126-132)。

[0007] 钙化防御的确切发生率和发病率是未知的 (Brandenburg等人2017,如上)。估计每年发生率<1%,在长期血液透析患者中的发病率为约4% (Angelis等人 (1997) “Calciphylaxis in patients on hemodialysis:A prevalence study,”SURGERY 122(6):1083-90;Brandenburg等人(2014) “Calcific uraemic arteriopathy:a rare disease with a potentially high impact on chronic kidney disease-mineral and bone disorder,”PEDIATR NEPHROL.29(12):2289-98;Brandenburg等人(2016),如上)。

[0008] 基于美国肾脏数据系统,在2010至2015年之间:(i) ESRD病例的发生数 (incident number) 分别从115,829升高至124,114;(ii) 所报告的ESRD的发病计数 (prevalent count) 分别从592,656升高至703,243;(iii) 血液透析的发生计数 (incident count) 分别从112,804升高至120,972;并且血液透析的年末发病计数 (point prevalent count) 分别从414,503升高至495,433 (USRDS 2017)。假设血液透析患者中钙化防御的发生率<1%,发病率为约4%,则每年钙化防御的估计发生计数和发病计数分别为约1200和19,800。此外,根据Mayo临床统计,这些数值占美国总钙化防御患者群体的约60%。另外的40%归因于未透析的CKD患者,这使得截止2018年1月的总人口达到约40,000。

[0009] 钙化防御与显著的发病率和死亡率有关 (Mazhar等人(2001) “Risk factors and mortality associated with calciphylaxis in end-stage renal disease,KIDNEY INT.60(1):324-332;Wilmer等人(2002) “Emerging Concepts in Prevention,Diagnosis, and Treatment,”SEMIN DIAL.15(3):172-86;Bhambri等人(2008) “Calciphylaxis:a review” JOURNAL OF CLINICAL AND AESTHETIC DERMATOLOGY 1(2):38-41;Brandenburg等人(2014),如上;Brandenburg等人2016,如上),从而导致中值存活期为1.5年 (Weenig等人(2007) “Calciphylaxis:natural history,risk factor analysis,and outcome,”J AM ACAD DERMATOL 56:569-579;Brandenburg等人(2014),如上)。钙化防御的发展可以看作是两个阶段的过程,其从血管病变发生开始,然后是继发于血管病变的组织缺血。考虑到临床实体变明显的时间,通常对于血管病变的逆转过晚,因此钙化防御的预后一般较差 (Wilmer等人(2002),如上)。疼痛的皮肤溃疡和组织坏死 (钙化防御的标志) 可以导致严重且甚至危及生命或致死的感染,从而导致了高达80%的整体死亡率 (Bhambri等人(2008),如上;Magro等人(2011) “Calciphylaxis:a review,”J AM COL CERTIF WOUND SPEC.2(4):66-72;Brandenburg等人(2016),如上),其中大于50%的患者在诊断1年内死亡 (Mazhar等人(2001),如上;Bhambri等人(2008),如上)。除了由于感染、坏死皮肤损害 (skin lesion,皮肤病变) 所造成的败血症所导致的死亡之外,还已在钙化防御患者中报道了致死的内脏器官衰竭 (Wilmer等人,(2002),如上)。在进行血液透析的ESRD患者中,发现钙化防御独立地将死亡风险提高了8倍,并且整体1年和5年存活率分别估计为45%和35% (Mazhar等人(2001),如上)。

[0010] 几项体外、体内和人的群组研究已表明维生素K拮抗剂 (VKA),如华法林的使用加速了心血管钙化 (Schurgers等人(2007a) “Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function:importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification,”J THROMB HAEMOST5:2503-2511;Schurgers等人(2007b) “Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of

vitamin K in rats,”*BLOOD* 109:2823-283;Krüger等人(2013)“Warfarin induces cardiovascular damage in mice,”*ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL* 33:2618-2624)并且它是钙化防御的显著风险(Hayashi等人(2012)“A case-control study of calciphylaxis in Japanese end-stage renal disease patients,”*NEPHROL DIAL TRANSPLANT*27:1580-1584;Nigwekar等人(2013)“Statin use and calcific uremic arteriopathy:a matched case-control study,”*AM J NEPHROL* 37:325-332; Brandenburg等人(2016),如上)。

[0011] 在评价血液透析患者中的钙化防御的风险因素的研究中,将1030位新诊断为钙化防御的血液透析患者与2060个对照相匹配。血液透析开始和后续钙化防御出现之间的中值持续时间为925天(四分位距[IQR],273-2185天)。在多变量条件逻辑回归分析中,糖尿病;高体重指数;高血清钙、磷和甲状旁腺激素水平;和营养维生素D、西那卡塞和华法林治疗与后续钙化防御出现的几率升高有关(Nigwekar等人(2016)“A Nationally Representative Study of Calcific Uremic Arteriopathy Risk Factors,”*J.AM.SOC.NEPHROL*.27(11):3421-9)。

[0012] 钙化防御患者中所观察到的皮肤坏死似乎是由于彻底的小血管钙化和软组织中的钙积累所造成的。尚未完全理解软组织钙化的机制;然而,羧化MGP被认为作为血管钙化的有效抑制剂起重要作用(Schurgers等人(2007a),如上;Brandenburg等人(2016),如上;Nigwekar等人(2016),如上)。

[0013] 维生素K是维生素K依赖性(VKD)蛋白的翻译后修饰所需的基本酶促辅因子。一些VKD蛋白在临床上与CKD和ESRD患者相关,并且包括例如主要凝血因子,如因子II、VII、IX和X,和细胞间基质蛋白,如基质Gla蛋白(MGP)、激活蛋白C和骨钙素。维生素K是一组脂溶性维生素,其尤其包括植物所产生的维生素K₁(也称为叶绿醌)和肠菌群中的细菌所产生的维生素K₂(也称为甲基萘醌)。应理解维生素K₂中的类异戊二烯链可以含有4至12个重复类异戊二烯单元。例如,甲基萘醌-4(或MK-4)含有4个类异戊二烯单元,而甲基萘醌-7(或MK-7)含有7个类异戊二烯单元。

[0014] 对于甲基萘醌-7(MK-7),在正常情况下,MK-7被一种或多种NADPH依赖性还原酶(例如,醌氧化还原酶)还原为甲基萘酚-7(MKH2-7)(维生素K氢醌形式)。仅MK-7的还原形式(即MKH2-7)起催化维生素K依赖性蛋白的羧化的酶 γ 谷氨酸羧化酶(GGCX)的辅因子的作用。(参见,图1和图2)。谷氨酸残基的酶促羧化导致MKH2-7氧化为2,3-环氧化物形式(MK-7 2,3-环氧化物)。维生素K循环的最终步骤需要通过维生素K环氧化物还原酶复合物亚基1(VKORC1,也称为VKOR将维生素MK-7 2,3-环氧化物酶促还原回到MK-7。在一些组织中,横向同源物VKORC1L1(VKORC1-样-1)也可以实施这种催化反应。已知华法林阻断了MKH2-7(维生素K₂的活性形式)的产生和MK-7从维生素MK-7 2,3-环氧化物的再生两者,这可以导致在接受华法林疗法的患者中所观察到的更高的钙化发生率。

[0015] 尽管截至目前已有一些工作,但是仍需要预防和/或治疗钙化防御的新型临床方法。具体地,仍需要预防和/或治疗糖尿病、CKD、ESRD受试者和接受抗凝剂和/或抑制素疗法的受试者中的钙化防御的新型临床方法。

发明内容

[0016] 已发现可以以高剂量,例如,以至少2mg每天的剂量有效使用甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7) 来预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)受试者,例如,患有糖尿病和/或慢性肾病的受试者中的钙化防御。

[0017] 在一个方面,本公开涉及预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)对其有需要的受试者中的钙化防御的方法。所述方法包括向受试者施用有效量的包含基本上纯的甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7) 的组合物,借此预防或治疗钙化防御。在某些实施方式中,受试者患有远端钙化防御 (distal calciphylaxis,远端型钙化防御) 和/或中央钙化防御 (central calciphylaxis,中央型钙化防御)。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)对其有需要的受试者中的慢性阻塞性肺病 (COPD) 的一种或多种症状的方法,所述方法包括每天向受试者施用至少2mg基本上纯的甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7),借此预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转) COPD的一种或多种症状,其中MK-7和/或MKH2-7以药物组合物施用。在某些实施方式中,一种或多种症状选自自由呼吸困难、咳嗽、粘液产生、气喘和弹性蛋白溶解 (elastinolysis,弹性溶解) 组成的组。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了对用于预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转) 患有钙化防御的受试者中的组织钙化的方法的公开,其中受试者正在服用钙基磷酸盐结合剂和/或维生素D类似物。所述方法可以包括每天向受试者施用至少2mg的基本上纯的甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7)。在某些实施方式中,受试者患有甲状旁腺机能亢进。

[0020] 在某些实施方式中,药物组合物包含MK-7。在某些实施方式中,药物组合物包含MKH2-7。在某些实施方式中,药物组合物包含MK-7和MKH2-7的组合。

[0021] 在任何上述方面的某些实施方式中,受试者已诊断为糖尿病前期或患有糖尿病,例如,II型糖尿病。在某些实施方式中,受试者患有慢性肾病,例如,3期、4期或5期。在某些实施方式中,受试者患有COPD。在某些实施方式中,受试者正在经历血液透析。在某些实施方式中,受试者正在接受非基于华法林的抗凝剂疗法,如口服抗凝疗法。在某些实施方式中,如果使用非基于华法林的抗凝疗法,则抗凝疗法可以包括因子Xa活性抑制剂(例如,阿哌沙班、利伐沙班、贝曲西班、依度沙班或磺达肝素) 或因子IIa活性抑制剂(例如,达比加群或阿加曲班)。在某些实施方式中,受试者先前已暴露于基于华法林的抗凝疗法。

[0022] 在某些实施方式中,受试者患有钙化防御相关皮肤病变 (dermal lesion,病变皮肤,真皮病变)。在某些实施方式中,组合物的施用减小了皮肤病变的尺寸 (size,大小),例如,组合物的施用将皮肤病变的总表面积降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0023] 在任何上述方面的某些实施方式中,相对于施用各个MK-7和/或MKH2-7之前受试者的血清T50值,MK-7和/或MKH2-7向受试者的施用提高了受试者的血清T50值(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0024] 在任何上述方面的某些实施方式中,相对于各个MK-7和/或MKH2-7施用之前的比率,MK-7和/或MKH2-7的施用提高了受试者血浆中羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率

(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在任何上述方面的某些实施方式中,相对于各个MK-7和/或MKH2-7施用之前的量,MK-7和/或MKH2-7的施用降低了受试者血浆中非羧化维生素K依赖性蛋白的量(例如,降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在某些实施方式中,维生素K依赖性蛋白选自基质G1a蛋白(MGP)、生长抑制特异性基因6(Gas-6)蛋白、PIVKA-II蛋白、骨钙素、激活蛋白C、激活蛋白S、因子II、因子VII、因子IX和因子X。

[0025] 在任何上述方面的某些实施方式中,相对于各个MK-7和/或MKH2-7施用之前的骨保护素或胎球蛋白A的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用提高了骨保护素或胎球蛋白A的血浆水平(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0026] 在任何上述方面的某些实施方式中,相对于各个MK-7和/或MKH2-7施用之前的D-二聚体或超敏C反应蛋白(Highly Sensitive C Reactive Protein,超灵敏C反应蛋白,高度敏感的C反应蛋白)(hs-CRP)的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用降低了D-二聚体或超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆水平(例如,降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0027] 在某些实施方式中,在组合物的施用之前,受试者患有尿毒症氧化阻滞(uremic oxidative blockade)。在某些实施方式中,例如,通过检测F2异前列烷升高(Morrow等人(1990)“A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo by humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism,” PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 87:9383-9387),异乙酰腺素(isolevuglandin)-血浆蛋白加合物的升高(Salomon等人(2000)“Isolevuglandin-protein adducts in humans:Products of free radical-induced lipid oxidation through the isoprostane pathway,” BIOCHIM BIOPHYS ACTA1485:225-235),呼吸乙烷的升高(Handelman等人(2000) J AM.SOC.NEPHROL.11:271A),通过测量血浆脂质过氧化作用的升高;例如,通过检测酪氨酸残基氧化(Heinecke等人(1999)“Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry:Sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues,”METHODS ENZYMOL.300:124-144),血浆蛋白中的半胱氨酸或蛋氨酸残基氧化,赖氨酸氧化和苏氨酸氧化,硫醇氧化和羰基形成(Himmelfarb等人(2000)“Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure,”KIDNEY INT.58:2571-2578),通过测量蛋白和氨基酸氧化的升高;例如,通过检测乙二醛、甲基乙二醛、丙烯醛、糖醛和对羟基苯乙醛(Miyata等人(1999)“Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia:Origin and significance of ‘carbonyl stress’ in long-term uremic complications.KIDNEY INT.55:389-399),通过测量反应性醛的形成;例如,通过测量与2,4-二硝基苯肼反应后肼的形成,通过测量反应性羰基化合物的升高;通过测量血浆谷胱甘肽水平和谷胱甘肽过氧化物酶功能的降低(Ceballos-Picot等人(1996)“Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure,”FREE RADIC.BIOL.MED.21:845-853);和氧化与还原硫醇比值的升高(Hultberg等人(1995)“Reduced, free, and, total

fractions of homocysteine and other thiol compounds in plasma from patients with renal failure,”NEPHRON 70:62-67;Himmelfarb等人(2002)“Plasma aminothiols oxidation in chronic renal failure,”KIDNEY INT 61:705-716;Ward等人“Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency,”J AM.SOC.NEPHROL.5:1697-1702),确定了尿毒症氧化阻滞的存在。

[0028] 在某些实施方式中,受试者正在接受抑制素。例如,抑制素可以选自辛伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀、匹伐他汀、罗素伐他汀和氟伐他汀。

[0029] 在任何上述方面的某些实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2mg至约1,000mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约5mg至约1,000mg的MK-7和/或MKH2-7。

[0030] 在任何上述方面的某些实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2mg至约750mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约5mg至约750mg的MK-7和/或MKH2-7。在任何上述方面的某些实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2mg至约500mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约5mg至约500mg的MK-7和/或MKH2-7。在任何上述方面的某些实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2mg至约250mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约5mg至约250mg的MK-7和/或MKH2-7。在任何上述方面的某些实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2mg至约100mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约5mg至约100mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约10mg至约75mg的MK-7和/或MKH2-7,例如,每天向受试者施用10、25、50或75mg的MK-7和/或MKH2-7。

[0031] 在某些实施方式中,向受试者施用MK-7和/或MKH2-7至少2周、4周、6周、8周、3个月、6个月、1年或无限期施用。如果受试者正在经历血液透析,则可以向受试者施用包括至少血液透析期间的一段时间的MK-7和/或MKH2-7。

[0032] 在某些实施方式中,口服施用MK-7和/或MKH2-7。可以将MK-7和/或MKH2-7置于片剂、囊片(caplet)或胶囊剂中。MK-7和/或MKH2-7可以存在于包含药学上可接受的赋形剂的组合物中。

[0033] 以上描述内容描述了本发明的多个方面和实施方式。本专利申请具体地考虑了所述方面和实施方式的所有组合和排列。在以下详细说明和权利要求中描述了本发明的这些及其它方面和特征。

附图说明

[0034] 如附图所示,根据以下优选实施方式的说明,本发明的上述及其它目标、特征和优点将变得显而易见。类似的参考元素标识相应附图中共同的特征,其中:

[0035] 图1是显示维生素K循环以及尿毒症和血液透析引起的维生素K氢醌氧化的影响的示意图;和

[0036] 图2是显示通过 γ -谷氨酸羧化酶(GGCX)的维生素K依赖性蛋白的羧化的示意图。

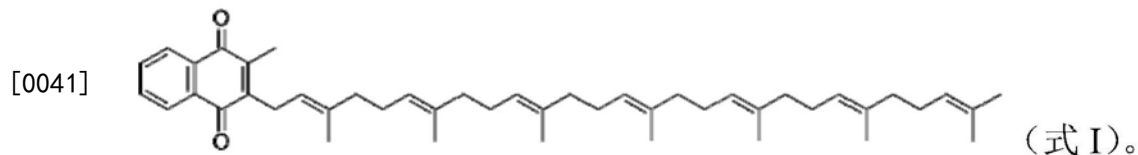
具体实施方式

[0037] 本发明将部分基于以下发现：可以向对其有需要的受试者施用甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7)，MK-7的还原形式，以预防或治疗(例如，减缓发展、抑制和/或逆转)受试者，例如，患有糖尿病和/或慢性肾病的受试者中的钙化防御。

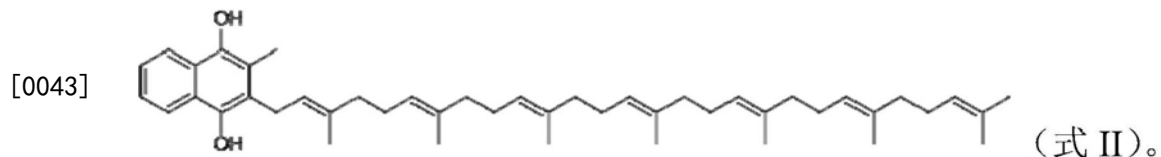
[0038] 不希望受理论束缚，据信通过尿毒毒素的保留所引起的氧胁迫消除了血管内皮的功能性维生素K₂，从而导致某些维生素K依赖性蛋白，包括羧化MGP和激活蛋白C的浓度是次优的(suboptimal, 未达最佳标准的)。这些及其它维生素依赖性蛋白的后续减少的钙结合能力促成异常组织钙化。高剂量的基本纯的MK-7和/或MKH2-7可以用于提高维生素K依赖性蛋白的羧化，借此预防或治疗(例如，减缓发展、抑制和/或逆转)钙化防御，其中MK-7和/或MKH2-7是以药物组合物的形式施用的。只要每天施用必要的量的MK-7和/或MKH2-7，则可以以单个剂量单位(例如，单个胶囊剂)或以多个剂量单位(例如，多个胶囊剂)施用MK-7和/或MKH2-7。在某些实施方式中，药物组合物包含MK-7。在某些实施方式中，药物组合物包含MKH2-7。在某些实施方式中，药物组合物包含MK-7和MKH2-7的组合。

[0039] I. 甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚 (MKH2-7)

[0040] 本发明的组合物包含甲基萘醌-7 (MK-7)，维生素K₂的一种形式。MK-7的IUPAC名称为2-[(2E,6E,10E,14E,18E,22E)-3,7,11,15,19,23,27-七甲基二十八碳-2,6,10,14,18,22,26-庚烯基]-3-甲基萘-1,4-二酮，并且MK-7的化学结构如式I所示。



[0042] 在本文中考虑了根据所述方法使用甲基萘酚-7 (MKH2-7)，它是MK-7的还原形式。MKH2-7的IUPAC名称为2-[(2E,6E,10E,14E,18E,22E)-3,7,11,15,19,23,27-七甲基二十八碳-2,6,10,14,18,22,26-庚烯基]-3-甲基萘-1,4-二醇，并且MKH2-7的化学结构如式II所示：



[0044] 不希望受理论束缚，据信补充MK-7和/或MKH2-7形式的维生素K为尿毒症和/或透析所引起的维生素K中间体的非特异性氧化提供了提高的保护。

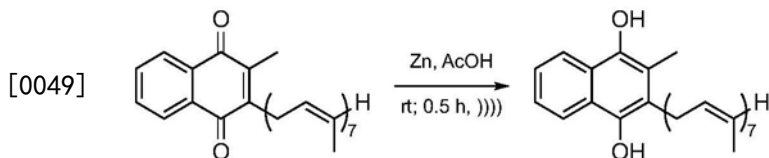
[0045] MK-7的长脂肪链不是人合成的，而是在结肠中由细菌合成的。另外，MK-7的饮食来源包括细菌发酵食品，如纳豆(枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵的黄豆)、奶酪、泡菜和酪乳以及猪肉、鳗鱼、比目鱼和荞麦面包。另外，MK-7作为营养补充剂可用(例如，来自 Rejuvenation Therapeutics® 的维生素K2 MK-7; Bio-Tech™ Pharmacal MK-7 维生素K2, Fayetteville AR; NOW® Foods MK-7 维生素K-2)。

[0046] 然而，本发明使用了以药物组合物的形式施用的基本纯的MK-7和/或MKH2-7。

[0047] 还可以合成生产MK-7，例如，如Baj等人(2016)“Convergent Synthesis of Menaquinone-7 (MK-7),”ORG.PROCESS RES.DEV.20:1026-1033,W02010/034999和W02010/

035000 (还作为美国专利申请号2011/0207967公开) 所述。

[0048] 可以使用本领域中已知的常规还原反应,通过使MK-7还原,从MK-7合成MKH2-7,所述还原反应包括例如通过使用锌和乙酸的还原,如Marchand等人(1991)“Mild and Highly Selective Ultrasound-promoted Zinc/Acetic Acid Reduction of C=C Bonds in α,β -Unsaturated γ -Dicarbonyl Compounds,”SYNTHESIS 1991 (3):198-200所述。



[0050] 在该方法中,将MK-7 (例如,1g,1.54mmol) 溶于冰乙酸(15mL) 并添加粉末锌(例如,0.8g,12.3mmol)。将所得混合物超声处理0.5小时或者可以使反应回流直至完成。将所得混合物过滤并用二氯甲烷清洗残余物。真空浓缩合并的滤液以产生纯还原产物。在氩气下实施程序。为了稳定还原形式的MKH2-7,将MKH2-7与一种或多种抗氧化剂,如维生素C、维生素C酯(例如,抗坏血酸棕榈酸酯) 和/或维生素E,例如,在胶囊剂或软凝胶中混合可以是有帮助的。作为另外一种选择,可以生产MKH2-7的前体药物,例如,其中用多种基团使羟基之一或两者酯化(例如,乙酸酯) 以产生在受试者中代谢产生MKH2-7的稳定前体药物。

[0051] II. 剂型(dosage form, 剂量形式) 和施用

[0052] 在某些实施方式中,根据本发明有用的组合物包含基本纯的MK-7和/或MKH2-7,基本由其组成或由其组成。基本纯的是指包含按重量计至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或至少99.5%的MK-7和/或MKH2-7的活性成分的组合物。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7是以剂型施用的唯一的维生素。

[0053] 如本文所使用的,短语“有效量”和“治疗有效量”是指足以实现一种或多种有益或所期望的结果的化合物(例如,MK-7和/或MKH2-7) 的量。可以在一个或多个施用、应用或剂量中施用有效量,并且有效量不意欲受限于特定制剂或施用途径。

[0054] 在另一个实施方式中,本发明提供了剂型,例如,口服剂型,其包含有效量的MK-7和/或MKH2-7,例如,约2mg至约1,000mg,约2mg至约750mg,约2mg至约500mg,约2mg至约250mg,约2mg至约200mg,约2mg至约150mg,约2mg至约100mg,约2mg至约50mg,约2mg至约25mg,约5mg至约1,000mg,约5mg至约750mg,约5mg至约500mg,约5mg至约250mg,约5mg至约200mg,约5mg至约150mg,约5mg至约100mg,约5mg至约50mg,约5mg至约25mg,约10mg至约1,000mg,约10mg至约750mg,约10mg至约500mg,约10mg至约250mg,约10mg至约200mg,约10mg至约150mg,约10mg至约100mg,约10mg至约50mg,约10mg至约25mg,约15mg至约1,000mg,约15mg至约750mg,约15mg至约500mg,约15mg至约250mg,约15mg至约200mg,约15mg至约150mg,约15mg至约100mg,约15mg至约50mg,约15mg至约25mg,约25mg至约1,000mg,约25mg至约750mg,约25mg至约500mg,约25mg至约250mg,约25mg至约200mg,约25mg至约150mg,约25mg至约100mg,约25mg至约50mg,约50mg至约1,000mg,约50mg至约750mg,约50mg至约500mg,约50mg至约250mg,约50mg至约200mg,约50mg至约150mg,约50mg至约100mg,约75mg至约1,000mg,约75mg至约750mg,约75mg至约500mg,约75mg至约250mg,约75mg至约200mg,约75mg至约150mg,约75mg至约100mg,约100mg至约1,000mg,约100mg至约750mg,约100mg至约500mg,约100mg至约250mg,约100mg至约200mg或者约100mg至约150mg。在某些实施方式

中,以适合的剂型,如片剂、囊片或胶囊剂(例如,液体或凝胶胶囊剂),向受试者施用2mg、5mg、10mg、25mg、75mg或100mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7。

[0055] 在某些实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2mg至约100mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2.5mg至约100mg,约3mg至约100mg,约4mg至约100mg或者约5mg至约100mg的MK-7和/或MKH2-7。在某些实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约2mg、2.5mg、约3mg、约4mg、约5mg、约7.5mg的MK-7和/或MKH2-7。在其它实施方式中,所述方法可以包括每天向受试者施用约10mg至约100mg的MK-7和/或MKH2-7,例如,每天向受试者施用10、25、50、75或100mg的MK-7和/或MKH2-7。

[0056] 应理解可以在单个剂量单位(例如,1个胶囊剂)或在多个(例如,2、3或4个等)剂量单位(例如,多个胶囊剂)中施用MK-7和/或MKH2-7。可以将用于根据本发明使用的组合物配制成一个或多个剂量单位。可以每天施用一次或者每天施用多次(例如,1至约10,1至约8,1至约6,1至约4或1至2次)这些剂量单位,或者施用根据引起治疗反应的所需的多次。可以将剂量单位包装在试剂盒中,例如,含有一个或多个每板含有约1至约20个剂量单位(例如,胶囊剂)的泡罩包装的试剂盒中,或者包装在含有多个剂量单位(例如,胶囊剂)的瓶中。

[0057] 在某些实施方式中,可以将含有MK-7和/或MKH2-7的药物组合物配制用于以固体或液体形式施用,包括浸湿剂(水或非水溶液或混悬液)、片剂(例如,目标为用于口服、舌下和/或全身吸收的那些)、丸剂、粉末、颗粒、用于应用至舌的糊剂和/或局部乳膏。如本文所使用的,术语“药物组合物”是指活性剂与一种或多种药学上可接受的载体(惰性或活性)的组合,从而使组合物特别适合于体内或离体诊断或治疗性使用。如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”是指任何标准药物载体和赋形剂,如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如,如油/水或水/油乳液)和多种润湿剂。组合物还可以包含稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的实例,参见Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版, Mack Publ. Co., Easton, PA (1975)。

[0058] 在某些实施方式中,可以在油,如蓖麻油、芝麻油、中链甘油三酯(MCT)油、橄榄油、豆油或咖啡豆油中配制MK-7和/或MKH2-7组合物。适合于与MK-7和/或MKH2-7组合物一起使用的赋形剂包括抗氧化剂、生物利用度增强剂、溶解度增强剂或增溶剂、稳定剂等。

[0059] 在某些实施方式中, MK-7和/或MKH2-7组合物包括一种或多种抗氧化剂,如选自下列的一种或多种抗氧化剂: DL- α 生育酚(维生素E)、抗坏血酸(维生素C)或维生素C酯、二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)、卵磷脂、柠檬酸、芝麻油、橄榄油、豆油和咖啡豆油。

[0060] 在某些实施方式中, MK-7和/或MKH2-7组合物包括选自下列的乳化剂: **Tween®20** (聚乙二醇单月桂酸脱水山梨糖醇酯)、**Tween®80** (聚乙二醇单油酸脱水山梨糖醇酯)、**Kolliphor®EL** (聚氧乙烯蓖麻油 (polyoxyl castor oil), 也称为Cremophor EL)、**Capmul®MCM** (中链脂肪酸的单甘油二酯, 如辛酸和癸酸的单甘油二酯)、卵磷脂、**Lauroglycol™90** (丙二醇单月桂酸酯 (II型))、去氧胆酸、**Phosal®50PG** (丙二醇中的卵磷脂、向日葵单甘油二酯、抗坏血酸棕榈酸酯)、蜂蜡和蜡片。

[0061] 在某些实施方式中, MK-7和/或MKH2-7组合物包括选自下列的生物利用度增强剂: **Maisine®CC** (单亚油酸甘油酯)、**Gelucire®44/14** (月桂酰聚氧乙烯-32甘油酯)、

Capmul® PG-8NF (辛酸的丙二醇单酯)、**Plurol®** Oleique (聚甘油基-6二油酸酯)、**Lauroglycol™** 90 (丙二醇单月桂酸酯 (II型))、**Labrasol®** (辛酰己酰聚氧乙烯-8甘油酯)、**Captisol®** (SBE-β-环糊精)、**Labrafil®** M2125CS (亚油酰聚氧乙烯-6甘油酯) 和 **Phosal®** 50PG (丙二醇中的卵磷脂、向日葵单甘油二酯、抗坏血酸棕榈酸酯)。

[0062] 在某些实施方式中, MK-7和/或MKH2-7组合物包括选自下列的溶解度增强剂或增溶剂: 油酸、**Kolliphor®** EL (聚氧乙烯蓖麻油, 也称为Cremophor EL)、维生素E TPGS (D-α-生育酚聚乙二醇-1000琥珀酸酯)、**Maisine®** CC (单亚油酸甘油酯)、**Gelucire®** 44/14 (月桂酰聚氧乙烯-32甘油酯)、**Miglyol®** 812N (饱和椰子和棕榈坚果油来源的辛酸脂肪酸和甘油的酯)、**Plurol®** Oleique (聚甘油基-6二油酸酯)、**Lauroglycol™** 90 (丙二醇单月桂酸酯 (II型))、**Labrasol®** (辛酰己酰聚氧乙烯-8甘油酯)、**Kolliphor®** EL (聚氧乙烯蓖麻油)、**Captisol®** (SBE-β-环糊精)、**Encapsin™** HPB (羟丙基-β-环糊精)、**Peceol™** (甘油/甘油基单油酸酯 (40型))、脱氧胆酸钠、去氧胆酸、**Labrafil®** M2125CS (亚油酰聚氧乙烯-6甘油酯) 和中链单-和二甘油酯。

[0063] 在某些实施方式中, MK-7和/或MKH2-7组合物包括选自由下列组成的组的溶剂: 豆蔻酸异丙酯、**Capmul®** PG-8NF (辛酸的丙二醇单酯)、**Lauroglycol™** 90 (丙二醇单月桂酸酯 (II型))、聚乙二醇 (PEG) 和丙二醇。

[0064] 在某些实施方式中, MK-7和/或MKH2-7组合物包括选自由油酸和DL-α生育酚组成的组的稳定剂。

[0065] 在某些实施方式中, MK-7和/或MKH2-7组合物包括选自由下列组成的组的表面活性剂: 油酸钠、**Span 20** (月桂酸脱水山梨糖醇酯)、**Span®** 80 (油酸脱水山梨糖醇酯)、维生素E TPGS (D-α-生育酚聚乙二醇-1000琥珀酸酯)、**Lauroglycol™** 90 (丙二醇单月桂酸酯 (II型))、**Labrasol®** (辛酰己酰聚氧乙烯-8甘油酯)、聚乙二醇 (PEG) 和 **Captisol®** (SBE-β-环糊精)。

[0066] 其它适合的赋形剂包括选自下列的一种或多种脂肪酸: 月桂酸、戊酸、己酸、癸酸、辛酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈烯酸、硬脂酸和花生酸以及它们的酯。

[0067] 在某些实施方式中, 在本发明的实践中有用的组合物是可口服递送的。术语“可口服递送的”或“口服施用”在本文中包括本文所述的组合物向受试者的任何递送形式, 其中将组合物置于受试者口中, 无论是否吞咽组合物。因此“口服施用”包括口腔和舌下以及食道施用。

[0068] 在某些实施方式中, 向受试者施用MK-7和/或MKH2-7至少2周, 例如, 2、3、4、5周或更长时间。在某些实施方式中, 施用MK-7和/或MKH2-7至少6周。在某些实施方式中, 向受试者施用MK-7和/或MKH2-7至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少3年或者无限期施用。在某些实施方式中, 至少只要受试者接受非华法林或者与华法林具有类似作用机制的药物 (例如, 醋硝香豆素和苯丙香豆素) 的抗凝剂疗法和/或抑制素疗法, 则施用MK-7和/或MKH2-7。如果受试者正在经历血液透析, 则可以向受试者施用包括血液透析期间的一段时间 (a period that includes the duration of hemodialysis) 的MK-7和/或

MKH2-7。

[0069] 在某些实施方式中,将MK-7和/或MKH2-7组合物与抑制素,如辛伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀、匹伐他汀、罗素伐他汀和氟伐他汀一起施用。可以将MK-7和/或MKH2-7组合物与抑制素一起配制成单一剂型,如本文所讨论的剂型。在其它实施方式中,将MK-7和/或MKH2-7组合物配制成与抑制素分开的剂型。抑制素,如辛伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀、匹伐他汀、罗素伐他汀和氟伐他汀的制剂在本领域中是熟知的。

[0070] 如本文所使用的,术语“受试者”和“患者”是可互换使用的并且表示要通过本发明的方法和组合物治疗的生物体。这些生物体优选地为哺乳动物(例如,人、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪或非人灵长类动物,如猴子、黑猩猩、狒狒和恒河猴),并且更优选地是人。

[0071] III. 方法

[0072] 在某些方面,本发明提供了预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)对其有需要的受试者中的钙化防御的方法。在某些实施方式中,所述方法涉及预防钙化防御或减缓钙化防御的发展。在某些实施方式中,所述方法涉及抑制钙化防御的发展。在某些实施方式中,所述方法涉及逆转钙化防御。

[0073] 所述方法可以包括向受试者施用如本文所述的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)组合物(例如,至少2mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7每天,例如,10、15、25、50或75mg每天),借此预防钙化防御,减缓其发展或使其逆转。在某些实施方式中,受试者患有远端钙化防御(即,影响四肢)和/或中央钙化防御(即影响胸腔)。

[0074] 在某些方面,本发明提供了改善钙化防御受试者中主动脉顺应性的方法,所述方法包括每天向受试者施用有效量的基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)。在某些实施方式中,本发明提供了预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)对其有需要的受试者中的周围性血管病变的方法,其中受试者患有ESRD或CKD,所述方法包括每天向受试者施用有效量的基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)。

[0075] 如本文所使用的,术语“治疗”包括导致病况、疾病、病症等改善,或者使其症状好转的任何作用,例如,减轻、降低、调节、抑制、减缓发展、使变好或消除。治疗可以是治愈、改善或至少部分使病症变好。在某些实施方式中,治疗是治愈疾病。除非另外说明,否则术语“病症”是指并且与术语疾病、病况或病可互换地使用。

[0076] 1. 糖尿病、CKD、ESRD、血液透析

[0077] 在某些实施方式中,通过本文所述的方法和/或组合物治疗的受试者已诊断为糖尿病前期或患有糖尿病,例如,I型和II型糖尿病。由于不受控制的血糖和血压损害了肾中的毛细管,因此糖尿病经常导致慢性肾病(CKD)。CKD经常导致尿毒症(血液中的脲)的出现,这可以抑制维生素K的循环再生,从而导致钙化防御。因此,在某些实施方式中,受试者患有CKD。

[0078] 基于它们的肾小球过滤率(GFR),将慢性肾病患者分期。1期患者的GFR为 $\geq 90\text{mL}/\text{分钟}/1.73\text{m}^2$,2期为 $60-89\text{mL}/\text{分钟}/1.73\text{m}^2$,3期为 $30-59\text{mL}/\text{分钟}/1.73\text{m}^2$,4期为 $15-29\text{mL}/\text{分钟}/1.73\text{m}^2$,并且5期为 $<15\text{mL}/\text{分钟}/1.73\text{m}^2$ 。在某些实施方式中,受试者患有3期、4期或5期CKD。4或5期CKD患者被认为患有终末期肾病(ESRD)。其它类型的肾病,如多囊性肾病,也可以导致ESRD。在某些实施方式中,受试者患有ESRD。

[0079] CKD和/或ESRD患者经常需要血液透析。然而,血液透析可以导致多种组织蛋白氧

化,并且CKD和ESRD患者经常显示出比正常对照更高的羧基蛋白百分比(15-倍)。在接受血液透析的患者中,羧基蛋白的百分比可能甚至更高,从而表明血液透析促成氧化负荷。

[0080] 如以上所讨论的,据信通过血液透析所产生的氧化负荷导致MKH2-7氧化回到MK-7。据考虑通过血液透析的维生素K氢醌(KH2)的氧化阻断了其作为GGCX的辅因子起作用的能力,从而导致维生素K依赖性蛋白的 γ 羧化的降低。因此,血液透析的氧化作用可以促成在CKD和ESRD群体内所观察到的钙化防御。因此,在本文中的某些实施方式中,受试者正在接受血液透析。

[0081] 2. 抗凝剂疗法

[0082] 维生素K对于凝血因子的产生是必需的。然而,某些抗凝剂,例如,某些口服抗凝剂作为维生素K拮抗剂起作用以预防血液凝固。考虑到当维生素K活性失调时,可以发生钙化防御,因此本文中的方法涉及预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)接受抗凝剂疗法并且对其有需要的受试者中的钙化防御,所述方法包括向受试者施用如本文所述的含有甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)的组合物,借此预防或治疗钙化防御。

[0083] 示例性的抗凝剂疗法包括因子Xa活性或因子IIa活性抑制剂。因子Xa活性抑制剂包括口服疗法阿哌沙班(例如, **Eliquis®**, Bristol-Myers Squibb)、利伐沙班(例如, **Xarelto®**, Janssen)、贝曲西班(例如, **Bevyxxa®**, Portola Pharmaceuticals)和依度沙班(例如, **Savaysa®**, Daiichi Sankyo)和皮下疗法磺达肝素(例如, **Arixtra®**, GlaxoSmithKline)。因子IIa(凝血酶)活性抑制剂包括口服疗法达比加群(例如, **Pradaxa®**, Boehringer Ingelheim)和静脉注射疗法阿加曲班(例如, Pfizer)。

[0084] 在某些实施方式中,受试者同时接受非基于华法林的抗凝剂疗法。非基于华法林的抗凝剂疗法可以基于不主要起作用以阻断维生素K向维生素K氢醌的转化和/或维生素K 2,3-环氧化物回到维生素K的转化的抗凝剂。示例性的非基于华法林的抗凝剂可以作为因子Xa活性抑制剂或因子IIa活性抑制剂起作用。示例性的非基于华法林的抗凝剂包括阿哌沙班、利伐沙班、贝曲西班、依度沙班、达比加群、磺达肝素和阿加曲班。在某些实施方式中,受试者先前已暴露于基于华法林的抗凝疗法。

[0085] 在某些实施方式中,本文所述的方法涉及预防,减缓发展、抑制和/或逆转对其有需要的受试者中的钙化防御,其中受试者患有5期CKD并且经历口服非基于华法林的抗凝剂疗法。所述方法可以包括每天向受试者施用至少2mg基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7),借此预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)钙化防御。受试者还可以患有糖尿病和/或可以经历血液透析。

[0086] 3. 抑制素疗法

[0087] 已观察到一旦使用抑制素,冠状动脉钙化可以升高(Saremi等人(2012)“Progression of Vascular Calcification Is Increased With Statin Use in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT),”DIABETES CARE 35:2390-2392)。亲脂性抑制素已显示抑制含有UbiA异戊烯转移酶域的蛋白(UBIAD1)的酶活力,它是在维生素K合成中起作用的酶(Nakagawa等人(2010)“Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme,”NATURE 468(7320):117-21)。此外,体外实验似乎表明在存在抑制素的情况下维生素K合成受损(Chen等人(2017)“Does statins promote

vascular calcification in chronic kidney disease?”EUR.J.CLIN.INVEST.47(2):137-148)。

[0088] 不希望受理论束缚,已考虑HMG coA还原酶抑制剂直接抑制MK-4在冠状动脉血管平滑肌中的产生,这可以解释为何抑制素未在CKD或ESRD患者中显示出降低心血管死亡率。对于该观察结果的一种可能的解释为CDK和ESRD患者在功能上是维生素K缺乏的,并且阻断内源血管平滑肌细胞的维生素K(MK-4)的产生仅用于使血管中膜钙化恶化,因此减轻了脂质减小的任何潜在的益处。此外,血管顺应性丧失伴随钙化增加可以促成整体心血管死亡率。

[0089] 因此,本文提供了预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)对其有需要的受试者中的钙化防御的方法,其中受试者正在接受抑制素。所述方法可以包括向受试者施用如本文所述的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)组合物。在某些实施方式中,受试者正在接受抑制素,如辛伐他汀(例如,Zocor®,Merck&Co.,Inc.)、洛伐他汀(例如,Mevacor®,Merck&Co.,Inc.)、阿托伐他汀(例如,Lipitor®,Pfizer)、普伐他汀(例如,Pravachol®,Bristol-Myers Squibb Co.)、匹伐他汀(例如,Livalo®,Kowa Pharmaceuticals America)、罗素伐他汀(例如,Crestor®,AstraZeneca)和氟伐他汀(例如,Lescol®,Novartis Pharmaceuticals)。

[0090] 本文还提供了预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)对其有需要的受试者中的钙化防御的方法,其中所述方法包括向受试者施用如本文所述的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)组合物和抑制素,如辛伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀、匹伐他汀、罗素伐他汀和氟伐他汀。可以作为单独的剂型或在相同的剂型中施用甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)和抑制素。

[0091] 4.改善主动脉顺应性和抑制和/或逆转周围性血管病变

[0092] 在某些实施方式中,本公开涉及抑制和/或逆转对其有需要的受试者中的周围性血管病变的方法,其中受试者患有ESRD或CKD,所述方法包括向受试者施用有效量的基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)。在某些实施方式中,本公开涉及改善对其有需要的受试者中的主动脉顺应性的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)。

[0093] 术语“血管病变”是指影响血管的任何疾病或病症。它可以包括任何炎性、代谢、凝固、栓子或退行性疾病、病症或病况。在某些实施方式中,血管病变是血管钙化,例如,中膜或内膜血管钙化。

[0094] 血管钙化的临床后果之一是动脉硬化,其导致血管顺应性(例如,血管弹性),例如,主动脉顺应性降低。因此,根据本文所公开的方法,有效量的基本纯的甲基萘醌-7(MK-7)和/或甲基萘酚-7(MKH2-7)的施用可以改善主动脉顺应性。可以使用主动脉体积描记法来评价主动脉顺应性的降低(即血管扩张能力)。参见,例如,Inuma等人(2012)HONG KONG JOURNAL OF NEPHROLOGY 14(2):48-53。还可以通过测量脉搏波传播速度(PWV)来评价主动脉顺应性的降低。PWV是动脉搏移动通过循环系统的速度并且将其用作动脉硬度的量度。较高PWV对应于较高动脉硬度,并因此对应于较低血管顺应性。测量PWV的方法在本领域中是已知的并且通过例如Pereira等人(2015)“Novel Methods for Pulse Wave Velocity

Measurement,” J.MED.BIOL.ENG.35:555-565描述。简要地,可以通过测量区域PWV,如颈动脉-股骨PWV,或者局部PWV来评价PWV。测量区域PWV的方法在本领域中是已知的并且包括例如脉搏传感器探针、TY-360压力传感器、同步心电图(ECG)的多普勒单元、脉搏传感器探针、光学体积描记术、Complior®(压电压力传感器)、SphygmoCor®、Arteriograph®和PulsePen®(血压计和整合的心电图单元)的使用,同上。测量局部PWV的方法在本领域中是已知的并且包括例如磁共振成像、超声波和血管照相术,同上。

[0095] 在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的主动脉顺应性提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的主动脉顺应性提高了约10%-500%,约50%-200%,约75%-125%。在某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用前的血管,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的主动脉顺应性提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用前的血管,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的主动脉顺应性提高了约10%-500%,约50%-200%,约75%-125%。

[0096] 冠状动脉钙化评分(CAC)可以用于估计胸腔动脉的钙化程度。高CAC得分指示了钙化,并且治疗的目标在于抑制CAC得分的长期增加或者使其逆转,或者减缓增加速率。

[0097] 5.慢性阻塞性肺病

[0098] 慢性阻塞性肺病是用于描述使呼吸困难的进行性肺病的术语。COPD的两种原发形式为肺气肿和慢性支气管炎。COPD的症状包括呼吸困难、咳嗽、粘液产生和气喘。另外,弹性蛋白溶解(弹性蛋白的蛋白水解)是COPD的重要特征。它促成动脉柔韧性丧失并促进血管内膜中膜钙化。还已显示它是COPD患者中死亡的强预测因子(Rabinovich等人,(2016)“Circulating desmosine levels do not predict emphysema progression but are associated with cardiovascular risk and mortality in COPD,”ERJ Express doi:10.1183/13993003.01824-2015)。已证实MGP抑制促进弹性蛋白溶解的基质金属蛋白酶的生产。因此,已假设维生素D是弹性蛋白降解速率的关键决定因素,并且低维生素D水平导致不足以防止弹性蛋白溶解的低MGP活性(Piscaer等人,(2017)“Vitamin D deficiency:the linking pin between COPD and cardiovascular diseases?”RESP.RES.18:189)。不希望受理论束缚,通过施用MK-7和/或MKH2-7提高激活(羧化)MGP的产生可以起作用以抑制患有COPD的受试者中的弹性蛋白溶解的不利影响,借此预防COPD的一种或多种症状,或减缓其发展,或使其逆转。

[0099] 可以通过本领域中已知的任何方式来测量COPD的症状,包括呼吸困难、咳嗽、粘液产生和气喘的减轻。一种或多种COPD症状随时间加重的速率的减缓指示了一种或多种COPD症状发展的减缓,或者一种或多种症状的减轻,如减轻5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,指示了一种或多种COPD症状的逆转。

[0100] 可以通过本领域中已知的任何方法测量弹性蛋白溶解,包括例如通过测量受试者中的血液异锁链素水平。异锁链素水平随时间提高的速度的减缓指示了一种或多种COPD症

状发展的减缓,或者异锁链素水平的降低,如降低5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,指示了一种或多种COPD症状的逆转。

[0101] 6. 甲状旁腺机能亢进

[0102] 钙化防御的发病率似乎日益增加,这可能部分是由于钙基磷酸盐结合剂和维生素D类似物的施用,例如,用于治疗甲状旁腺机能亢进。(Goel等人(2011)“Treatment of Severe Metastatic Calcification and Calciphylaxis in Dialysis Patients,” INTERNATIONAL JOURNAL OF NEPHROLOGY 2011:1-5)。因此,在一个方面,本发明提供了对用于预防受试者中钙化防御或者减缓患有钙化防御的受试者中的组织钙化的发展、抑制其和/或使其逆转的方法的公开,其中受试者服用了钙基磷酸盐结合剂和/或维生素D类似物。所述方法可以包括每天向受试者施用至少2mg的基本纯的甲基萘醌-7 (MK-7) 和/或甲基萘酚-7 (MKH2-7)。在某些实施方式中,受试者患有甲状旁腺机能亢进。

[0103] 钙基磷酸盐结合剂的实例包括碳酸钙和乙酸钙。维生素D类似物的实例包括骨化三醇、阿法骨化醇、帕立骨化醇、马沙骨化醇和2-亚甲基-19-去甲-(20S)-1 α ,25(OH)₂D₃ (2MD)。

[0104] IV. 用于确定受试者中钙化防御的预防、发展减缓、抑制和/或逆转的生物标志物

[0105] 在某些实施方式中,可以评价生物标志物以确定本文所述的方法和/或组合物是否对于预防或治疗(例如,减缓发展、抑制和/或逆转)受试者中的钙化防御有效。这些包括例如测量受试者的T50时间和测量羧化维生素K依赖性蛋白与非羧化蛋白的比率,如以下更详细说明的。

[0106] 1. 初级钙蛋白颗粒 (Primary Calciprotein Particle) (CPP) 和血清T50

[0107] 在正常生理条件下,通过初级钙蛋白颗粒 (CPP) 部分防止了病理性钙化 (Price等人,如上)。CPP包含与两种钙化抑制蛋白,胎球蛋白A和基质Gla蛋白复合的循环磷酸钙晶体,(同上)。基质Gla蛋白是维生素K依赖性蛋白,并且CPP的形成取决于基质Gla蛋白的 γ 羧化作用,(同上)。临床前研究表明当体液防线,如焦磷酸盐、镁和白蛋白受压制时,钙蛋白系统起预防病理性钙化的替代方式的作用。在协调和时间依赖性过程中发生了初级CPP与磷酸钙晶体的结合。

[0108] 初级CPP向次级CPP 50%转化所需的时间 (T50) 是确定血浆多价螯合过量磷酸钙晶体的能力的准确和高灵敏度的方式。从初级向次级形式的转化包括了更细长的晶体的形成。伸长导致产生了更混浊的溶液,这是可以通过比浊法检测的。在重磷酸钙负荷条件下,由于用于磷酸钙吸收的储备量相应减少,因此达到50%转化的时间缩短。因此,短T50时间表示吸收磷酸钙晶体的能力降低,而长T50时间与高能力一致。短T50时间通常与华法林治疗,或者血液透析或尿毒症氧化负荷有关,并且一般与心肌梗塞、心力衰竭的高风险有关,并且均引起死亡。

[0109] 不希望受理论束缚,据信MK-7和/或MKH2-7的施用提高了T50时间并且改善了受试者预防病理性钙化的能力。由于CKD和ESRD受试者显示出降低的羧化基质Gla蛋白水平,这是维生素K依赖性的并且是初级CPP形成所必需的,因此根据本公开的方法的MK-7和/或MKH2-7的施用可以降低病理性钙化的风险并预防钙化防御的发展。

[0110] 因此,在本文所公开的方法的某些实施方式中,相对于施用MK-7和/或MKH2-7之前受试者的血清T50值,MK-7和/或MKH2-7向受试者的施用提高了受试者的血清T50值(例如,

提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。用于测量受试者的血清T50值的方法在本领域中是已知的。(参见,例如,Pasch等人(2012)“Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum.”J.AM.SOC.NEPHROL.23(10):1744-52;Dahle等人,(2016)“Serum Calcification Propensity Is a Strong and Independent Determinant of Cardiac and All-Cause Mortality in Kidney Transplant Recipients.”AM.J.TRANSPLANT 16(1):204-12;和Smith等人(2014)“Serum Calcification Propensity Predicts All-Cause Mortality in Predialysis CKD,”J.AM.SOC.NEPHROL.25(2):339-348)。

[0111] 在某些实施方式中,本公开涉及提高患有如本文所述的病症的受试者中的血清T50值的方法,所述方法包括向受试者施用至少2mg/天(例如,至少2mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7每天,例如,10、15、25、50或75mg每天)的MK-7和/或MKH2-7,其中相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的受试者的血清T50值,MK-7和/或MKH2-7向受试者的施用提高了受试者的血清T50值(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0112] 2. 维生素K依赖性蛋白的羧化

[0113] 尽管饮食缺乏,但是在ESRD患者中维生素K的水平可能未降低。例如,172位稳定血液透析患者的研究发现仅6%的患者显示出临床维生素K严重缺乏。(Holden等人(2010)“Vitamins K and D Status in Stages 3-5 Chronic Kidney Disease,”CLIN.J.AM.SOC.NEPHROL.5:590-597)。然而,当检查患者的羧化骨钙素(维生素K依赖性蛋白)的水平时,约60%的患者水平降低。(同上)对于其它维生素K依赖性蛋白,如PIVKA-II也显示出类似的结果。(同上,和Pilkey等人(2007)“Subclinical Vitamin K Deficiency in Hemodialysis Patients,”AM.J.KIDNEY DIS.49:432-439)。这些结果与尿毒症患者中的假设一致,总维生素K水平可以是正常的,而还原形式的产生受到尿毒症的氧化性质的阻滞,(同上)。

[0114] 氧化剂条件可以破坏维生素K循环的观察结果表明血液透析期间产生的氧化剂负荷进一步促成ESRD群体内所观察到的高软组织(例如,血管)钙化速率。已知血液透析的实施导致多种组织蛋白氧化,并且CKD和ESRD患者显示出比正常对照更高的羧基蛋白百分比(15-倍)。

[0115] 不希望受理论束缚,据信通过尿毒症和/或血液透析所产生的氧化负荷导致功能性维生素K氢醌(KH2)氧化成无功能的天然维生素。KH2的氧化阻断了其起GGCX的辅因子作用的能力,这导致维生素K依赖性蛋白的 γ 羧化的降低。因此,向糖尿病、CKD和/或ESRD受试者和/或经历血液透析的受试者施用MK-7和/或MKH2-7可以提高这些受试者中的一种或多种羧化维生素K依赖性蛋白与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率和/或降低这些受试者中一种或多种非羧化维生素K依赖性蛋白的量。

[0116] 因此,在某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的比率,MK-7和/或MKH2-7的施用提高了受试者血浆中羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将受试

者血浆中的羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率提高了约10%至500%或更高,约30%至约500%,约30%至约200%,约30%至约100%。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将受试者血浆中的羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率提高了约50%至约500%,约50%至约200%,约50%至约100%。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将受试者血浆中的羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率提高了约70%至约500%,约70%至约200%,约70%至约100%。

[0117] 在某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的量,MK-7和/或MKH2-7的施用降低了受试者血浆中非羧化维生素K依赖性蛋白的量(例如,降低了至少5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将受试者血浆中的非羧化维生素K依赖性蛋白的量降低了约5%至约100%,约5%至约80%,约5%至约30%,约20%至约100%或者约20%至约100%。

[0118] 在某些实施方式中,本公开涉及提高患有如本文所述的病症的受试者的血浆中的羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率的方法,所述方法包括向受试者施用至少2mg/天(例如,至少2mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7每天,例如,10、15、25、50或75mg每天)的MK-7和/或MKH2-7,其中相对于MK-7和/或MKH2-7施用前的比率,向受试者施用MK-7和/或MKH2-7提高了受试者血浆中的羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0119] 在某些实施方式中,本公开涉及降低患有如本文所述的病症的受试者的血浆中的非羧化维生素K依赖性蛋白的量的方法,所述方法包括向受试者施用至少2mg/天(例如,至少2mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7每天,例如,10、15、25、50或75mg每天)的MK-7和/或MKH2-7,其中相对于MK-7和/或MKH2-7施用前的量,向受试者施用MK-7和/或MKH2-7降低了受试者血浆中的非羧化维生素K依赖性蛋白的量(例如,降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0120] 在某些实施方式中,维生素K依赖性蛋白选自基质Gla蛋白(MGP)、生长抑制特异性基因6(Gas-6)蛋白、PIVKA-II蛋白、骨钙素、激活蛋白C或者激活蛋白S。如本领域中已知的,可以使用夹心测定测量MGP、Gas-6、PIVKA-II、骨钙素、激活蛋白C和激活蛋白S的羧化形式。(参见,例如,Nigwekar等人(2017),如上(检测MGP);Gla型骨钙蛋白(GLa-OC)ELISA试剂盒(Takara,芒廷维尤,CA);STA-Sta clot蛋白C(Stago,Asnières sur Seine,法国;和REAADS蛋白S抗原,产品目录号K036-001,Diapharma Group,西切斯特,OH)。施用MK-7后,受试者中羧化与非羧化维生素K依赖性蛋白的比率的升高指示GGCX羧化体系的成功挽回。因此,有效的MK-7和/或MKH2-7施用可以导致受试者中羧化与非羧化蛋白的比率的升高。

[0121] PIVKA-II是尚未羧化的凝血酶原的异常形式,也称为右旋- γ 羧基凝血酶原(DCP)。因此,PIVKA-II水平升高对应于较差的维生素K状态。作为维生素K状态的生物标志物,PIVKA-II具有不依赖肾功能和脂质谱的优势(Elliot等人(2014)“Assessment of potential biomarkers of subclinical vitamin K deficiency in patients with end-stage kidney disease,”CAN.J.KIDNEY HEALTH DIS.1:13)。根据本文中的方法,测量

受试者中的PIVKA-II指示了GGCX羧化体系的成功挽回。可以例如使用ELISA (Diagnostica Stage, Parsippany, NJ) 通过本领域中已知的任何方法测量PIVKA-II血浆水平。(还参见, 例如, Dituri等人(2012) “PIVKA-II plasma levels as markers of subclinical vitamin K deficiency in term infants,” J.MATERNAL-FETAL&NEONATAL MEDICINE 25(9):1660-1663)。

[0122] MGP被认为是动脉壁及其它软组织的有效的钙化抑制剂, 其中其活性取决于维生素K依赖性 γ -谷氨酸的羧化 (Schurgers等人(2007a), 如上; Westenfeld等人(2012) “Effect of vitamin K2 supplementation on functional vitamin K deficiency in hemodialysis patients: a randomized trial,” AM.J.KIDNEY DIS. 59(2):186-195; Schurgers等人(2013) “Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization,” TRENDS MOL MED 2013; 19(4):217-26; Marles等人(2017) “US Pharmacopeial Convention safety evaluation of menaquinone-7, a form of vitamin K,” NUTR.REV. 75(7):553-578)。由于维生素K缺乏所形成的未羧化的MGP与心血管疾病有关。最近的研究表明了血液透析患者中不良的维生素K状态 (Westenfeld等人(2012), 如上)。已表明MGP的循环无活性形式 (dp-ucMGP) 在CKD患者中逐渐增加 (Schurgers等人(2010), 如上) 并且指示了维生素K状态, 且与进行血液透析的患者中的血管钙化相关 (Delanaye等人(2014), 如上)。因此, 已提议将血浆dp-ucMGP作为CKD中血管钙化的替代标志物 (Schurgers等人(2010), 如上)。另外, 已提议将较低的循环去磷-羧化MGP (dp-cMGP) 水平作为血液透析患者中的死亡预测因子 (Schlieper等人(2011) “Circulating nonphosphorylated carboxylated matrix gla protein predicts survival in ESRD,” J.AM.SOC.NEPHROL. 22(2):387-95)。

[0123] 骨钙素是成熟成骨细胞合成的非胶原骨基质蛋白并且参与骨形成以及骨矿化的再胶凝 (Elliott等人2014, 如上; Marles等人2017, 如上)。未羧化的骨钙素的比例是骨中维生素K状态的灵敏标志物, 并且通过未羧化的骨钙素的比例升高超过20%来限定亚临床的维生素K缺乏 (Elliott等人2014, 如上)。已显示以100-200 μ g/d的剂量补充MK-7持续4至12周将显著且以剂量依赖性方式提高羧化与羧化不全 (undercarboxylated) 骨钙素的比率 (Inaba等人(2015), “Low-Dose Daily Intake of Vitamin K(2) (Menaquinone-7) Improves Osteocalcin γ -Carboxylation: A Double-Blind, Randomized Controlled Trials,” J.NUTR.SCI.VITAMINOL. 61(6):471-80)。

[0124] 在肝脏中合成了维生素K依赖性 γ -羧基谷氨酸蛋白, 并且通过促凝血因子 (II、VII、IX和X) 和抗凝蛋白 (C和S) 两者的平衡来帮助维持正常的血液凝固 (Schurgers等人(2007c) “Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7,” BLOOD 109(8):3279-83; Marles等人(2017) 如上)。蛋白C在存在辅因子蛋白S的情况下, 通过中和因子V和VIII的促凝血活性来调控凝血过程 (Marlar等人(2017) “Assessment of Hereditary Thrombophilia: Performance of Protein C (PC) Testing,” METHODS MOL.BIOL. 1646:145-151)。在钙化防御患者中已报道了高凝血状态, 如蛋白C和/或蛋白S缺乏, 并且提议将其作为钙化防御发展可能性升高的因素 (Wilmer等人(2002), 如上; Nigwekar等人(2008) “Calciphylaxis from nonuremic causes: a systematic review,” CLIN.J.AM.SOC.NEPHROL. 3(4):1139-43)。在

评价成年血液透析患者中维生素K2补充对功能性维生素K缺乏的作用的随机研究中,溶血患者(N=53)的dp-ucMGP水平比健康的年龄匹配的对照(N=50)高4.5倍,并且未羧化骨钙素水平高8.4倍。在49位血液透析患者中,PIVKA-II水平升高。维生素K2补充引起循环dp-ucMGP、未羧化骨钙素和PIVKA-II水平的剂量-和时间-依赖性减少。在接受135 μ g和360 μ g甲基萘醌-7的组中,dp-ucMGP水平降低的响应率分别为77%和93%(Westenfeld等人(2012)如上)。

[0125] 3. 钙化的其它生物标志物的水平

[0126] 在某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的骨保护素或胎球蛋白A的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用提高了骨保护素或胎球蛋白A的血浆水平(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的骨保护素或胎球蛋白A的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用将骨保护素或胎球蛋白A的血浆水平提高了约10-50%,约50-100%,约100-200%,或者约200-500%。骨保护素和胎球蛋白A是组织钙化的抑制剂。因此,骨保护素和/或胎球蛋白A水平的升高指示MK-7和/或MKH2-7的施用成功预防了钙化防御,减缓了其发展、抑制其和/或使其逆转。

[0127] 在某些实施方式中,本公开涉及提高患有如本文所述的病症的受试者中的骨保护素或胎球蛋白A的血浆水平的方法,所述方法包括向受试者施用至少2mg/天(例如,至少2mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7每天,例如,10、15、25、50或75mg每天)的MK-7和/或MKH2-7,其中相对于MK-7和/或MKH2-7施用前的骨保护素或胎球蛋白A的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7向受试者的施用提高了骨保护素或胎球蛋白A的血浆水平(例如,提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0128] 在任何上述方面的某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的D-二聚体的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用降低了D-二聚体的血浆水平(例如,降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在任何上述方面的某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的D-二聚体的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用将D-二聚体的血浆水平降低了约10-50%,约50-100%或者约10-100%。D-二聚体指示了维生素D代谢的功能状态。蛋白C和蛋白S防止凝血酶和纤维蛋白的产生,并且功能性维生素K的缺乏促成蛋白C和蛋白S的丧失,这可以通过纤维蛋白的降解和D-二聚体的形成导致小血栓形成。因此,D-二聚体的存在是亚临床血栓形成的指示。因此,D-二聚体血浆水平的降低可以表明MK-7和/或MKH2-7的施用成功恢复了GGCX羧化体系,这可以导致钙化防御的预防、发展减缓、抑制和/或逆转。

[0129] 在某些实施方式中,本公开涉及降低患有如本文所述的病症的受试者中的D-二聚体的血浆水平的方法,所述方法包括向受试者施用至少2mg/天(例如,至少2mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7每天,例如,10、15、25、50或75mg每天)的MK-7和/或MKH2-7,其中相对于MK-7和/或MKH2-7施用前的D-二聚体的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7向受试者的施用降低了D-二聚体的血浆水平(例如,降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0130] 在任何上述方面的某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用降低了超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆水平(例如,降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在任何上述方面的某些实施方式中,相对于MK-7和/或MKH2-7施用之前的超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7的施用将超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆水平降低了约10-50%,约50-100%或者约10-100%。hs-CRP是正在进行的炎症的生物标志物。炎症的存在提高了钙化防御。因此,hs-CRP血浆水平的降低可以表明MK-7和/或MKH2-7的施用成功预防了钙化防御,减缓其发展,抑制其和/或使其逆转。

[0131] 在某些实施方式中,本公开涉及降低患有如本文所述的病症的受试者中的超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆水平的方法,所述方法包括向受试者施用至少2mg/天(例如,至少2mg基本纯的MK-7和/或MKH2-7每天,例如,10、15、25、50或75mg每天)的MK-7和/或MKH2-7,其中相对于MK-7和/或MKH2-7施用前的超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆浓度,MK-7和/或MKH2-7向受试者的施用降低了超敏C反应蛋白(hs-CRP)的血浆水平(例如,降低了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

[0132] V. 病变

[0133] 本文所述的方法和组合物可以用于抑制或停止组织病变,例如皮肤病变或血管病变的发展,或者使其逆转。

[0134] 1. 皮肤病变

[0135] 维生素K循环的最终步骤需要通过维生素K环氧化物还原酶复合物亚基1(VKORC1,也称为VKOR(参见图1)将维生素K 2,3-环氧化物酶促还原回到MK-7。在一些组织中,横向同源物VKORC1L1(VKORC1-样-1)也可以实施所述反应。皮肤显示出最低的VKOR-C1表达,这与维生素K依赖性血管钙化在真皮(dermis,皮肤)中更常见的临床观察一致。VKOR-C1的低皮肤表达也表明阻止维生素K产生的任何状况或程序,如血液透析使皮肤易患病理性钙化。

[0136] 因此,本文所述的方法和组合物部分涉及减少皮肤病变的尺寸。在某些实施方式中,受试者患有皮肤病变,并且MK-7和/或MKH2-7的施用降低了皮肤病变的尺寸。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用减小了皮肤病变的总表面积,例如,减小了至少55%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将皮肤病变的总体积减少了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%(即消除了皮肤病变)。

[0137] 在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将皮肤病变的总表面积或体积降低了约30%至约100%,约30%至约90%,约30%至约80%,约30%至约70%,或者约30%至约60%。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将皮肤病变的总表面积或体积降低了约50%至约100%,约50%至约90%,约50%至约80%,约50%至约70%,或者约50%至约60%。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将皮肤病变的总表面积或体积降低了约70%至约100%,约70%至约90%,约70%至约80%。

[0138] 可以通过本领域中已知的任何方法测量一种或多种皮肤损害的表面积或体积。当

测量表面积时,如果存在多个病变,则可以计算平均总表面积。可以根据通过数字成像所构建的病变的三维模型来计算病变体积。

[0139] 此外,在皮肤病变的外在病征出现前,可以通过数字分析测量皮肤病变的尺寸。在另一个实施方式中,通过对皮肤活组织检查中的钙的Von Kossa染色,确定了MK-7和/或MKH2-7施用的有效性。这种公认的染色是检查和定量皮肤活组织检查中间质钙沉积的量的有效方式。以这种方法,采集皮肤活组织检查并使用Von Kossa法对组织染色。通过结合至软组织和血管磷酸盐沉积物,Von Kossa染色可以用于确定通过MK-7和/或MKH2-7的施用是否减缓或逆转了软组织和血管磷酸钙沉积的速率。由于磷酸钙沉积是钙化防御的病理发生的核心,因此Von Kossa染色减少表明导致钙化防御病变的病况的治愈。用于实施Von Kossa法的试剂盒是可商购的(参见,例如, **abcam®**, #ab150687)。

[0140] 在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将皮肤病变降低至治疗前的病变总表面的95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或者0%(即消除了皮肤病变)。

[0141] 2. 血管病变

[0142] 本文所述的方法和组合物部分涉及血管病变的减少。在某些实施方式中,受试者患有血管病变,并且MK-7和/或MKH2-7的施用减少了血管病变。可以使用主动脉体积描记法来评价血管病变的减少,所述方法测量了血管顺应性(即血管扩张能力)。(参见,例如, Inuma等人(2012) *HONG KONG JOURNAL OF NEPHROLOGY* 14(2):48-53)。

[0143] 还可以通过测量脉搏波传播速度(PWV)来评价血管病变的减少。PWV是动脉搏移动通过循环系统的速度并且将其用作动脉硬度的量度。较高PWV对应于较高动脉硬度,并因此对应于较低血管顺应性。测量PWV的方法在本领域中是已知的并且通过例如Pereira等人(2015)描述,如上。简要地,可以通过测量区域PWV,如颈动脉-股骨PWV,或者局部PWV来评价PWV。测量区域PWV的方法在本领域中是已知的并且包括例如脉搏传感器探针、TY-360压力传感器、同步心电图(ECG)的多普勒单元、脉搏传感器探针、光学体积描记术、**Complior®**(压电压力传感器)、**SphygmoCor®**、**Arteriograph®**和**PulsePen®**(血压计和整合的心电图单元)的使用,同上。测量局部PWV的方法在本领域中是已知的并且包括例如磁共振成像、超声波和血管照相术,同上。

[0144] 在某些实施方式中,相对于治疗前的血管顺应性,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的血管顺应性提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在某些实施方式中,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的血管顺应性提高了约10-50%,约50-100%,约100-200%,或者约200-500%。在某些实施方式中,相对于治疗前的血管顺应性,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的血管顺应性提高了至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在某些实施方式中,相对于治疗前的血管顺应性,MK-7和/或MKH2-7的施用将血管的血管顺应性提高了约10-50%,约50-100%,约100-200%,或者约200-500%。

[0145] VI. 用于在医学应用中使用的试剂盒

[0146] 本发明的另一个方面提供了用于治疗本文所述的一种或多种病症或病况的试剂

盒。试剂盒可以包括：i) 治疗医学病症的说明书；和ii) 含有基本纯的MK-7和/或MKH2-7的一个或多个剂量单位。

[0147] 在整个描述中，当将组合物描述为具有、包括或包含特定组分时，或者当将过程和方法描述为具有、包括或包含特定步骤时，则认为另外存在基本由所列举的组分组成或由所列举的组分组成的本发明的组合物，并且存在基本由所列举的处理步骤组成或由所列举的处理步骤组成的根据本发明的过程和方法。

[0148] 除非另外定义，否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0149] 在整个描述中，当将组合物和试剂盒描述为具有、包括或包含特定组分时，或者当将过程和方法描述为具有、包括或包含特定步骤时，则认为另外存在基本由所列举的组分组成或由所列举的组分组成的本发明的组合物和试剂盒，并且存在基本由所列举的处理步骤组成或由所列举的处理步骤组成的根据本发明的过程和方法。

[0150] 在本申请中，当将元素或组分称为包括在和/或选自所列举的元素或组分的列表中时，则应理解所述元素或组分可以是所列举的元素或组分中的任一种，或者所述元素或组分可以选自由两个或更多个所列举的元素或组分所组成的组。

[0151] 此外，应理解可以在不背离本发明的精神和范围的情况下，以多种方式组合本文所述的组合物或方法的元素和/或特征，无论在本文中明示或暗示。例如，除非另外根据上下文所理解的，否则当提及具体化合物时，可以在本发明的组合物的多个实施方式中和/或在本发明的方法中使用该化合物。换言之，在本申请内，已通过使得能够清楚且简明地书写和绘制本申请的方式，描述和显示了实施方式，但是旨在并且将理解可以在不背离本发明的教导和发明内容的情况下，不同地组合或分离所述实施方式。例如，将理解本文所述和所示的所有特征可以适用于本文所述和所示的本发明的所有方面。

[0152] 除非在上下文中是不适当的，否则在本公开中使用冠词“一个”和“一种”来表示一个或多于一个（即至少一个）该冠词的语法对象。举例来说，“一个元素”表示一个元素或大于一个元素。

[0153] 除非另外说明，否则在本公开中，术语“和/或”用于表示“和”或者“或”。

[0154] 除非另外根据上下文和使用所理解的，应理解“至少一个”的表达单独包括了该表达之后的每个所列举的对象，以及两个或更多个所列举的对象的不同组合。除非另外根据上下文将理解的，否则应将3个或更多个所列举的对象结合的表达“和/或”理解为具有相同含义

[0155] 除非另外具体表明或根据上下文将理解的，否则应将术语“包括(include)”“包括(includes)”、“包括(including)”、“具有(have)”、“具有(has)”、“具有(having)”、“包含(contain)”、“包含(contains)”、或“包含(containing)”，包括其语法等价形式的使用一般地理解为开放和非限制性的，例如，不排除其它未列举的元素或步骤。

[0156] 除非另外具体指明，否则当术语“约”的使用在定量的值之前时，本发明还包括特定的定量的值本身。除非另外说明或推断，否则如本文所使用的，术语“约”是指与标称值±10%的变化。

[0157] 除非另作说明或根据上下文将理解的，否则当提供例如聚合物的分子量而不是绝对值时，则该分子量应理解为平均分子量。

[0158] 除非另作说明,否则作为一般情况,指明百分比的组成是按重量计的。此外,如果变量未伴随有定义,则以该变量之前的定义为准。

[0159] 应理解步骤的顺序或者实施某些动作的顺序是不重要的,只要本发明保持可运行即可。此外,可以同时进行两个或更多个步骤或动作。

[0160] 除非另外主张,否则本文的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“如”或“包括”)的使用仅旨在更好地描述本发明并且不对本发明的范围造成限制。本说明书中的语言不应视为表示任何未主张的元素对本发明的实践是必要的。

[0161] 实施例

[0162] 通过以下实施例进一步描述了本公开,不应将所述实施例视为将本公开的范围或精神限制于本文所述的具体程序。应理解提供实施例以说明某些实施方式,并且不旨在借此限制本公开的范围。

[0163] 实施例1-在具有出现钙化防御风险的受试者中施用MK-7和/或MKH2-7

[0164] 本实施例描述了向具有出现钙化防御风险但是尚未出现钙化防御的皮肤病变特征的受试者施用MK-7和/或MKH2-7。所考虑的风险因素包括但不限于糖尿病、肥胖症、ESRD和/或血液透析,以及在先的华法林治疗(Nigwekar等人(2016),如上)。据考虑MK-7和/或MKH2-7的施用可以导致保护受试者免受皮肤损害以及指示钙化防御出现的预防的某些生物标志物水平的变化。

[0165] 具有出现钙化防御风险的受试者每天口服10mg、25mg或50mg的MK-7和/或MKH2-7一次,服用至少2周、4周、6周、8周、3个月、6个月、1年或无限期服用。剂型为10mg或25mg软凝胶胶囊剂。向50mg剂量群组每天施用一次两个25mg胶囊剂。

[0166] 应注意并非所有具有升高的钙化防御风险因素的受试者将出现钙化防御的特征性皮肤损害。用MK-7和/或MKH2-7前摄(在钙化防御的临床诊断之前)治疗的目的在于预防病变出现。因此,将频率降低或消除病变出现认为是成功治疗。

[0167] 可以评价几种生物标志物以确定MK-7和/或MKH2-7在3个剂量水平的效力。示例性的生物标志物包括PIVKA-II;未羧化的和总基质Gla蛋白(MGP);未羧化、羧化和总骨钙素蛋白;未羧化、羧化和总蛋白C、骨保护素、胎球蛋白A和hs-CRP。

[0168] 根据以下日程表获得血液样品以测量生物标志物。以每周或每月为基础,采血可以发生在治疗期间。已考虑MK-7和/或MKH2-7的施用将导致(i) PIVKA-II、骨保护素或胎球蛋白A的升高,其指示钙化防御发展减缓、抑制或逆转,(ii) 未羧化的MGP、未羧化的骨钙素和/或未羧化的蛋白C减少,其指示钙化防御发展减缓、抑制或逆转。

[0169] 此外,可以测量脉搏波传播速度(PWV)以评价动脉顺应性。改善的血管顺应性将指示钙化防御发展的减缓、抑制或逆转。

[0170] 实施例2-在诊断为钙化防御的受试者中施用MK-7和/或MKH2-7

[0171] 本实施例描述了MK-7和/或MKH2-7向诊断为钙化防御的受试者的施用。典型症状包括特征性疼痛皮肤损害的出现(Nigwekar等人(2015)“Calciphylaxis:Risk Factors,Diagnosis,and Treatment.”Am.J.Kidney Dis.66:133-46)。通过皮肤活组织检查实现钙化防御的确定诊断(Nigwekar,2015,如上)。需要考虑其它条件来修正诊断(同上)。

[0172] 诊断为钙化防御的受试者每天口服10mg、25mg或50mg的MK-7和/或MKH2-7一次,服用至少2周、4周、6周、8周、3个月、6个月、1年或无限期服用。剂型为10mg或25mg软凝胶胶囊

剂。向50mg剂量群组每天施用一次两个25mg胶囊剂。

[0173] 将病变尺寸和频率的抑制或减小认为是成功治疗的指示。已考虑根据上述内容的MK-7和/或MKH2-7的施用将导致病变尺寸和频率的抑制或减小。

[0174] 另外,由于钙化防御具有显著的死亡风险,因此诊断的受试者延长的整体存活时间将是治疗成功的指示。已考虑根据上述内容的MK-7和/或MKH2-7的施用将导致诊断受试者的整体存活时间升高。

[0175] 实施例3-接受血液透析的稳定终末期肾病(ESRD)受试者中的MK-7和/或MKH2-7的施用

[0176] 本实施例描述了MK-7向接受血液透析并且具有出现钙化防御风险的ESRD受试者的施用。MK-7的施用可以导致指示钙化防御出现的预防的某些生物标志物水平变化,或者导致抑制或减缓钙化防御的出现。

[0177] 在本研究中招募了患有稳定ESRD,但无钙化防御的一些受试者,其中受试者每天口服10mg MK-7胶囊剂,服用14天。在第1天和第15天(治疗结束)评价某些生物标志物,包括未羧化的基质G1a蛋白(MGP)、未羧化的骨钙素、骨保护素、胎球蛋白A和hs-CRP的水平,并计算第1天和第15天之间的变化。在第1天和第15天之间,未羧化的MGP的平均降低为-21.9%,未羧化的骨钙素的平均降低为-55.5%。另外,受试者意外显示出骨保护素和胎球蛋白A的平均升高以及hs-CRP的降低。骨保护素、胎球蛋白A和hs-CRP不是维生素K依赖性蛋白,并且据信先前尚未证实由于MK-7的摄入而导致这些蛋白变化。骨保护素的平均升高为14.5%,胎球蛋白A的平均升高为23.1%,并且hs-CRP的平均降低为-35.8%。

[0178] 基于本研究,MK-7的施用可以导致未羧化的MGP、未羧化的骨钙素和hs-CRP减少,以及胎球蛋白A和骨保护素的增加,这可以指示MK-7的施用预防或停止或减缓了受试者中的钙化防御的发展。

[0179] 通过引证并入

[0180] 本文所提及的每项专利和科学文献的整个公开内容出于所有目的通过引证并入。

[0181] 等价形式

[0182] 在不背离其精神或基本特征的情况下,可以在其它具体形式中体现本发明。因此,认为上述实施方式在所有方面是说明性的,而不是对本文所述的发明的限制。因此,通过所附权利要求,而不是通过上述描述指明了本发明的范围,并且权利要求的等价形式的含义和范围内的所有变化旨在包含在其中。

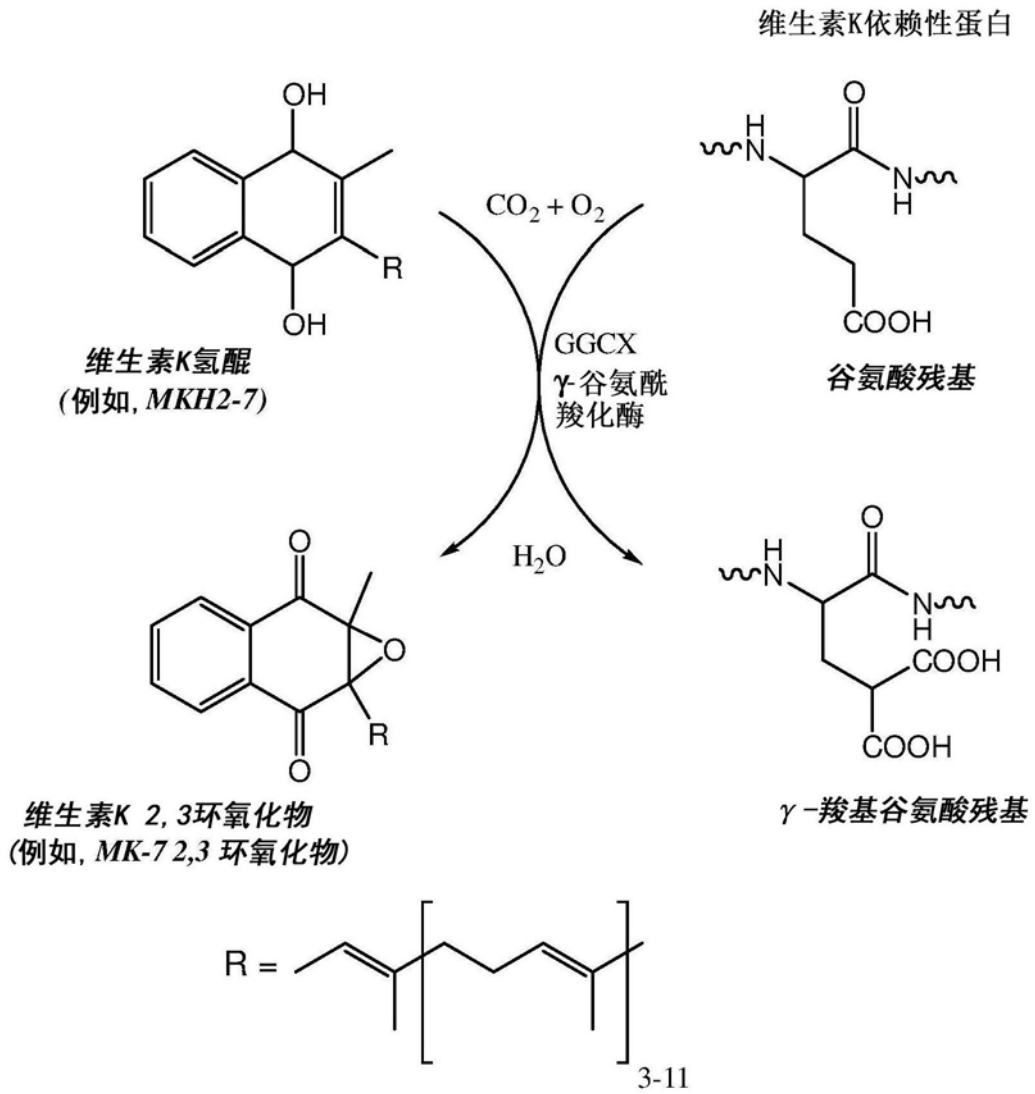


图2