(12) **PATENT**

(11) **343923** (13) **B1**

(19) NO

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20090692	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.07.13 PCT/EP2007/006241
(22)	Inng.dag	2009.02.12	(85)	Videreføringsdag	2009.02.12
(24)	Løpedag	2007.07.13	(30)	Prioritet	2006.07.14, NO, 20063291 2006.07.14, NO, 20063292 2006.09.06, NO, 20063988
(41)	Alm.tilgj	2009.04.01			
(45)	Meddelt	2019.07.08			

(73) Innehaver PHARMACO AS, c/o NattoPharma ASA, Postboks 397, 1326 LYSAKER, Norge

(72) Oppfinner Jo Klaveness, c/o NattoPharma ASA, Postboks 2896 Solli, 0230 OSLO, Norge
Hogne Vik, c/o NattoPharma ASA, Postboks 2896 Solli, 0230 OSLO, Norge
Stein Westbye, c/o NattoPharma ASA, Postboks 2896 Solli, 0230 OSLO, Norge
Cees Vermeer, c/o Universiteit van Maastricht, Postbus 616, 6200MD MAASTRICHT, Nederland
Leon J Schurgers, c/o Universiteit van Maastricht, Postbus 616, 6200MD MAASTRICHT, Nederland
Anne Bjørnebye Vik, c/o Nattopharma ASA, Postboks 2896 Solli, 0230 OSLO, Norge

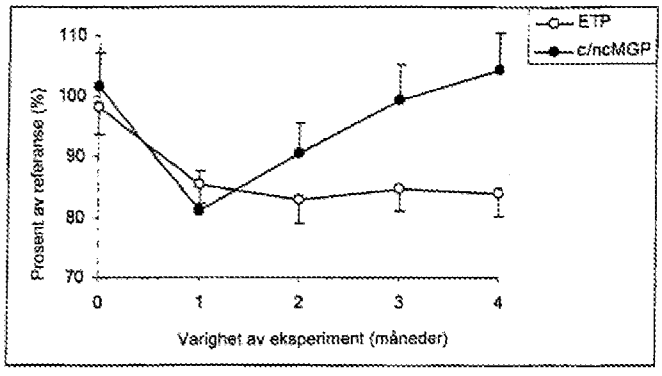
(74) Fullmektig ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **Farmasøytiske og nutrasøytiske produkter som innbefatter minst en forbindelse innenfor vitamin K2 klassen og slike produkter for forebygging eller terapi av forstyrrelser relatert til ben, brusk og det kardiovaskulære systemet.**

(56) Anførte publikasjoner EP 1153548 A1, JP 2003169632 A, JP 2003313142 A, WO 0201969 A1, WO 02074308 A1, JP 2005237300 A, WO 2005030190 A1, WO 2004019923 A1, US 5180747 A

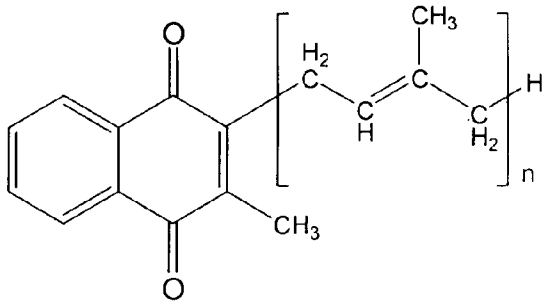
(57) Sammendrag

Et farmasøytisk og nutrasøytisk produkt er tilveiebrakt som innbefatter vitamin K_2 eller en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser, eventuelt og fortrinnsvis i kombinasjon med en eller flere flerumettede fettsyrer, enten i renset form eller som en marin olje (dvs. fiske- og/eller krillolje). Også tilveiebrakt er anvendelsen av vitamin K_2 eller en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser, fortrinnsvis i kombinasjon med en eller flere flerumettede fettsyrer, enten i renset form eller som en marin olje, ved behandling eller profylakse av forstyrrelser relatert til ben, brusk og det kardiovaskulære systemet. Foretrukne forbindelser innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser er MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, særlig MK-7 eller MK-9. Den marine oljen er foretrukket krillolje eller fiskeolje.



Foreliggende oppfinnelse angår farmasøytiske og nutrasøytiske produkter som innbefatter minst en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser, i kombinasjon med en eller flere av en polyumettet fettsyre, fiskeolje og krillolje, og deres anvendelse ved behandling eller profylakse av forstyrrelser relatert til ben, brusk og det kardivaskulære systemet. Særlig angår oppfinnelsen også anvendelsen av slike produkter ved behandling og/eller hindring av osteroporose, aterosklerose og osteoartritt.

Vitamin K_2 er en gruppe av forbindelser kalt menaquinoner ("MK") som alle er 2-metyl-3-all-trans-polyprenylerte-1,4-naftoquinoner som har følgende strukturformel:



De kjemiske forskjellene mellom de forskjellige MKene relateres til antallet isoprenenheter i sidekjeden. De forskjellige MKene blir normalt referert til som klasse MK-2, MK-3, MK-4, MK-6 osv. Antallet refererer til antallet isoprenenheter (n=2, n=3, n=4, n=6 ...).

Begrepet vitamin K_2 refererer til den naturlig forekommende blandingen av de forskjellige MK substansene. MK-2 til og med MK-13 er naturlig tilstede i dyre- og menneskevev. Diettkilder av vitamin K_2 er typisk fermenterte produkter, spesielt ost og ostemasse. Også visse flatfisker og ål kan inneholde noe vitamin K_2. "Natto", som produseres fra fermenterte soyabønner er en populær kilde for vitamin K_2 som et "sunnhetsprodukt" i Japan. Det daglige inntaket av vitamin K_2 kan variere over et bredt spekter og kan typiske være fra noen få µg til flere milligrams; generelt under 50 µg. Vitamin K_2 angis å ha flere fordelaktige effekter for menneskehelse, først og fremst relatert til det kardiovaskulære systemet og benmetabolisme.

Osteoporose er en medisinsk tilstand kjennetegnet ved redusert benmasse og forandringer i mikroarkitekturen av benet. Det er estimert at mer enn 200 millioner kvinner har osteoporose verden over. Osteoporose og osteoporosefrakturer er økende over hele verden først og fremst som et resultat av den rasktvoksende eldre populasjonen.

Behandling av osteoporose i dag inkluderer typisk hormonbehandling, inntak av kalsium og vitamin D og legemiddelbehandling ved anvendelse av bisfosfonater.

Aterosklerose er en kardiovaskulær sykdom som kan berøre arteriene av flere vitale organer som inkluderer hjerne, hjerte, nyrer så vel som armer og ben. I de fleste vestlige land er aterosklerose en ledende årsak til død. Antallet dødsfall fra aterosklerose er ca. to ganger antallet dødsfall fra alle kreftsykdommer tilsammen. Aterosklerose er en sakte, progressiv sykdom som kan starte så tidlig som i barndommen. Ved aterosklerose mister arteriene deres elastisitet og blir harde. Det er flere tilstander assosiert med utvikling og progresjon av sykdommen som inkluderer risikofaktorer som fedme, diabetes, hypertensjon og røyking. Mens aterosklerose rent medisinsk er generelt definert som en inflammatorisk sykdom i arterial tunica intima, blir arteriosklerose mer bredt definert og innbefatter også andre former for vaskulær sykdom slik som Mønckebergs sklerose i media.

Artrose, inflammatorisk artritt, reumatoid artritt og osteoartritt er sykdommer i brusk og de er kjennetegnet ved artikulær degenerering. Patologisk er det en forandring i bruskstrukturen. Disse sykdommene berører leddene og sykdom kan ofte enkelt diagnostiseres med røntgen. Flere typer legemidler blir i dag anvendt for behandling av disse sykdommene. Disse inkluderer enkle analgesiske midler, NSAIDer, COX 2 inhibitorer, kortikosteroider og glukosamin.

I løpet av de siste årene beskriver flere publikasjoner en positiv effekt når det gjelder inntak av vitamin K_2 på osteoporose; se for eksempel W. Sakamoto et al. i *Osteoporosis International* 16, 1604-1610 (2005); M. Kaneki i *Clinical Calcium* 15, 605-610 (2005); J. Iwamoto et al. i *Current Farmasøytisk Design* 10, 2557-2576 (2004); K. Nakayama i *Horumon to Rinsho* 52, 339-349 (2004); S. Shiomi et al. i *American Journal of Gastroenterology* 97, 978-981 (2002) og T. Hosoi i *Bone (Osaka)* 14, 95-97 (2000).

Det er flere publikasjoner relatert til anvendelsen av vitamin K_2 eller Natto for behandling av aterosklerose eller tilsvarende tilstander; se for eksempel Y. Ozawa i *Gifu Daigaku lgakubu* 50, 20-26 (2002); L. J. Schurgers et al i *Zeitschrift für Kardiologie* 90 (Suppl. 3), iii57-iii63 (2001); Y. Seyama i *Clinical Calcium* 9, 873-878 (1999); H. Kawashima et al. i *Jap. Journal of Pharmacology* 75, 135-143 (1997) og J. M. Geleijnse et al. i *the Journal of Nutrition* 134, 3100-3105 (2004).

I en nylig publikasjon rapporterte T. Neoqi et al. (Arthritis & Rheumatism 54, 1255-1261 (2006)) at lave nivåer av serum vitamin K er assosiert med en økt hyppighet av osteoartritt.

Polyumettede fettsyrer, eller PUFAer, er langkjedede fettsyrer som inneholder to eller flere dobbelbindinger. Interesse for dem oppstår fra deres potentiale innenfor terapeutiske anvendelser, og mat- og ernæringsanvendelser. De forekommer i dyr, plante, alger, sopp og bakterier og blir omfattende funnet i mange lipidforbindelser slike som membraner, lagringsoljer, glykolipider, fosfolipider, sfingolipider og lipoproteiner. De fremstilles kommersielt fra valgte frøplanter og noen marine kilder.

PUFAer grupperes i to serier på basis av posisjonen til den terminale dobbelbindingen være 3C eller 6C fra det terminale karbonatomet til fettsyrekjeden. Noen eksempler er: 3-serie PUFA, også referert til som omega-3 eller (n-3) PUFA, inkluderer omega-3 fettsyreanriket diettoljer, slik som fiskeolje, krillolje, eikosapentensyre (EPA), dokosaheksensyre (DHA), linolensyre (LA), og alfa-linolensyre (ALA). 6-serie PUFA inkluderer gamma-linolensyre (GLA) og arakidonsyre (AA).

Krill er en gruppe av rekelignende marine dyr som lever i Arktis og Antarktisområdene. Størrelsen på krill er normalt mellom 5 og 50 mm. Det er flere arter av krill. De arktiske artene inkluderer *T. inermis, T. rushii, T. longicauda* og *M. norvegia*, mens Antarktis-artene inkluderer *E. superba* og *E. crystallorphias*. Krill og krillrelaterte produkter har blitt foreslått som komponenter i fór for fisk; se for eksempel KR 2005031319, KR 2004087618, JP 2003070426, US 6153251 , EP 729708, SU 1784152, JP 05030923, JP 0465454 og JP 61274653.

Videre blir krill og krillbaserte produkter anvendt som fiskeagn (se for eksempel CN 1820626), i kombinasjon med konjugert linolensyre for behandling og profylakse av sykdommer (US 2006078625), som additiver for å inhibere oksidasjon av lipider (WO 2005075613), som gjødningsstoffer (CN 1502589), som mat (JP 2004065152 og WO 2003/003857), for behandling av kardiovaskulære sykdommer, artritt, hudkreft, diabetes og premenstruelt syndrom (WO 2002/102394), som en kilde for enzym for behandling av acne og andre sykdommer (US 5958406, US 5945102, US 6030612, WO 96/24371 og WO 93/24142) og som en kilde for multifunksjonelle enzymer (US 6030612). Krillenzymer har ytterligere blitt foreslått for behandling av trombose (WO 95/33471) og anvendes for fremstilling av sammensetninger for dental anvendelse (WO 95/33470).

Krill eller krillbaserte produkter er også foreslått som fungicider (JP 07033619), som antidiabetiske midler (JP 04042369) og proteiner fra krill har blitt foreslått for fremstilling av (JP 01137952). Andre patentdokumenter relatert til krill og krillkomponenter er: tannpasta som innbefatter krillfettsyrer (JP 2568833), kosmetikk som inneholder proteaser ekstrahert fra krill for hudrensning (JP 63218610), antiinflammatorisk proteinase fra krill (JP 61068419), tromboseoppløsningsmiddel (EP 170115), enzym sammensetning som digesjonpromoter (WO 85/04809), kitinpreparat (PL 114387), karotenoidpreparater (PL 113328, krabbekjøttlignende mat (JP 57125677, JP 57079863 og JP 67050848), antihypertensive midler (JP 54119011) og krillbasert mat (JP 60046947, JP 61023987 og JP 55040218).

Det totale lipidinnholdet av krill varierer fra art til art. Det er også variasjoner når det gjelder totalt lipidinnhold i løpet av året. Lipidsammensetningen til krill varierer også for hver art i løpet av året. Den totale lipidmengden i krill er typisk mellom 5 og 60%. Prosentandel av totale triglyceroler og voksestere av totalt lipid i krill kan variere over et bredt område; hver fra tilnærmet null til 70%. I tillegg til triglyceroler og voksestere innbefatter krillipid heretter krillolje, fosfolipider, steroler, frie fettsyrer og fettalkoholer. Typiske fosfolipider inkluderer forbindelser som fosfatidylkoliner og fosfatidylethanolaminer. Krilloljen kan være i form av råolje oppnådd fra krill eller i form av renset eller modifisert olje. Umettede forbindelser og polyumettede forbindelser danner en stor andel av fettforbindelsene i krillolje. Hovedfettsyrebestanddelene i krillolje er følgende fettsyrer: 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).

For referanser til sammensetning av krillolje, se for eksempel: S. Falk-Perdersen et al. i Can. J. Fisk Aquat. Sci. 57 (Suppl. 3) 178-191 (2000), F. Alonzo et al. i *Marine Ecology: Progress Series* 296, 65-79 (2005), N. Kusumoto et al. i *J. Oleo Science* 53, 45- 51 (2004) og referanser heri.

Selv om det er flere farmasøytiske produkter på markedet for behandling av osteoporose og kardiovaskulær sykdom, eksisterer det fremdeles et trengende behov for alternative tilnærminger.

Det har nå blitt overraskende funnet at vitamin K_2 og polyumettede fettsyrer (PUFAer) kan formuleres sammen i en stabil formulering med lang lagringstid.

Således, i et første aspekt, tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk eller nutrasøytisk produkt for oral administrering som omfatter minst en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser bestående av MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, i kombinasjon med minst en av en polyumettet fettsyre, enten renset eller i form av en marin olje, hvori nevnte produkt er en tablettformulering eller en kapselformulering.

I en utførelsesform er det ovennevnte produktet for profylakse eller terapeutisk behandling av minst en av aterosklerose, arteriosklerose, osteoporose, osteoartritt eller en inflammatorisk eller degenerativ sykdom omfattende brusk.

I en utførelsesform er nevnte polyumettede fettsyre i det ovennevnte produkt, i form av fiskeolje eller krillolje eller hvori nevnte polyumettede fettsyre er en n-3 polyumettet fettsyre, foretrukket EPA eller DHA eller en blanding derav, eller hvor nevnte fettsyre er en kombinasjon av EPA og DHA i form av deres triglycerider eller etylestere.

I et andre aspekt, tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk eller nutrasøytisk produkt, som omfatter minst en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser som er valgt fra MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, for forebygging eller terapi av minst en av kardiovaskulær-, ben- og bruskrelaterte sykdommer eller forstyrrelser hos mennesker og dyr, og ytterligere omfatter minst en av en polyumettet fettsyre, enten renset eller i form av en marin olje hvori vitamin K_2 forbindelsen administreres i en dosering i området fra 5-50 μg per dag.

I en utførelsesform er nevnte polyumettede fettsyre i produktet for anvendelse ifølge oppfinnelsens andre aspekt i form av fiskeolje eller krillolje eller hvori nevnte polyumettede fettsyre er en n-3 polyumettet fettsyre, foretrukket EPA eller DHA eller en blanding derav, eller hvor nevnte fettsyre er en kombinasjon av EPA og DHA i form av deres triglycerider eller etylestere.

Disse og andre aspekter ved foreliggende oppfinnelse vil bli diskutert mer i detalj i følgende detaljerte beskrivelse og eksempler.

Det ble også funnet at vitamin K_2, og særlig MK-7, ikke motvirker antikoagulant-effekten til marine oljer eller n-3 PUFA.

Det ble videre funnet at de høyere menaquinonene, særlig MK-7 og høyere, motvirker potentielle arteriekalsifiserings-induserende effekter til marine oljer.

Det ble ytterligere funnet at høyere menaquinoner, særlig MK-7 og høyere, motvirker potentielt negative aspekter ved marine oljer på benhelse.

Det ble også videre funnet at høyere menaquinoner, særlig MK-7 og høyere, motvirker potentielt negative aspekter ved marine oljer på bruskhelse.

Det ble videre funnet, i cellekulturstudier, at MK-7 ble tatt bedre opp enn andre K vitaminer. MK-8 og MK-9 ble tatt opp i noe mindre grad, men ved et sammenlignbart nivå, mens MK-4 og vitamin K_1 ble tatt opp i langt mindre grad.

Det ble videre funnet, i cellekulturstudier, at de langkjedede menaquinonene, særlig MK-8 og MK-9, mindre trolig vil interferere med oral antikoagulantbehandling i forhold til andre former av vitamin K.

Figur 1 viser det endogene trombinpotentialet (ETP), som reflekterer den totale trombin aktiviteten i løpet av koagulering. Karboksylerte og ikke-karboksylerte matriks GIa-protein (MGP) arter ble overvåket ved anvendelse av sandwich ELISAer basert på konformasjonsspesifikke antistoffer med normalt oppsamlet plasma som en referanse. Forandringen i MGP 15 karboksylering var signifikant etter en måned, men signifikans forsvant i løpet av måneder 3 og 4. Se eksperiment 2 nedenfor.

Figur 2 viser i det samme eksperimentet som i Figur 1 karboksylerte og ikke-karboksylerte osteokalsinarter i serum ved anvendelse av konformasjonsspesifikke osteokalsinkit. Forandringen i osteokalsinkarboksylering var signifikant etter en måned, men signifikans forsvant i løpet av måneder 3 og 4. Se eksperiment 3 nedenfor.

Figur 3 viser den eksepsjonelle stabiliteten til MK-7 løst i fiskeolje og krillolje. Prøver ble fremstilt i forseglede glassflasker og holdt i mørke ved romtemperatur, 40°C og 100°C, respektivt. Ved regulære tidsperioder ble prøver tatt og analysert for deres MK-7 innhold. Ikke noe tap av MK-7 ble observert, selv etter 2 uker ved 100°C. Se Eksperiment 4 nedenfor.

Figur 4 viser stabiliteten til vitaminer K_1, MK-4, MK-7, MK-8 og MK-9 i tre cellekultur medier (anvendt for dyrking av de tre forskjellige celletypene beskrevet nedenfor, respektivt) uten celler tilstede. Se Eksperiment 5 nedenfor.

Figurer 5A-C viser doseresponskurver for cellulært vitamin K opptak i tre forskjellige celletyper; celler ble dyrket til 80% konfluens, hvoretter vitamin K (dvs. K_1, MK-4, MK-7, MK-8 og MK-9) ble tilsatt i forskjellige konsentrasjoner. Figur 5D viser et plot av MK-7 opptaket i tre celletyper ved samme skala. Se Eksperiment 6 nedenfor.

Figurer 6A-C viser det cellulære opptaket av vitaminer K_1, MK-4, MK-7, MK-8 og MK-9 i tre forskjellige celletyper som en funksjon av tid; celler ble dyrket i dyrkningsmediet beskrevet i Eksperiment 5. I alle tilfeller ble en blanding av disse K vitaminene tilsatt til cellene etter at de hadde blitt dyrket til 80% konfluens. Se Eksperiment 7 nedenfor.

Figurer 7A-C viser omfanget hvorved warfarin blir forbigått av de forskjellige formene av vitamin K (som måles med K epoksiddannelse). Dess mer KO som dannes, dess høyere omfang av forbigåelse via enzymet DT diaforase. Se Eksperiment 8.

Figurer 8A-C viser omfanget hvorved de forskjellige formene av vitamin K blir anvendt under fravær av warfarin, men under betingelser med cellesulting. Dess mer KO som dannes, dess færre vitamin K typer blir resirkulert. Se Eksperiment 9 nedenfor.

Begrepet "polyumettet fettsyre" slik det anvendes heri, refererer til en hvilken som helst polyumettet fettsyre, om den er i form av et triglycerid, en fysiologisk akseptabel ester, en fri fettsyre eller et fysiologisk akseptabelt salt av en polyumettet fettsyre. Mer spesifikt blir begrepet anvendt for å indikere omega-3 fettsyrer, og omega-3 fettsyre-anrikede diettoljer slike som fiskeolje og krillolje. I litteraturen er omega-3 fettsyrer også kjente som (n-3) polyumettede fettsyrer eller n-3 PUFA.

Begrepet "krillolje" slik det anvendes heri, er ment å indikere alle lipofile komponenter i krill og kan være råkrillolje, renset krillolje, forbindelser fra krillolje og derivater av komponenter fra krillolje.

Slik det anvendes heri, blir fiskeolje og krillolje kollektivt betegnet som "marine oljer".

Begrepet "vitamin K_2", som anvendt heri, refererer til naturlig forekommende menaquinoner (MKer) eller blandinger derav.

Begrepet "forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser", som anvendt heri, refererer til en enkel menaquinon (MK) forbindelse.

Begrepet "først og fremst MK-7" slik det anvendes heri, refererer til sammensetninger hvori minst 90% av alle vitamin K_2 forbindelser i sammensetningen, i henhold til HPLC analyse, er MK-7.

Foreliggende oppfinnelse er primært basert på visse overraskende funn i i-dybdestudier når det gjelder de farmakologiske egenskapene til vitamin K_2, og særlig de høyere menaquinonene (MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10), og kombinasjoner av disse forbindelser med PUFAer, i ren form eller i form av fiskeolje eller krillolje. Disse funnene tilveiebringer nye muligheter og utfordringer for forbedrede produkter innenfor det farmasøytiske og nutrasøytiske feltet relatert til profylakse eller behandling av visse kardiovaskulærrelaterte, benrelaterte og bruskrelaterte forstyrrelser og, mer generelt, resulterer i fordelaktige effekter på helsen til mennesker og dyr.

Disse funnene vil bli diskutert mer i detalj nedenfor.

Flere helseaspekter ved n-3 PUFA har blitt rapportert som inkluderer en markert fordelaktig effekt på kardiovaskulær sykdom. Slik det har blitt gjennomgått av Van Schoonbeek et al. *(Journal of Nutrition* 133, 657-660 (2003)), er de fordelaktige effektene til n-3 PUFA og marine oljer basert på multiple mekanismer som inkluderer reduksjonen av blodplateaktivitet, en mer fordelaktig blodlipidprofil og en reduksjon i blodkoagulerbarhet.

Hypokoagulanteffekten til marin olje og n-3 PUFA skyldes først og fremst en reduksjon av den hepatiske vitamin K statusen og en samtidig reduksjon av vitamin K-avhengige proppefaktorer II, VII, IX, og X, som fører til et redusert trombindannende potentiale. C.M.A. Nieuwenhuys et al. konkluderte at *"Prolonged administration of n-3 but not n-6 PUFAs can lead to a hypocoagulable state of plasma through a reduced capacity of vitamin K-dependent thrombin generation with unchanged thrombin inactivation by antithrombin"*. En spesifikk inhibering av vitamin K-avhengig proppefaktorsyntese ble også rapportert av C. Leray et al. *(Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, 459-463 (2001)). Dette er i overensstemmelse med observasjonen til L.J. Schurgers et al. (Journal of Lipid Research 43, 878-884 (2002)), at noen diettoljer kan interferere med vitamin K absorpsjon og metabolisme hos friske frivillige. Direkte bevis for interferens med vitamin K metabolisme ble gitt av C.M.A. Nieuwenhuys et al. *(Thrombosis Research* 104, 137-147 (2001)) som viser at fiskeolje og n-3 PUFAer reduserte vitamin K nivåene i leveren (dvs. stedet hvor proppefaktorene syntetiseres). Videre viste M. Andriamampandry et al. *(Medical Sciences* 321 , 415-421 (1998)) at

den milde antikoagulanteffekten til fiskeolje ble fullstendig reversert med en svak økning av vitamin K_1 inntak.

Det har nå overraskende blitt funnet at vitamin K_2, særlig MK-7, ikke reverserer den fordelaktige effekten til fiskolje. I doseringer typisk mellom 1 og 10 µg/dag påvirket MK-7 ikke det ekstrinsiske trombinpotentialet (ETP), som er det mest sensitive målet for tromboserisiko. Således kombinerer blandinger av vitamin K_2 med n-3 PUFA eller marin olje de fordelaktige effektene av begge typer forbindelser og virket til og med synergistisk i dyremodeller og hos frivillige mennesker. I doser på 100 µg MK-7 per dag og høyere ble den ETP-reduserende effekten til marine oljer fullstendig reversert. Det skal noteres at disse dosene av MK-7 er relatert til et marinoljeinntak på 5 g per dag. Ved høyere fisk- eller krilloljekonsumpsjon er også dosen som kreves for interferens med ETP høyere.

Selv om en dårlig vitamin K status kan ha en mild antikoagulant (dvs. antitrombotisk) effekt, er vitamin K påkrevd i et annet aspekt av vaskulær helse. Matriks Gla-protein (MGP) er et vitamin K-avhengig protein syntetisert i den arteriale karveggen. Den aktiveres av vitamin K-avhengig karboksylering og i dens karboksylerte form virker den som en sterk inhibitor av vaskulær kalsifisering. Ved anvendelse av konformasjons-spesifikke antistoffer, ble det demonstrert av Schurgers et al. *(Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 25, 1629-1633 (2005)) at aterosklerose og vaskulær kalsifisering er nært assosiert med dårlig vitamin K status i karveggen, og fant i et undersøkende klinisk forsøk L.A.J. L. M. Braam et al. *(Thrombosis & Haemostasis* 91 , 373-380 (2004)) at høy dose vitamin K-supplementering (1 mg/dag) hadde store fordeler for vaskulær elastisitet. Vi har funnet at marin olje og n-3 PUFA ikke bare fordelaktig reduserer produksjonen av vitamin K-avhengige proteiner i leveren (proppefaktorene), men reduserer også vitamin K- statusen til ekstrahepatisk vev og således reduserer aktiveringen (ved glutamatkarboksylering) av ekstra-hepatiske vitamin K-avhengige proteiner som inkluderer osteokalcin og matriks Gla-protein (MGP). Dette er en uventet bivirkning fra marine oljer og n-3 PUFA med potentielt skadelig utkomme for kardiovaskulær helse, for benhelse og for utvikling av brusksyk-dommer. Den reduserte karboksyleringen til den vaskulære kalsifiseringsinhibitoren MGP er for eksempel en hovedrisikofaktor for vaskulær kalsifisering, hypertensjon, myokardiskt infarkt og kardiovaskulær død.

Det har nå overraskende blitt funnet at høyere menaquinoner, først og fremst MK-7, i doseringer på mellom 1 og 10 µg/dag ikke motvirker den milde antikoagulanteffekten til

marine oljer (som måles med ETP), men samtidig stimulerer de effektivt MGP karboksylering til nivåer tilsvarende eller til og med høyere enn nivået hos subjekter som ikke anvender marin olje. Dette er beskrevet i Eksperiment 2 nedenfor. Således er MK-7 en essensiell ingrediens for å ha maksimal fordel av marin olje og n-3 PUFA-inneholdende mat og matsupplementer direkte anvendt for kardiovaskulær helse.

Marine oljer og n-3 PUFA har også blitt funnet å ha fordelaktige effekter på benhelse. I eksperimentelle dyremodeller reduserte slike oljer markert bentapet i ovariekterte mus og matbegrensede rotter (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)). Det har blitt rapportert av mange forfattere at lavt vitamin K inntak, dårlig vitamin K status og svekket osteokalcinkarboksylering er risikofaktorer for utvikling og progresjon av osteoporose. Se for eksempel: 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). Det har også blitt demonstrert at økt inntak av vitamin K resulterer i en redusert grad av bentap hos postmenopausale kvinner (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)). Doseringene anvendt i disse studiene varierer mellom 1 mg/dag for K_1 og 45 mg/dag for K_2. I dette lys må den marinoljeinduserte reduksjonen av osteokalcinkarboksylering anses som en skadelig bivirkning som delvis ødelegger for fordelene ved marine olje for benhelse. Den rapporterte høye dosevitamin K behandlingen kan motvirke bivirkningen, men vil også annihilere den milde antikoagulant-effekten rapportert å være fordelaktig for kardiovaskulær sykdomshindring.

Det har nå overraskende blitt funnet at de høyere menaquinonene, først og fremst MK-7, i doser varierende mellom 1 og 10 μg/dag ikke motvirket den milde antikoagulant effekten til marine oljer (som måles med ETP), men samtidig stimulerer effektivt osteokalcinkarboksylering til nivåer tilsvarende eller til og med over nivået hos subjekter som ikke anvender marin olje. Dette er beskrevet i Eksperiment 3 nedenfor. Således er MK-7 en essentiell ingrediens for å maksimere fordelen fra marin olje og n-3 PUFA-inneholdende mat og matsupplementer direkte anvendt for benhelse.

Marine oljer og n-3 PUFA har også blitt funnet å motvirke degenerativ og inflammatorisk leddsykdom som observeres ved osteoartritt, reumatoid artritt og ankyloserende spondylititt. I cellekulturstudier ble det demonstrert at supplementering med n-3 PUFA, ikke n-6 PUFA, forårsaket en reduksjon i både degenerative og inflammatoriske

aspekter ved kondrocyttmetabolisme, mens det ikke hadde noen effekt på normal vevshomeostasis (CL. Curtis et al., *Proc. Nutr. Soc.* 61 , 381-389 (2002)). Også populasjonsbaserte studier viser en positiv rolle til fiskeolje og n-3 PUFA for behandling av osteoartritt, reumatoid artritt og andre sykdommer vedrørende brusk (se for eksempel: L.G. Cleland et al., *Drugs* 63, 845-853 (2003) og M.J. James et al., *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* 68, 399-405 (2003)). Som beskrevet ovenfor, reduserte marine oljer og n-3 PUFA ikke bare produksjonen av vitamin K-avhengige proteiner i leveren (proppefaktorene), men reduserte også vitamin K-statusen til ekstrahepatiske vev og reduserte således aktiveringen (ved glutamatkarboksylering) av ekstrahepatiske vitamin K-avhengige proteiner som inkluderer osteokalcin og matriks Gla-protein (MGP). MGP er et av de mest forekommende proteinene syntetisert av brusk, og vitamin K er nødvendig for det aktivering ved glutamatkarboksylering. Dårlig MGP karboksylering har blitt assosiert med osteoartritt, reumatoid artritt og ankyloserende spondylititt. Helt klart er en fremgangsmåte nødvendig for motvirkning av den marinolje-induserte reduksjonen av vitamin K status i brusk.

Det har nå overraskende blitt funnet at ernæringsrelevante doser av MK-7 motvirker potentielt negative aspekter ved marine oljer på bruskhelse. Det faktum at de høyere menaquinonene, først og fremst MK-7, i doseringer som varierer mellom 1 og 10 µg/dag, ikke motvirker den milde antikoagulanteffekten til marin olje (som måles ved ETP), men samtidig effektivt stimulerer både osteokalcinkarboksylering og MGP karboksylering til nivåer tilsvarende eller til og med over nivået hos subjekter som ikke anvender marin olje viser at MK-7 er i stand til å tilveiebringe optimal vitamin K status i ben, som inkluderer brusket i leddene i løpet av marine oljesupplementering. Således er MK-7 en essentiell ingrediens for å maksimere fordelen fra marine oljer og n-3 PUFA-inneholdende mat og matsupplementer direkte anvendt for bruskhelse.

I en serie cellekultureksperimenter ble vitamin K opptake og metabolisme under forskjellige betingelser undersøkt. De følgende formene for vitamin K ble sammenlignet: Ki, MK-4, MK-7, MK-8 og MK-9. De ble testet i tre forskjellige celletyper: de vaskulære glattmuskelcellene, den osteoblastlignende MG-63 cellelinjen og den hepatocyttlignende HepG2 cellelinjen. I alle eksperimentene ble vitaminene anvendt som en blanding som inneholder 1 µmol/L av hvert vitamin.

Det ble funnet at i alle cellene blir MK-7 tatt bedre opp enn andre K vitaminer. MK- 8 og MK-9 blir tatt opp i noe mindre grad, K_1 og MK-4 langt mindre.

Det ble også funnet at under nærvær av antikoagulanten warfarin, ble det membranbundede enzymet VKOR blokkert og således kan vitamin K ikke resirkuleres. Etter bruk holdes den i den oksiderte formen (K-epoksid); mengdene epoksider representerer omfanget av bruken. Det ble funnet at langkjedede menaquinoner og særlig MK-9 ikke kan bli redusert, og således ikke anvendes som et koenzym for karboksylase under disse betingelsene. De mer vannløselige vitaminene K_1 og MK-4 kan imidlertid anvende det cytoplasmiske enzymet DT-diaforase for reduksjon og interferere med oral antikoagulantbehandling. Derfor vil trolig langkjedede menaquinoner i mindre grad interferere med oral antikoagulantbehandling i forhold til andre former av vitamin K. Dette er et viktig sikkerhetsaspekt, og i overensstemmelse med dyreeksperimenter som har blitt publisert tidligere (Craciun, A.M., Groenen-van Dooren, M. M. C. L., Thijssen, H.H.W., Vermeer, C. (1998). *Induction and prothrombin synthesis by K-vitamins compared in vitamin K-deficient and in brodifacoum- treated rats. Biochim. Biophys. Acta* 1380, 75-81.

Under fravær av warfarin og i rikt medium blir ingen epoksider dannet i det hele tatt. Hvis konsentrasjonen av fosterkalveserum i dyrkningsmediet reduseres, blir ernæringsstatusen til cellene underoptimal. Også under disse betingelsene ble MK-4 og K_1 epoksidene først og fremst funnet. Konklusjonen nå er forskjellig i forhold til warfarin eksperimentet, imidlertid: de langkjedede menaquinonene anvendes fordelaktig og konkurrerer vellykket med K_1 og MK-4 ved reduksjonsnivået ved VKOR. Derfor kan det konkluderes at langkjedede menaquinoner blir foretrukket anvendt ved gamma-karboksylering av forskjellige proteiner. Dette er i overensstemmelse med tidligere publiserte cellefrie enzymkinetikkstudier som viser at Michaelis konstant (Km) for vitamin K reduseres med økende lengde av dens sidekjede (Buitenhuis, H. C, Soute, B.A.M., Vermeer, C. (1990). *Comparison of the vitamins K_1, K_2 and K_3 as cofactors for the hepatic vitamin K- dependent carboxylase. Biochim. Biophys. Acta* 1034, 170-175).

Det har nå blitt funnet at vitamin K_2 og polyumettede fettsyrer kan formuleres sammen i en stabil formulering med lang lagringstid. For eksempel ble MK-7 blandet med fiskeolje eller krillolje i et bredt spekter av konsentrasjoner og disse sammensetningene holdt seg stabile under disse betingelsene i minst 2 uker ved 100°C, i 6 måneder ved 40°C og i 3 år ved romtemperatur. Detaljer når det gjelder disse studiene er vist i Eksperiment 4 nedenfor.

Som definert ovenfor, refererer begrepet "polyumettet fettsyre" (PUFA) til en hvilken som helst PUFA i form av et triglycerid, en fysiologisk akseptabel ester, en fri fettsyre

eller et fysiologisk akseptabelt salt derav. Det beskrives sammensetninger av PUFAer og menaquinoner der PUFAer er kombinert først og fremst med MK-7. Videre beskrives sammensetning av PUFA og MK substanser hvori minst 95% av alle vitamin K_2 forbindelser i sammensetningen, i henhold til HPLC analyse, er MK-7 med MK-6 som hovedvitamin K_2 urenheten. Et typisk forhold mellom MK-7 og MK-6 i sammensetninger er i området mellom 90 til 10 og 95 til 5.

Det beskrives sammensetninger av vitamin K_2 eller en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser og PUFA som innbefatter en PUFA valgt fra n-3 PUFAer. Mer foretrukket er n-3 PUFAer eikosapentaensyre (EPA) som er en 20:5 syre og dokosaheksensyre (DHA) som er en 22:6 syre.

En enda mer foretrukket n-3 PUFA komponent i produkter beskrevet heri er en kombinasjon av EPA og DHA. Det mest foretrukne forholdet EPA : DHA er innenfor området 2:1 til 1.2.

I den mest foretrukne sammensetningen er EPA og DHA i form av triglycerider eller etylestere.

Formuleringene av produktene blir foretrukket administrert systematisk (for eksempel oralt eller parenteralt). Den mest foretrukne doseringsformen er en oral doseringsform; særlig kapsler og tabletter. Doseringen og administrasjonsruten vil avhenge av faktorer slik som alder og kjønn til individet, alvorligheten og typen forstyrrelse eller sykdom, og lignende, og kan enkelt bestemmes av fagmannen, vanligvis en lege, eller kan instruksjonsbrosjyren til produsenten følges som vanligvis ledsager produktet.

Tabletter og kapsler kan fremstilles på vanlig måte slik det er kjent i litteraturen. Kapsler kan for eksempel være myke eller harde gelatinkapsler som i tillegg til vitamin K_2 eller vitamin K_2 forbindelser og polyumettet fettsyre innbefatter inaktive farmasøytisk akseptable komponenter, for eksempel stivelse. Tabletter kan, for eksempel, fremstilles ved direkte sammenpressing eller ved sammenpressing av granuler ved anvendelse av vanlige tablettmaskiner. Tabletter kan i tillegg til vitamin K_2 eller vitamin K_2 forbindelser og umettet fettsyre innbefatte farmasøytisk akseptable inaktive ingredienser godt kjente i litteraturen. Slike midler kan for eksempel være cellulosederivater og magnesiumstearat. Tabletter kan være belagte med et mageresistent belegg, for eksempel celluloseacetatftalat.

De orale doseringsformene, kapsler og tabletter, har hver en vekt 100 mg og 2 g. Mengden av vitamin K_2 eller vitamin K_2 forbindelser i hver tablett eller kapsel kan variere over et bredt spekter, avhengig blant annet av faktorer slik som alvorligheten og typen sykdom eller forstyrrelse, og tilstanden, kjønn og alder til pasienten. Mengden av vitamin K_2 eller en vitamin K_2 forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser i en tablett eller kapsel er typisk mellom 1 og 500 μg, selv om høyere mengder også er mulig. Foretrukne doseringer av vitamin K_2, og først og fremst MK-7, er mellom 2 og 300 μg, mer foretrukket 5-50 μg, og mest foretrukket mellom 10-20 μg per dag.

Mengden av umettet fettsyre i hver tablett eller kapsel kan også variere avhengig av typen umettet fettsyre, alvorligheten og typen sykdom, alder til pasienten og frekvens for administrasjon av tabletten eller kapselen. Mengden av umettet fettsyre i hver tablett eller kapsel er typisk mellom 300 og 1200 mg, foretrukket mellom 400 og 1000 mg, mest foretrukket mellom 500 og 900 mg.

Data som angis viser at ved doseringer så høye som 10 μg per dag kan marin olje (ved en på ca. 5 g) og MK-7 kombineres uten å interferere med den milde antikoagulant-effekten til marin olje. Således har MK-7 doseringer mellom ca. 1 og minst 10 μg (helt klart dess høyere, dess bedre innenfor nevnte område) vist seg å være fordelaktige når det gjelder administrasjon til et menneske eller dyr. Doseringer så høye som 100 μg per dag er ikke mulig i forhold til formålet beskrevet her, på grunn av at disse doseringer ble funnet å motvirker effekten av warfarin, som er en enda sterkere inhibitor av blodproppefaktorkarboksylering enn n-3 PUFAs er. Se Schurgers, L.J., Teunissen, K.J. F., Hamulyak, K., Knapen, M.H.J., Vik, H., Vermeer, C. "Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K_1 and natto-derived menaquinone-7". *Blood 109* (2007) 3279-3283.

Det vil være å forstå at doseringer av vitamin K og marine oljer også kan variere avhengig av variasjonen og kvaliteten av den marine oljen. Det anbefales derfor å anvende blandinger av marine oljer for å opprettholde et konstant forhold i sammen-setningene.

Det vil også være å forstå at vitamin K_2 eller en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser også kan formuleres separat og uavhengig fra en eller flere polyu-mettede fettsyrer (som inkluderer fiskeolje og krillolje), for eksempel i en farmasøytisk sammensetning eller en nutrasøytisk sammensetning (matsupplement). Egnede farmasøytiske sammensetningene og typiske doseringer er tilsvarende de som er

beskrevet ovenfor eller kjente for fagmannen. Egnede nutrasøytiske sammensetninger og typiske doseringer er for eksempel beskrevet i EP1153548.

Sammensetningene som beskrevet heri kan eventuelt innbefatte andre farmasøytiske eller nutrasøytiske aktive komponenter; for eksempel vitaminer som vitamin D eller vitamin D derivater; aktive legemiddelforbindelser slike som bisfosfonater, typisk alendronat; eller kardiovaskulære legemidler, slike som ACE inhibitorer, for eksempel enalapril, angiotensin II reseptorantagonister, for eksempel losartan, beta-blokkere, for eksempel propranolol, plasmalipidreduserende komponenter, slike som statiner, typisk simvastatin, og andre legemidler.

Av de høyere menaquinonene, MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, er anvendelsen av MK-7 generelt den mest foretrukne, slik det vil forstås fra foreliggende beskrivelse. I tillegg foretrukket er MK-9, både på grunn av dens fordelaktige og lovende egenskaper og på grunn av dens tilgjengelighet siden den kan syntetiseres enkelt.

Foreliggende oppfinnelse vil nå ytterligere bli beskrevet med referanse til følgende eksempler og eksperimentelt arbeid, som imidlertid ikke er konstruert som noen begrensning av oppfinnelsen i noe henseende.

Eksempel 1. Kapsel som innbefatter EPA etylester, DHA etylester og MK-7

En olje som innbefatter 97% MK-7 og 3% MK-6 blandes med EPA etylester og DHA etylester. Alfa-tokoferol tilsettes, og den resulterende oljen filles i harde gelatin 5 kapsler.

Hver kapsel inneholder:

MK-7	97 µg
MK-6	3 µg
EPA etylester	463 mg;
DHA etylester	375 mg
Alfa-tokoferol	4 mg

Eksempel 2. Torskeleverolje som innbefatter vitamin K_2

Vitamin K_2 løses i torskeleverolje (fra EPAX, Norge) og fylles i grønne glassflasker (250 ml) med en metallforsegling. Flaskene merkes "Vitamin K_2 tran" for salg på det norske markedet.

En daglig dose (5ml) av dette produktet inneholder:

Vitamin A:	250 µg
Vitamin D:	10 µg
Vitamin K_2 (MK-7):	10 µg
Fiskeolje:	1,2 g, hvor DHA var 0,4 g og EPA var 0,6 g Alfa-tokoferol: 4 mg

Eksempel 3: Kapsel som innbefatter krillolje og MK-7.

Krillolje som innbefatter polyumettede fettsyrer i triglycerolform, fosfolipider og andre naturlige komponenter (oppnådd fra Enzymotec, Israel) blandes med MK 7 og alfa-tokoferol. Den resulterende oljesammensetningen fylles i myke gel eller harde gelatin-kapsler eller fremstilles som et oljeinneholdende granulat eller løsemiddel.

Hver kapsel inneholder:

MK-7	97 µg
MK-6 3 µg krillolje	700 mg
Alfa-tokoferol	4 mg

Eksempel 4: Krillolje som innbefatter Vitamin K_2

Vitamin K_2 løses i krillolje og fylles i glassflasker (250 ml) med metallforsegling. Flaskene merkes "Krilloljetran med Vitamin K" for salg på det norske markedet eller "Krillolje som inkluderer vitamin K" for US og UK markedet. En daglig dose (5 ml krill olje) inneholder i området mellom 5 og 500 µg Vitamin K_2

Eksempel 5: Fiskefór som innbefatter krillolje og Vitamin K_2

Vitamin K_2 (100 mg) løses i krillolje (1 kg). Fiskfór (fra Skretting AS, Stavanger, Norge) males opp. Det oppmalte fiskeføret (20 kg) blandes med krillolje som innbe fatter Vitamin K_2 (1 kg) ved anvendelse av en blender. Vann tilsettes, og det delvis våte materialet siktes (3 mm) og tørkes i 24 timer ved 40°C for å oppnå et fiskefórgranulat.

Fórgranulatet inneholder ca. 5% krillolje og 2-100 ppm vitamin K_2.

Eksempel 6: MK-8 kapsler

En olje som innbefatter MK-8 (HPCL analyse viser MK-8 høyere enn 70% av total Vitamin K2) fylles i myke gelatinkapsler. Hver kapsel inneholder 5 µg MK 8.

Eksempel 7: Kapsler som innbefatter EPA etylester, DHA etylester og blanding av MK-8, MK-9 og MK-10

En olje som innbefatter en blanding av MK-8, MK-9, MK-10 blandes med EPA etylester og DHA etylester. Alfa-tokoferol tilsettes og den resulterende oljen fylles i harde gelatinkapsler.

Hver kapsel inneholder:
MK-8, MK-9, MK-10 50 µg
EPA etylester 463 mg
DHA etylester 375 mg
Alfa-tokoferol 4 mg

Eksempel 8: Torskeleverolje som innbefatter MK8

MK8 (mer enn 65% i henhold til HPLC analyse) løses i torskeleverolje og fylles i grønne glassflasker (250 ml) med metallforsegling. Flaskene merkes med "Vitamin K2 tran" for salg på det norske markedet.

En daglig dose (5 ml) av dette produkt inneholder:
Vitamin A 250 µg
Vitamin D 10 µg
MK-8 10 µg
Omega-3 fettsyrer 1,2 g, hvor DHA var 0,6 g og EPA var 0,4 g dl-Alfa-tokoferylacetat 6 mg

Eksperiment 1: Karboksyleringsgraden av osteokalcin ved osteoartritt, osteopati og reumatoid artritt.

Tre pasientgrupper ble rekruttert og sammenlignet med alders- og kjønnsmatchende friske subjekter. Vitamin K statusen til hvert subjekt ble avlest ved å måle forholdet mellom karboksylert og ikke-karboksylert osteokalcin (cOC/ucOC forhold), som er den mest sensitive biomarkøren for ekstrahepatisk vitamin K status (B. Panis et al., *Bone* 2006; 39:1123-1129). Pasienter som lider av osteoartritt og kondropati var relativt unge og ble sammenlignet med en ung referansegruppe $(A)_1$ pasienter med reumatoid artritt var eldre og således sammenlignet med en eldre referansegruppe (B). Konformasjons-spesifikke undersøkelser for osteokalcin ble oppnådd fra Takara (Japan). Se Tabell 1 nedenfor.

Dette eksperimentet demonstrerer at vitamin K statusen (uttrykt som karboksyleringsgrad av sirkulerende osteokalcin) blir signifikant redusert hos subjekter med osteoartritt, kondropati og reumatoid artritt sammenlignet med den friske populasjonen.

Tabell 1

	Kontroll A	Kontroll B	Osteoartritt	Kondropati	Reumatoid artritt
Alder (år)	32	45	34	31	48
Kjønn (% menn)	48	51	42	54	45
Antall per gruppe	30	30	27	49	29
cOC/ucOC forhold	1,39	1,28	1,04	0,71	0,38
Område	0,52-2,49	0,48-2,34	0,14-2,0	0,12-1,95	0,16-1,67
Forskjell kontroll A			P < 0,05	P < 0,005	
Forskjell kontroll B					P < 0,002

Eksperiment 2: MGP karboksylering i løpet av langtids fiskeoljeinntak og effektene av MK-7 inntak ved 10 µg/dag

Tyve friske hannkjønnsindivider (43 ± 8 års alder) ble innrullert i studien. Den midlere kroppsmasseindeksen var 25,1 ± 3,5 kg/m^2. Alle subjekter mottok 5 g fiskeolje (som inneholder 35% EPA, 25% DHA og 10% andre n-3 PUFA) per dag i løpet av 4 måneder. I løpet av de siste 3 månedene av studien mottok alle frivillige ytterligere en myk gelkapsel per dag som ga 10 µg av MK-7. Blodprøver ble samlet opp i citrat hver måned for fremstilling av blodplaterik plasma. Det endogene trombinpotentialet (ETP), som reflekterer den totale trombinaktiviteten i løpet av koagulering, ble overvåket i henhold til H.C. Hemker et al. (*Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2003;33:4-15). Karboksylerte og ikke-karboksylerte matriks Gla-protein (MGP) prøver ble overvåket ved anvendelse av sandwich ELISAer basert på konformasjons-spesifikke antistoffer oppnådd fra VitaK BV (Maastricht, Nederland) med normalt oppsamlet plasma som en referanse. Se Figur 1. Forholdet mellom karboksylert og ikke-karboksylert MGP blir tatt som et mål for vaskulær vitamin K status. Alle verdier ble uttrykt som en prosent av de i den oppsamlede referanseplasmaen. Forandringen i ETP var statistisk signifikant ($p<0,05$) etter en måned og holdt seg på denne måten i løpet av de etterfølgende månedene. Forandringen i MGP karboksylering var også signifikant etter en måned, men signifikansen forsvant i løpet av måneder 2, 3 og 4.

Dette eksperimentet demonstrerer at den fiskeolje induserte hypokoagulerkingsevnen ikke blir motvirket av de lave dosene av MK-7 som kreves for å opprettholde MGP karboksylering ved sitt opprinnelige nivå.

Eksperiment 3: Osteokalcinkarboksylering i løpet av langtids fiskeoljeinntak og effektene av MK-7 inntak ved 10 µg/dag

I det samme eksperiment som beskrevet ovenfor ble også serum oppsamlet, hvori karboksylerte og ikke-karboksylerte osteokalcinprøver ble overvåket ved anvendelse av konformasjonsspesifikke osteokalcin kit fra Takara (Japan). Forandringen i osteokalcin karboksylering var signifikant etter en måned, men signifikansen forsvant i løpet av måned 3 og 4. Se Figur 2. Dette eksperimentet demonstrerer at den fiskeoljeinduserte hypokoagulerkingsevnen ikke blir motvirket av de lave dosene av MK-7 som kreves for å opprettholde osteokalsinkarboksylering ved det opprinnelige nivå.

Eksperiment 4: Stabilitet av MK-7 i fiskeolje og krillolje

Sammensetninger som beskrevet i eksemplene 2 og 4 (MK-7 løst i fiskeolje og krillolje, respektivt) ble fremstilt til en sluttkonsentrasjon på 2 µg MK-7 per g olje. Prøvene ble fremstilt i forseglede glassflasker og holdt i et mørkt rom ved romtemperatur, 40°C og 100°C, respektivt. Ved regulære tidspunkter ble prøver tatt og analysert for deres MK-7 innhold. Se Figur 3. Det ble ikke observert tap av MK-7, selv etter 2 uker ved 100°C. Dette eksperimentet demonstrerer den eksepsjonelle stabiliteten til MK-7 løst i fiskeolje og krillolje.

Eksperimenter 5-9: Cellekulturstudier

Denne serien av cellekultureksperimenter beskriver vitamin K opptak og metabolisme under forskjellige betingelser. De følgende formene av vitamin K ble sammenlignet: K_1, MK-4, MK-7, MK-8 og MK-9. De ble testet i tre forskjellige celletyper: vaskulære glattmuskelceller, osteoblastlignende MG-63 cellelinje og hepatocyttlignende HepG2 cellelinje. I alle eksperimentene ble vitaminene anvendt som en blanding som inneholder 1 µmol/L av hvert vitamin. Alle data er gjennomsnittsverdier av triplikate eksperimenter.

Sammensetningen (v/v) av de forskjellige dyrkningsmediene var:

	HepG2	VSMC	MG63
EMEM (fra Sigman)	87%	78%	87%
Fosterkalveserum	10%	20%	10%
Penicillin/streptamicin	1%	1%	1%
L-glutamin	1%	1%	1%
Natriumpyruvat	-	-	1%
Ikke-essensielle aminosyrer	1%	-	-

Eksperiment 5

Her har vi sjekket stabiliteten til de forskjellige formene av vitamin K (1 μM av hver) i tre celledyrkningsmedier uten celler tilstede. Dataene er gitt i Figur 4.

Konklusjon: I alle tre dyrkningsmediene var vitaminene K_1, MK-7, MK-8, og MK-9 relativt stabile i løpet av 48 timer, mens MK-4 viste en reduksjon til verdier mellom 70 og 80% av grunnlinjen i løpet av de første 24 timene og mellom 60 og 70% av grunnlinjen etter 48 timer. Grunnen for denne reduksjonen er fremdeles uklar, men betingelser må velges på en slik måte at forsvinningen av MK-4 ikke influerer data for cellulært opptak av vitamin K. For å holde MK-4 tapet lavest mulig, ble alle ytterligere eksperimenter utført i løpet av ikke lenger enn 24 timer.

Eksperiment 6

Celler ble dyrket til 80% konfluens hvoretter vitamin K ble tilsatt i forskjellige konsentrasjoner (se Figurer 5A-C). Den tilsatte vitamin K konsentrasjonen gis som nmol/L dyrkningsmedium, vitamin K oppnådd gis som nmol/g av cellulært protein. Bemerk de forskjellige skalaene for hvert vitamin.

Konklusjoner:

1. Dose-responskurvene for alle vitaminer er horisontale mellom 500 og 1000 nmol/L; således arbeidet vi under metningsbetingelser og selv reduksjonen av MK4 (per i dag ikke forstått) vil ikke berøre utkommet av ytterligere studier.
2. Overraskende var det en svært stor forskjell i vitamin K opptak av de forskjellige cellene, hvor vaskulære glattmuskelceller ga de høyeste og MG63 de laveste verdiene. Dette er demonstrert i Figur 5D, hvor vi har plottet MK-7 opptak i de tre celletypene ved samme skala.

3. I alle systemene, men spesielt i de ekstrahepatiske cellene, ble MK-7 overraskende tatt opp bedre enn de andre K vitaminene. Dette ble ytterligere demonstrert i følgende eksperimenter.

Eksperiment 7

Cellulært opptak av K vitaminer ble fulgt over tid. I alle tilfeller ble en blanding av de forskjellige K vitaminene (1 μmol/L sluttkonsentrasjon i dyrkningsmediet) tilsatt til cellene etter at de hadde vokst til 80% konfluens. Data er gitt i Figur 6. Overraskende ble MK-7 tatt bedre opp enn noen av de andre K vitaminene. Mekanismen bak denne cellulære preferansen for MK-7 er ikke helt klar.

Konklusjoner:

1. Opptaket flater ut etter 4 timer og når platenivåer ved 8 timer;
2. Graden av opptak og verdien for platånivåene er forskjellig for hvert vitamin;
3. MK-7 tas opp bedre enn noen av de andre vitaminene i alle tre cellesystemer.

Eksperiment 8

Under normale betingelser blir alle former av vitamin K tatt opp i deres quinonform, og de er redusert til hydroquinonet før de er aktive som en kofaktor for enzym gamma-glutamylkarboksylasen. I løpet av karboksyleringen ble de oksidisert til epoksider, som kan reduseres med det membranbundede enzymet VKOR. VKOR danner målet for legemidler kjente som koumarinderivater, som inaktiverer enzymet og således blokkerer resirkuleringen av K epoksider. Vitamin K quinoner (og ikke epoksidene) kan reduseres av et andre enzymsystem, kjent som DT diaforase. Således blir virkningen av koumarin-derivativer, slik som warfarin, antagonisert ned ekstra vitamin K. I tillegg blir hvert molekyl av vitamin K som anvendes under nærvær av warfarin, omdannet til det korresponderende epoksidet, som ikke kan anvendes videre. Således er K epoksid-konsentrasjonen et direkte mål for mengden av vitamin K anvendt i løpet av warfarin behandling. Koumarinderivater blir omfattende anvendt som orale antikoagulanter; deres virkningsmodus er basert på inhiberingen av proppefaktorkarboksylering i leveren. Interferens med koumarinderivater er således en potentiell risiko ved vitamin K supplementer. derfor har vi undersøkt om og i hvilken grad de forskjellige K vitaminene interfererer med warfarin. I studien som er beskrevet blir 10 μmol/L warfarin tilsatt til dyrkningsmediet 18 timer før tilsetning av vitamin K. Også i løpet av inkubering med K vitaminer var denne konsentrasjonen av warfarin tilstede. Resultatene er vist i Figur 7.

I MG63 cellelinjen kunne vi kun identifisere MK-4 epoksid (MK4-O), i de andre systemene ble mer K vitamine detektert i deres epoksidform. I alle tilfellene er det opplagt at de mer vannløselige formene av vitamin K (MK-4 og K_1) er i stand til å passere effekten av warfarin, mens ved økende hydrofobisitet blir interferensen med warfarin mindre. Den viktigste celletypen i denne serien er HepG2 cellelinjen, siden denne representerer hepatocyttene, plassen hvor blodproppefaktorer syntetiseres. Det er nærliggende fra Figur 7 at det er en invers korrelasjon mellom interferensen med warfarin og hydrofobisitet til vitamin K prøvene. MK-9 epoksider ble nesten ikke dannet. På dette tidspunktet var MK-10 og MK-11 ikke kommersielt tilgjengelige, men det forventes ved ekstrapolering at disse langkjedede menaquinonene ikke vil interferere i det hele tatt, og kan sikkert gis som et supplement selv til pasienter på oral antikoagulant (koumarin) behandling.

Konklusjoner:

1. Kortkjedede K vitaminer K_1 og MK-4 interfererer vesentlig med warfarin, mens interferens med langkjedede menaquinoner er mindre.
2. Anvendelse av K-vitaminer under nærvær av warfarin er inverst relatert til lengden av sidekjeden: MK-7 > MK-8 > MK-9.
3. På basis av disse eksperimentene kan det forventes at MK-9 og MK-10 ikke vil interferere på en klinisk relevant måte med oral antikoagulantbehandling.

Eksperiment 9

Etter å ha demonstrert at langkjedede menaquinoner blir absorbert godt av de forskjellige cellene, og at de nesten ikke anvendes i løpet av warfarinbehandling, gjenstår det å demonstrere at disse vitamin K prøvene blir aktivt anvendt under ikke-inhibert (warfarinfrie) betingelser. Siden under standard celledyrkningsbetingelser ingen epoksider blir dannet, har vi anvendt underoptimale dyrkningsbetingelser ved å redusere fosterkalveserumet i dyrkningsmediet til 1% (v/v). Dette resulterte i vesentlig epoksid-dannelse. Resultatene er vist i Figur 8. Igjen ble de kortkjedede vitamin K epoksidene funnet å akkumulere, særlig i vaskulære glattmuskel MG63 celler. Vi tolket disse dataene som fordelaktig resirkulering av de langkjedede menaquinonene under betingelser med cellesulting. Alternativt kan disse dataene forklares som ingen anvendelse av de langkjedede menaquinonene. Dette ble utelukket i et eksperiment hvori VSMC og MG63 ble dyrket ved 1% FCS og med kun en enkel form av vitamin K tilstede (1 µmol/L). Ved anvendelse av konformasjonsspesifikke testkit for karboksylert osteokalcin (Takara, Japan) og karboksylert matriks Gla-protein (VitaK, Nederland) ble det funnet at i vaskulære glattmuskelceller ble MGP karboksylering stimulert med

vitamin K_1, MK-4 og MK-7 for å nå følgende MGP nivåer i dyrkningsmediet etter 24 timer inkubering:

- Karboksylert matriks Gla-protein under nærvær av K1 : 12,4 ng/mL, MK-4: 10,7 ng/mL, MK-7: 13,5 ng/mL.
- Karboksylert osteokalcin under nærvær av K1 : 3,2 ng/mL, MK-4: 4,1 ng/mL, MK-7: 3,9 ng/mL.

Disse dataene demonstrerer at langkjedede menaquinoner så vel som K_1 og MK-4 er aktive kofaktorer for den vitamin K avhengige karboksylasen, og at fravær av epoksider må være resultatet av foretrukket resirkulering.

P a t e n t k r a v

1.
Farmasøytisk eller nutrasøytisk produkt for oral administrering som omfatter minst en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser bestående av MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, i kombinasjon med minst en av en polyumettet fettsyre, enten renset eller i form av en marin olje, hvori nevnte produkt er en tablettformulering eller en kapselformulering.

2.
Farmasøytisk eller nutrasøytisk produkt, som omfatter minst en forbindelse innenfor vitamin K_2 klassen av forbindelser som er valgt fra MK-7, MK-8, MK-9 og MK-10, for forebygging eller terapi av minst en av kardiovaskulær-, ben- og bruskrelaterte sykdommer eller forstyrrelser hos mennesker og dyr, og ytterligere omfatter minst en av en polyumettet fettsyre, enten renset eller i form av en marin olje hvori vitamin K_2 forbindelsen administreres i en dosering i området fra 5-50 μg per dag.

3.
Produktet ifølge krav 1 for profylakse eller terapeutisk behandling av minst en av aterosklerose, arteriosklerose, osteoporose, osteoartritt eller en inflammatorisk eller degenerativ sykdom omfattende brusk.

4.
Produkt ifølge krav 1, hvori nevnte polyumettede fettsyre er i form av fiskeolje eller krillolje eller hvori nevnte polyumettede fettsyre er en n-3 polyumettet fettsyre, foretrukket EPA eller DHA eller en blanding derav, eller hvor nevnte fettsyre er en kombinasjon av EPA og DHA i form av deres triglycerider eller etylestere.

5.
Produkt for anvendelse ifølge krav 2, hvori nevnte polyumettede fettsyre er i form av fiskeolje eller krillolje eller hvori nevnte polyumettede fettsyre er en n-3 polyumettet fettsyre, foretrukket EPA eller DHA eller en blanding derav, eller hvor nevnte fettsyre er en kombinasjon av EPA og DHA i form av deres triglycerider eller etylestere.

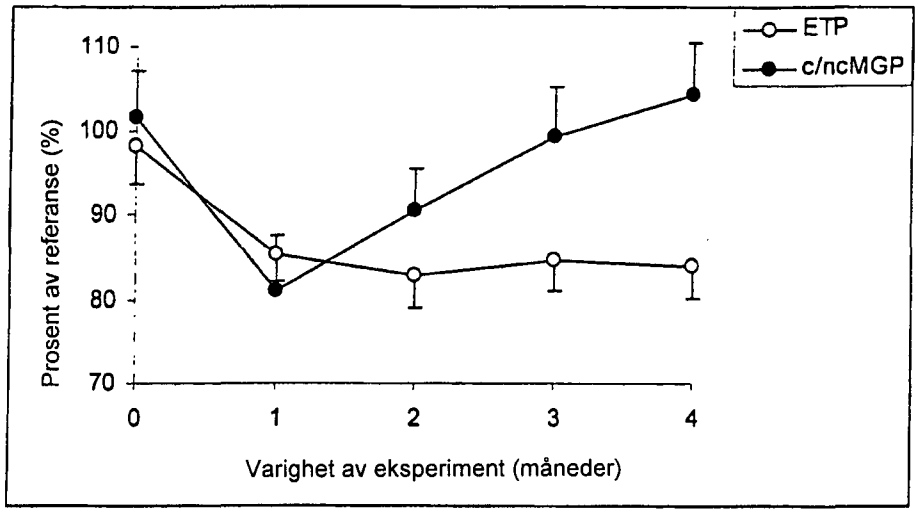

ETP
c/ncMGP
110
100
90
80
70
Prosent av referanse (%)
0
1
2
3
4
Varighet av eksperiment (måneder)

Fig. 1

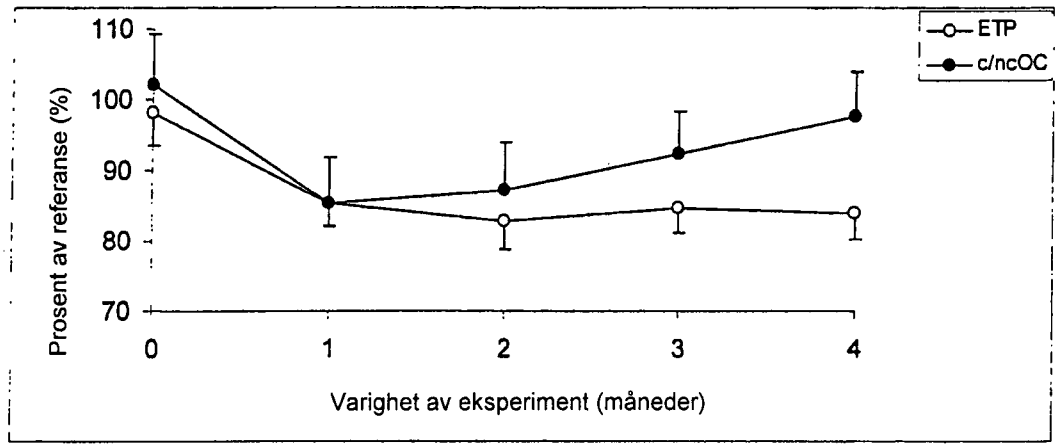

110
100
90
80
70
Prosent av referanse (%)
0
1
2
3
4
Varighet av eksperiment (måneder)
ETP
c/ncOC

Fig. 2

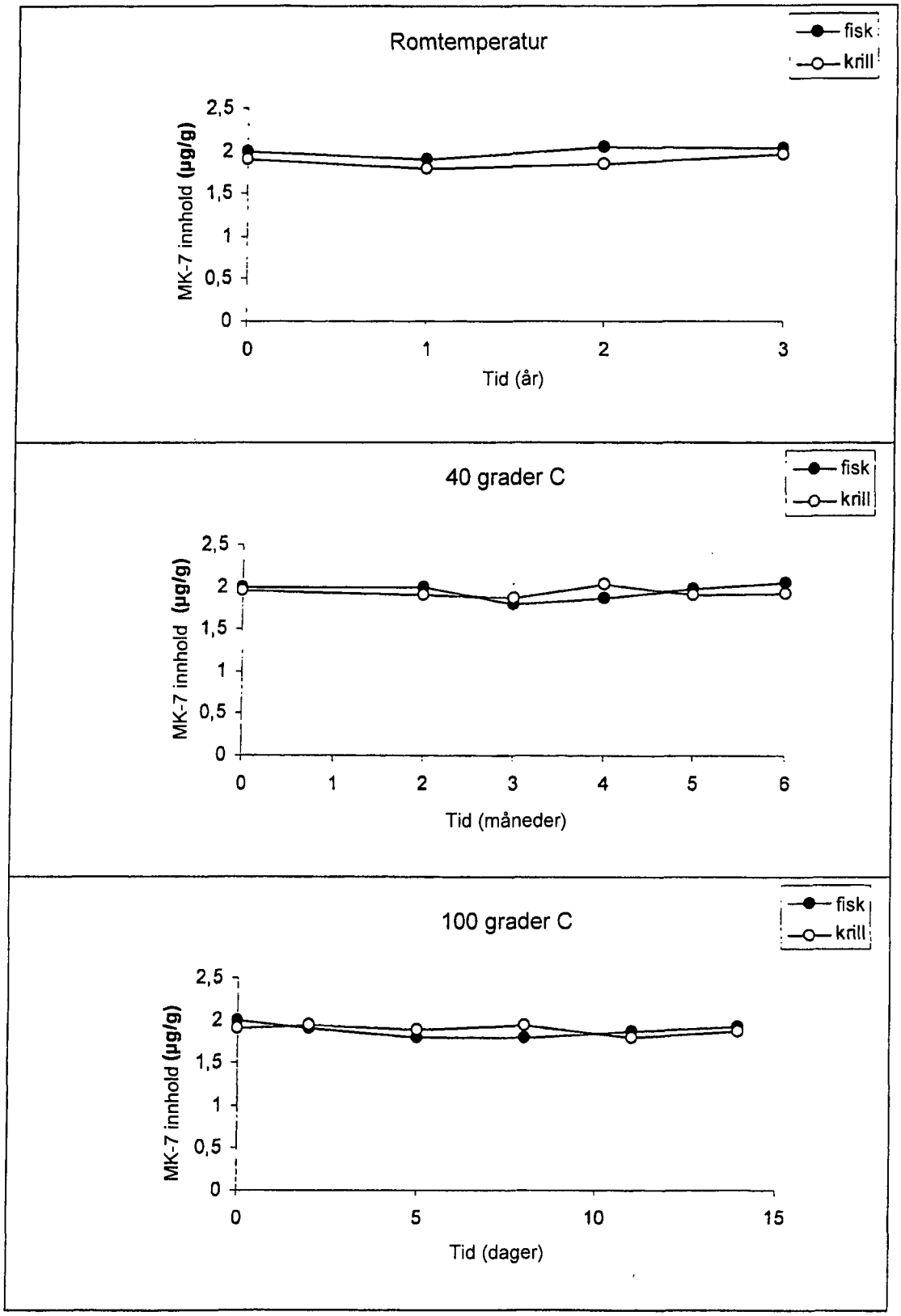

Romtemperatur
fisk
krill
MK-7 innhold (µg/g)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
1
2
3
Tid (år)
40 grader C
fisk
krill
MK-7 innhold (µg/g)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
1
2
3
4
5
6
Tid (måneder)
100 grader C
fisk
krill
MK-7 innhold (µg/g)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
5
10
15
Tid (dager)

Fig. 3

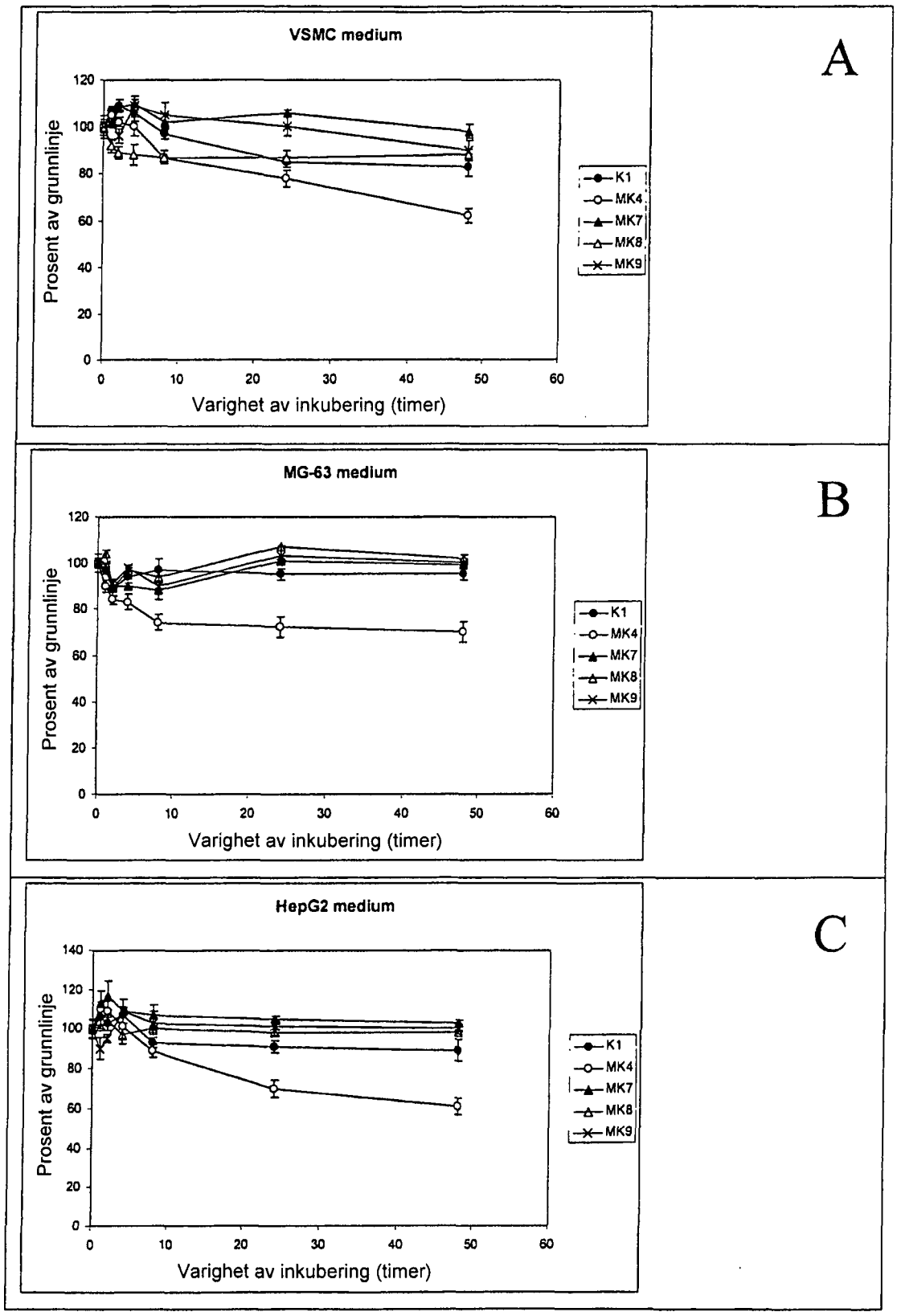
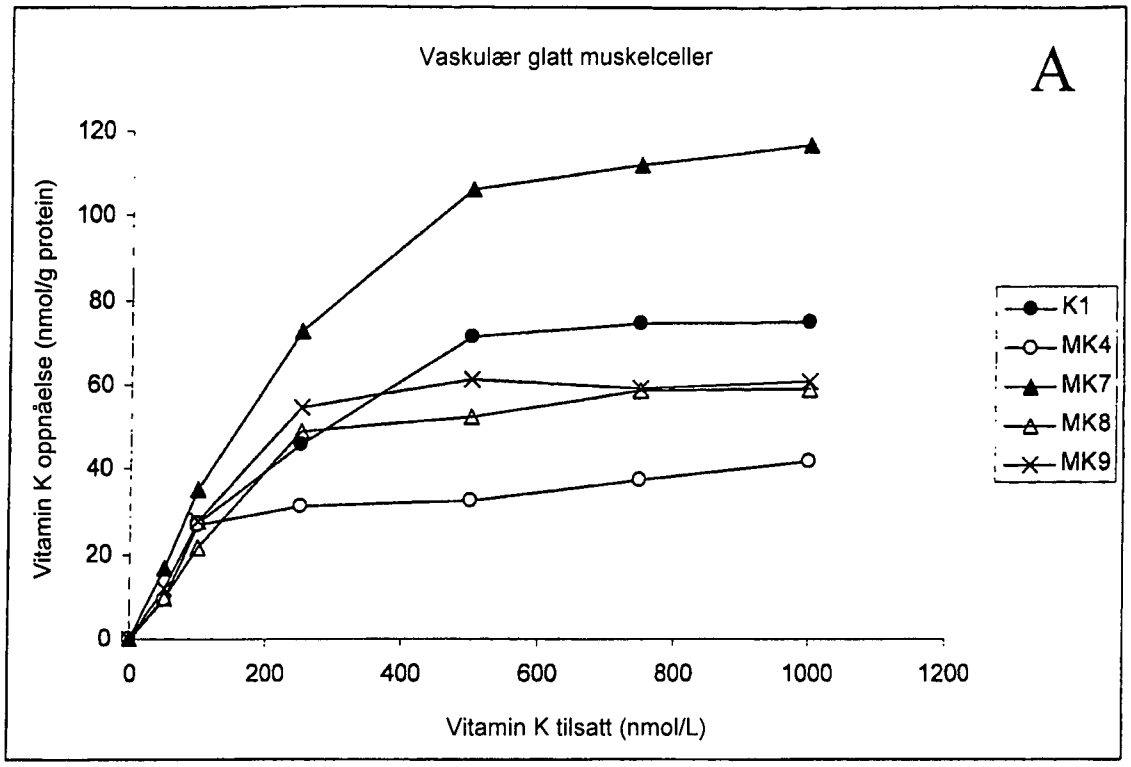

A
VSMC medium
Prosent av grunnlinje
Varighet av inkubering (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9
B
MG-63 medium
Prosent av grunnlinje
Varighet av inkubering (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9
C
HepG2 medium
Prosent av grunnlinje
Varighet av inkubering (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9

Fig. 4


Vaskulær glatt muskelceller
A
Vitamin K oppnåelse (nmol/g protein)
120
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1000
1200
Vitamin K tilsatt (nmol/L)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9

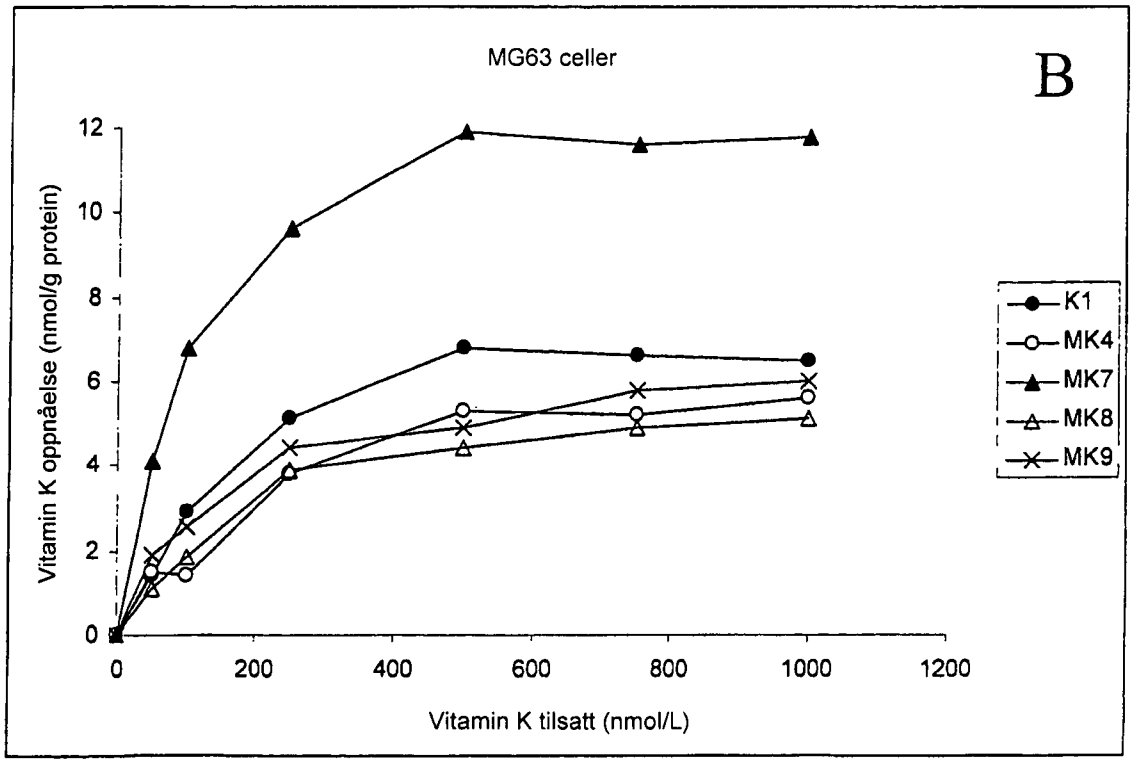
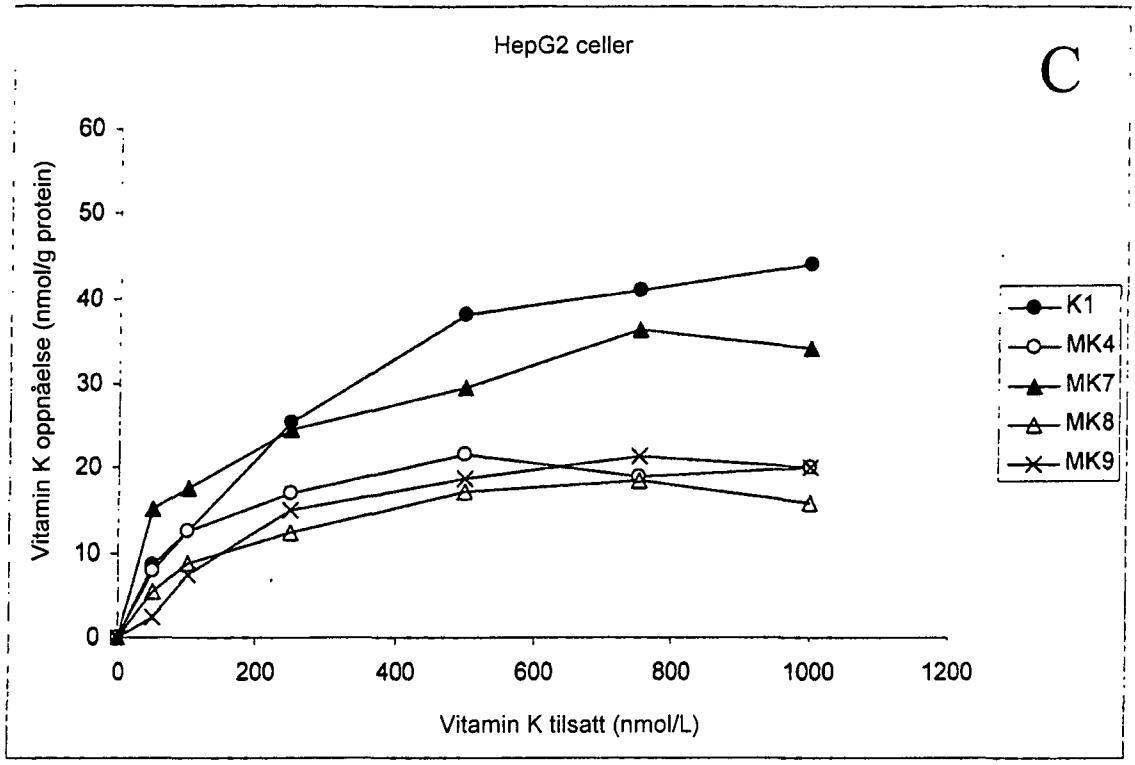

MG63 celler
B
Vitamin K oppnåelse (nmol/g protein)
12
10
8
6
4
2
0
0
200
400
600
800
1000
1200
Vitamin K tilsatt (nmol/L)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9

Fig. 5



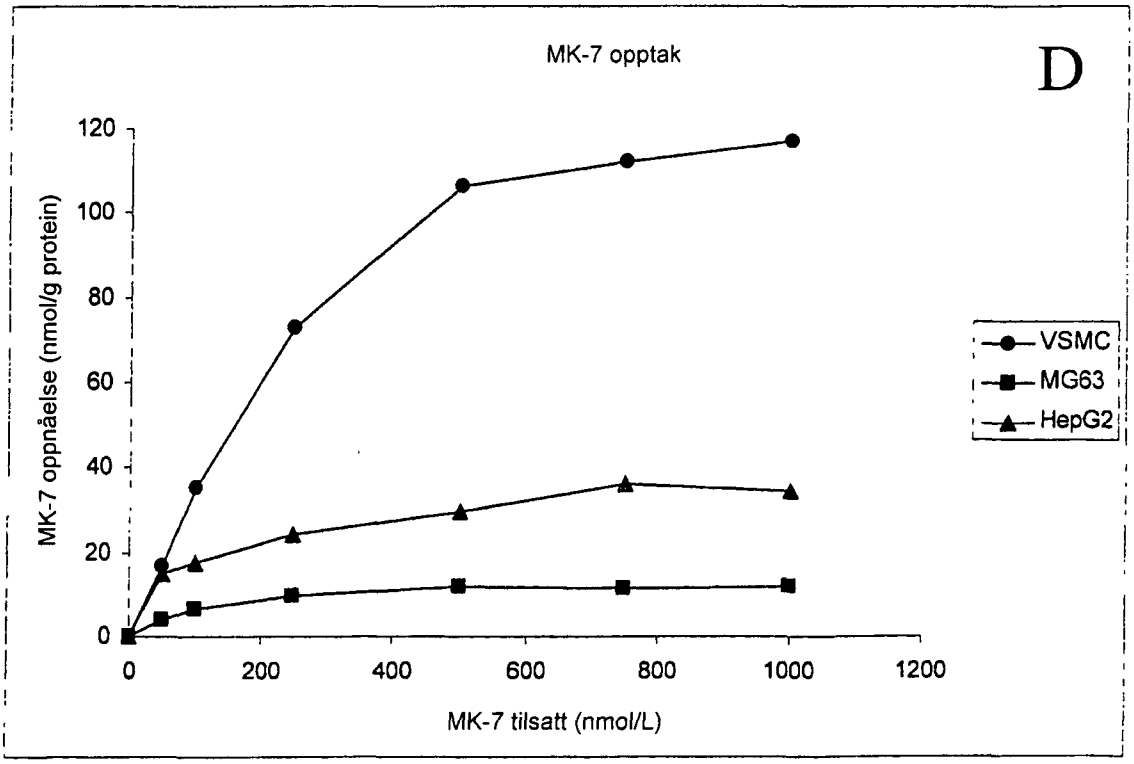


Fig. 5 (fortsetter)

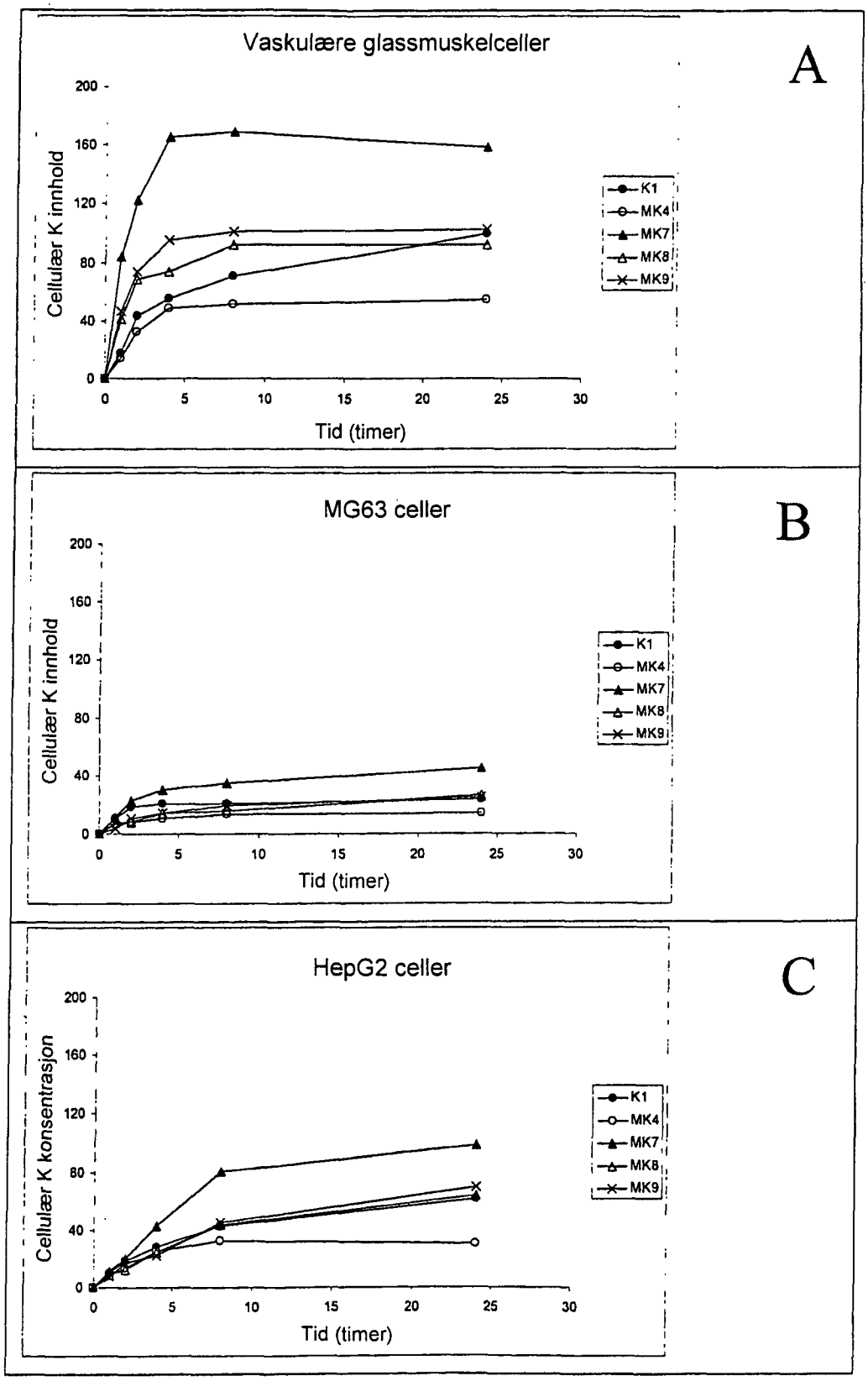

A
Vaskulære glassmuskelceller
Cellulær K innhold
Tid (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9
B
MG63 celler
Cellulær K innhold
Tid (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9
C
HepG2 celler
Cellulær K konsentrasjon
Tid (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9

Fig. 6

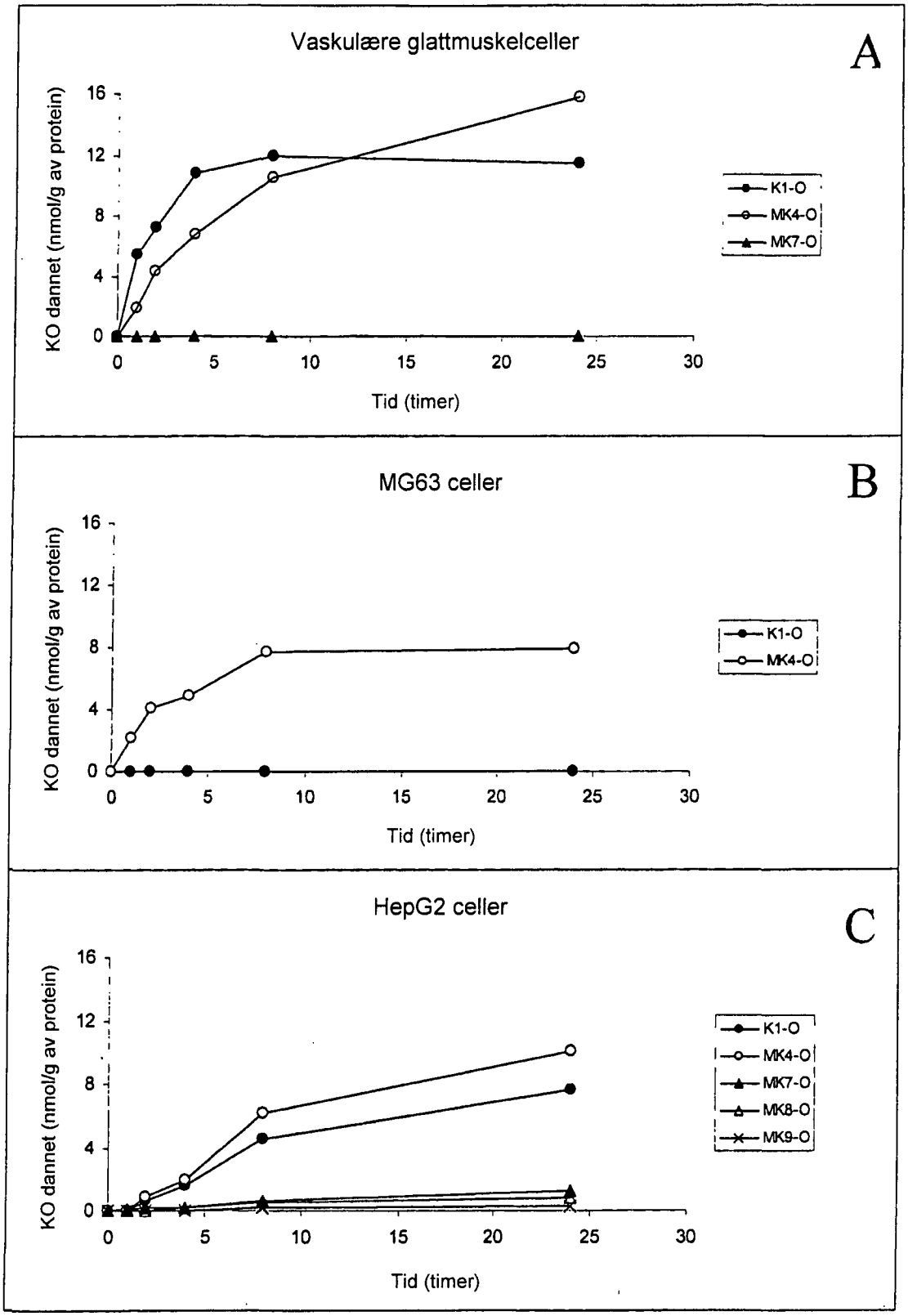

Vaskulære glattmuskelceller
A
KO dannet (nmol/g av protein)
16
12
8
4
0
0
5
10
15
20
25
30
Tid (timer)
K1-O
MK4-O
MK7-O
MG63 celler
B
KO dannet (nmol/g av protein)
16
12
8
4
0
0
5
10
15
20
25
30
Tid (timer)
K1-O
MK4-O
HepG2 celler
C
KO dannet (nmol/g av protein)
16
12
8
4
0
0
5
10
15
20
25
30
Tid (timer)
K1-O
MK4-O
MK7-O
MK8-O
MK9-O

Fig. 7

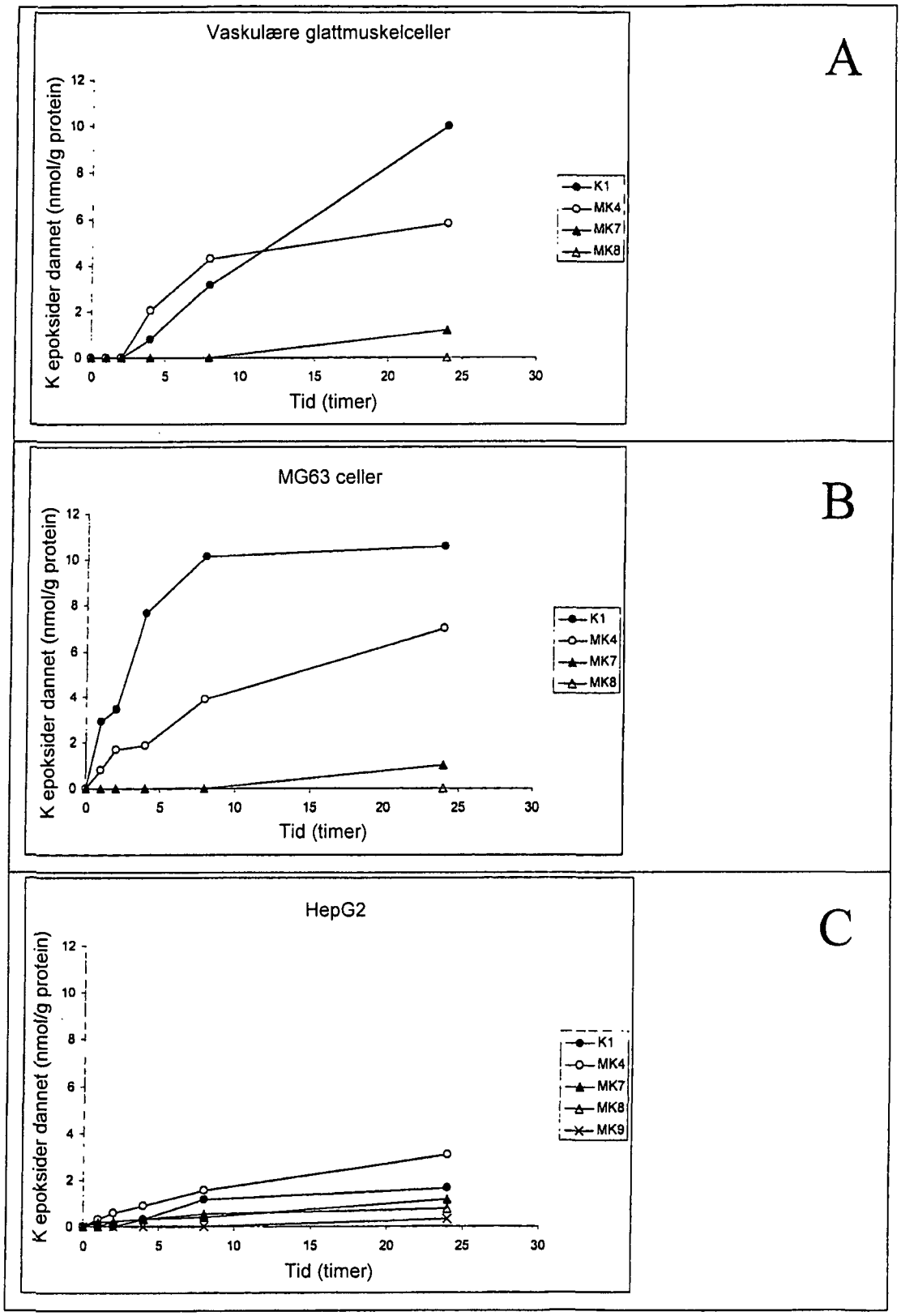

A
Vaskulære glattmuskelceller
K epoksider dannet (nmol/g protein)
Tid (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
B
MG63 celler
K epoksider dannet (nmol/g protein)
Tid (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
C
HepG2
K epoksider dannet (nmol/g protein)
Tid (timer)
K1
MK4
MK7
MK8
MK9

Fig. 8