

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 346**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01) **A61P 9/10** (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/4418 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2020** **PCT/IB2020/057063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2021** **WO21019421**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2020** **E 20747478 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2023** **EP 4003317**

54 Título: **Ascorbato en la prevención de la calcificación vascular inducida por estatinas**

30 Prioridad:

29.07.2019 US 201916524383
07.08.2019 EP 19190436
05.09.2019 US 201916562313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2024

73 Titular/es:

RATH, MATTHIAS (100.0%)
2320 French Alps Avenue
Henderson NV 89044, US

72 Inventor/es:

IVANOV, VADIM;
NIEDZWIECKI, ALEKSANDRA y
RATH, MATTHIAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 965 346 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ascorbato en la prevención de la calcificación vascular inducida por estatinas

La presente invención se refiere a una mezcla que comprende ácido L-ascórbico o ascorbato para uso en prevenir o mitigar la calcificación vascular inducida por estatinas.

- 5 Las estatinas también se conocen como inhibidores de la HMG-CoA reductasa y son una clase de compuestos hipolipemiantes.

10 Los vehículos lipoproteínas de baja densidad (LDL) del colesterol desempeñan un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis y la enfermedad coronaria a través de los mecanismos descritos por la hipótesis de los lípidos. Las estatinas son eficaces para reducir el colesterol LDL y, por lo tanto, se utilizan ampliamente para la prevención primaria en personas con un alto riesgo de enfermedad cardiovascular, así como en la prevención secundaria para quienes han desarrollado una enfermedad cardiovascular.

Tras el tratamiento con estatinas, los pacientes presentan efectos secundarios que incluyen dolor muscular, mayor riesgo de diabetes mellitus y niveles anormales de enzimas hepáticas en sangre.

- 15 En algunos pacientes, por ejemplo, la lovastatina produce miopatía y aumentos asintomáticos, pero marcados y persistentes, de las transaminasas hepáticas. El aumento de las transaminasas producido por la lovastatina y otros inhibidores de la HMG-CoA reductasa es una consecuencia directa de la inhibición de la síntesis de mevalonato. Para contrarrestar el aumento de los niveles de transaminasas observado en un pequeño número de pacientes, el documento US 4.929.437 describe la administración conjunta de una cantidad eficaz de inhibidor de la HMG-CoA reductasa y una cantidad eficaz de coenzima Q₁₀ para contrarrestar el daño hepático asociado al inhibidor de la HMG-CoA reductasa.

Además, se sabe que las estatinas aumentan las calcificaciones vasculares, que son un factor de riesgo reconocido para las enfermedades cardíacas (Ikegami Y, Inoue I, Inoue K, Shinoda Y3, Iida S1, Goto S4, Nakano T5, Shimada A1, Noda M1. The annual rate of coronary artery calcification with combination therapy with a PCSK9 inhibitor and a statin is lower than that with statin monotherapy. NPJ Aging Mech Dis 2018; 4:7).

- 25 En el análisis reciente de 8 ensayos aleatorios prospectivos que utilizaban una ecografía intravascular coronaria en serie, Puri et al. (Puri R, Nicholls SJ, Shao M, Kataoka Y, Uno K, Kapadia SR, Tuzcu EM, Nissen SE. Impact of statins on serial coronary calcification during atheroma progression and regression. J Am Coll Cardiol 2015; 65:1273-1282) concluían que, independientemente de sus efectos regresivos sobre la placa, las estatinas favorecen la calcificación del ateroma coronario.

- 30 Aún existe una controversia entre la calcificación arterial como un marcador bien establecido y un índice de pronóstico para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, los efectos estimulantes de las estatinas sobre la calcificación arterial y los efectos beneficiosos aparentes de una complementación con estatinas sobre los eventos clínicos en pacientes con ECV. Algunos investigadores están proporcionando una explicación de esas evidencias contradictorias que tiende a ser plausible, como que se trata de un mecanismo "especial" de calcificación arterial bajo tratamientos con estatinas que da lugar a una mayor estabilidad de la lesión definida como menos fibroateromas de capa fina VH y rupturas de placa y más fibroateromas de capa gruesa calcificados (Kadohira T1, Mintz GS, Souza CF, Witzensbichler B, Metzger DC, Rinaldi MJ, Mazzaferri EL Jr, Duffy PL, Weisz G, Stuckey TD, Brodie BR, Crowley A, Kirtane AJ, Stone GW, Maehara A. Impact of chronic statin therapy on clinical presentation and underlying lesion morphology in patients undergoing percutaneous intervention: an ADAPT-DES IVUS substudy. Coron Artery Dis 2017; 28:218-224).

- 40 La calcificación vascular es un proceso fisiopatológico relevante que se asocia con la aterosclerosis coronaria, y es un marcador de un pronóstico de morbilidad y mortalidad cardiovascular.

- 45 Las células del músculo liso vascular (SMC, por sus siglas en inglés) tienen una extraordinaria capacidad para sufrir una diferenciación fenotípica osteoblástica. La calcificación de la capa de células vasculares íntima y/o medial conduce a una diferenciación de osteoblastos, ya sea a partir de una célula del músculo liso, una célula mesenquimal o un pericito vascular, caracterizada, entre otras cosas, por un aumento de la actividad fosfatasa alcalina, la producción de osteocalcina y la secreción de matriz ósea. Se han elaborado mecanismos bioquímicos asociados con la conversión de SMC en células osteoblásticas, sin embargo, los mecanismos decisivos de qué es lo que desencadena y/o regula ese proceso siguen siendo en gran medida difíciles de estudiar.

- 50 Estudios recientes han mostrado que la calcificación de la placa es un proceso dinámico y relacionado con el grado de inflamación vascular. Diversos factores inflamatorios producidos durante las diferentes fases de la aterosclerosis pueden inducir la expresión y la activación de células osteoblásticas ubicadas dentro de la pared arterial, que, a su vez, promueven el depósito de calcio.

- 55 Se ha demostrado que la presencia de proteínas reguladoras junto con células dediferenciadas similares a osteoblastos se originan a partir de células del músculo liso vascular (VSMCs, por sus siglas en inglés) que se designaron células vasculares calcificantes. Esas células están implicadas en la síntesis/reabsorción del hueso en las

placas ateroscleróticas, especialmente alrededor de la calcificación. Por tanto, se ha propuesto que la función de las células óseas en la pared vascular, en algunos aspectos, es similar a la que tienen en los huesos. Sin embargo, estudios *in vitro* han proporcionado una evidencia de que la regulación de la síntesis ósea en la pared vascular y en el esqueleto son diferentes. Cuando se estimulaban mediante estrés oxidativo o con LDL oxidada, los osteoblastos del esqueleto y las CVCs (una población de células vasculares con características osteoblásticas) mostraban una respuesta opuesta, una disminución y un aumento de la formación ósea, respectivamente.

El documento US 2004/0023919 A1 describe una composición que mejora los lípidos en sangre. La composición farmacéutica combina atorvastatina y un derivado del ácido ascórbico que puede ser ascorbato de sodio, ascorbato de calcio o ácido ascórbico. Los efectos de una coadministración de atorvastatina y ácido ascórbico se muestran en la Tabla 8. Los niveles de FFA en sangre se reducían cuando se administraba atorvastatina y ácido ascórbico; véase la última entrada. Las composiciones que contienen atorvastatina y ácido ascórbico se muestran en las Tablas 1 a 4. En el párrafo [0008] se afirma que la coadministración de atorvastatina con una determinada vitamina (ácido ascórbico) reduce los niveles de colesterol total en la sangre.

El documento US 2004/0014712 A1 describe la combinación de simvastatina y ácido ascórbico. Los niveles de peróxido de los lípidos en sangre, los niveles de FFA en sangre y los niveles de CPK se reducían mediante la combinación de simvastatina y ácido ascórbico. Las composiciones farmacéuticas correspondientes se indican en las Tablas 1 a 4. En el párrafo [0006] se afirma que los niveles de lípidos en sangre mejoran con esa combinación.

El documento US 2004/0009986 A1 describe una combinación de pravastatina y derivados del ácido ascórbico. Se afirma que los niveles de triglicéridos en sangre podían reducirse mediante una combinación de pravastatina con ácido ascórbico (y además tocoferol o tocoferol y butirato de riboflavina). En el párrafo [0007] se afirma que la composición del fármaco reduce los niveles de triglicéridos en la sangre.

El documento WO 03/072013 A2 describe una combinación de una estatina con ácido ascórbico para el tratamiento de la psoriasis.

Y. Arad et al., Journal of the American College of Cardiology, vol. 46, núm. 1, 2005, 166-172, afirma en la conclusión de la primera página que el tratamiento con alfa-tocoferol, vitamina C y dosis bajas de atorvastatina no influía en la progresión de una calcificación coronaria.

A. Trion et al., Molecular and Cellular Biochemistry, vol. 308, núm. 1-2, 2007, 25-33, describe en el resumen los efectos de los antagonistas del calcio y las estatinas sobre la calcificación de las VSMCs *in vitro*. Sin embargo, el medio de crecimiento contenía niveles bajos de ácido ascórbico de 50 µg/ml. Se afirma que la combinación de tratamientos estimulaba la calcificación en un grado similar al observado con la atorvastatina sola.

N. Skafi et al., Journal of Cellular Physiology, vol. 234, núm. 4, 2018, 4825-4839, describe en la página 4827 en la sección 2.2 que para estimular la calcificación, las células se cultivaron con 50 µg/ml de ácido ascórbico y GP.

El objetivo subyacente de la presente invención es tratar o prevenir la calcificación vascular inducida en pacientes por la administración de estatinas.

El objetivo se consigue según la presente invención mediante una o varias de las siguientes realizaciones.

Primer conjunto de realizaciones:

1. Una mezcla de composición que comprende ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína para uso en el tratamiento o la prevención de la calcificación vascular inducida en pacientes por la administración de estatinas.

2. La mezcla de composición según la realización 1 para uso en el tratamiento de pacientes que reciben tratamiento con estatinas de forma concomitante.

3. La mezcla de composición para uso según la realización 1 o 2, en donde la mezcla de composición contiene las siguientes cantidades:

ácido L-ascórbico o ascorbato: 300 mg a 1000,2 mg,

vitamina E: 27,5 mg a 82,5 mg,

vitamina B1: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B2: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B3: 115 mg a 350,1 mg,

vitamina B5: 16,7 mg a 50,1 mg,

vitamina B6: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B12: 10 µg a 30 µg,

ácido fólico: 133,3 µg a 399,9 µg,

biotina: 33,3 µg a 99,9 µg,

L-carnitina: 33,3 mg a 99,9 mg,

5 betaína: 23,3 mg a 69,9 mg.

4. La mezcla de composición para uso según una de las realizaciones 1 a 3, en la que el ascorbato se selecciona entre ascorbatos solubles en agua o solubles en lípidos o mezclas de los mismos, preferiblemente entre ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de sodio, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo o mezclas de los mismos.

10 5. Una composición farmacéutica que contiene al menos una estatina y ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína en una forma de dosificación que permite la administración concomitante a un paciente de al menos una estatina y ácido L-ascórbico o ascorbato y vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína.

15 6. La composición farmacéutica según la realización 5, en la que al menos una estatina y ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína están presentes como una mezcla física o como composiciones farmacéuticas distintas, destinadas a una administración concomitante a un paciente.

20 7. La composición farmacéutica según la realización 5 o 6, para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

8. La composición farmacéutica para uso según la realización 7, en la que la enfermedad cardiovascular es enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cerebrovascular o enfermedad vascular periférica.

25 9. La composición farmacéutica según una de las realizaciones 5 a 8, en la que la estatina se selecciona a partir del grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina o mezclas de las mismas.

10. La composición farmacéutica según una de las realizaciones 5 a 9, en la que el ascorbato se selecciona entre ascorbatos solubles en agua o solubles en lípidos o mezclas de los mismos, preferiblemente entre ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de sodio, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo o mezclas de los mismos.

30 11. La composición farmacéutica según una de las realizaciones 5 a 10, que contiene adicionalmente coenzima Q10 en una forma de dosificación que permite la administración concomitante a un paciente de al menos una estatina, ácido L-ascórbico o ascorbato y coenzima Q10.

12. La composición farmacéutica según una de las realizaciones 5 a 11, que comprende una cantidad de dosificación diaria de ácido L-ascórbico o ascorbato de 10 mg a 100 g, y de al menos una estatina de 5 mg a 100 mg.

13. La composición farmacéutica según una de las realizaciones 5 a 12, que contiene las siguientes cantidades:

35 ácido L-ascórbico o ascorbato: 300 mg a 1000,2 mg,

vitamina E: 27,5 mg a 82,5 mg,

vitamina B1: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B2: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B3: 115 mg a 350,1 mg,

40 vitamina B5: 16,7 mg a 50,1 mg,

vitamina B6: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B12: 10 µg a 30 µg,

ácido fólico: 133,3 µg a 399,9 µg,

biotina: 33,3 µg a 99,9 µg,

45 L-carnitina: 33,3 mg a 99,9 mg,

betaína: 23,3 mg a 69,9 mg

en la composición farmacéutica.

14. La composición farmacéutica según la realización 13, que contiene además niacina, preferiblemente en una mezcla con la estatina.

- 5 15. Una mezcla 1 de composición que comprende o consiste en vitamina C, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína que contiene o consiste en las siguientes cantidades:

vitamina C: 300 mg a 1000,2 mg,

vitamina E: 27,5 mg a 82,5 mg,

- 10 vitamina B1: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B2: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B3: 115 mg a 350,1 mg,

vitamina B5: 16,7 mg a 50,1 mg,

vitamina B6: 3,3 mg a 9,9 mg,

- 15 vitamina B12: 10 µg a 30 µg,

ácido fólico: 133,3 µg a 399,9 µg,

biotina: 33,3 µg a 99,9 µg,

L-carnitina: 33,3 mg a 99,9 mg,

betaína: 23,3 mg a 69,9 mg

- 20 en la mezcla de composición.

16. La mezcla 1 de composición según la realización 15, en la que la vitamina C está en forma de ascorbato, en donde el ascorbato se selecciona preferentemente entre ascorbatos solubles en agua o solubles en lípidos, o mezclas de los mismos, más preferentemente en donde el ascorbato se selecciona entre ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de sodio, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo o mezclas de los mismos.

- 25 17. La mezcla 1 de composición según una de las realizaciones 15 o 16, que contiene adicionalmente una coenzima Q10.

Según la presente invención, se ha descubierto que una mezcla de composición que comprende ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína es eficaz para tratar o prevenir la calcificación vascular en un sistema humano, especialmente cuando se coadministra con estatinas.

- 30

La vitamina C es un nutriente esencial para ciertos animales, incluidos los seres humanos. Los ensayos clínicos han mostrado un efecto positivo significativo de la vitamina C sobre la función endotelial cuando se toma en dosis superiores a 500 mg por día. Se ha debatido sobre su posible influencia en el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares.

- 35 La vitamina C es un antioxidante muy poderoso y es esencial para la formación de colágeno y una matriz extracelular óptima (MEC). Puede prevenir el depósito de lipoproteínas y el desarrollo de aterosclerosis al proteger la integridad y la resistencia de la pared vascular.

Nuestros estudios previos han mostrado que el ascorbato puede inhibir la proliferación y migración excesiva de SMCs *in vitro* (Ivanov V, Ivanova S, Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Extracellular matrix-mediated control of aortic smooth muscle cell growth and migration by a combination of ascorbic acid, lysine, proline, and catechins. J Cardiovasc Pharmacol 2007; 50:541-547). Además, la vitamina C en la dieta es esencial para prevenir el depósito de lipoproteínas en la pared vascular y la aterosclerosis en ratones genéticamente modificados que imitan el metabolismo humano, con respecto a su incapacidad para producir vitamina C y expresar la lipoproteína humana (a) (Cha J, Niedzwiecki A, Rath M. Hypoascorbemia induces atherosclerosis and vascular deposition of lipoprotein(a) in transgenic mice. Am J Cardiovasc Dis 2015; 5:53-62). En un estudio clínico, una complementación diaria con micronutrientes, que incluyen aproximadamente 4 gramos de vitamina C, podía detener la progresión de las calcificaciones coronarias en pacientes diagnosticados con enfermedad arterial coronaria temprana (Rath M, Niedzwiecki A. (1996) Nutritional supplement program halts progression of early coronary atherosclerosis documented by ultrafast computed

- 40

- 45

tomography. J Appl Nutr 1996; 48:67-78).

Por tanto, es posible que la vitamina C desempeñe un papel decisivo en la regulación de la estructura y función celular y extracelular dentro de la pared vascular. Con una disponibilidad óptima de ascorbato, la integridad y la estabilidad de la pared vascular estaría garantizada, sobre todo, mediante una síntesis óptima de colágeno y otras moléculas de la MEC. En caso de una falta crónica de ascorbato o el inicio de escorbuto, puede surgir la necesidad de mecanismos compensatorios para añadir una estabilidad compensatoria a una pared vascular estructuralmente deteriorada, incluso mediante calcificación.

Investigamos los efectos de la vitamina C sobre las SMCs vasculares, los fibroblastos dérmicos humanos (DFs, por sus siglas en inglés), así como los osteoblastos fetales humanos (FOB, por sus siglas en inglés) inmortalizados y el potencial de esas células para contribuir a una calcificación vascular. Además, evaluamos el papel de las estatinas en relación con ese proceso regulatorio, de cara al hecho de que actualmente millones de pacientes toman esos medicamentos con la expectativa de frenar la calcificación vascular. De este modo llegamos a la invención tal y como se describe en el presente documento.

Según la presente invención se emplea vitamina C, también conocida como ácido ascórbico o ácido L-ascórbico. Como alternativa, se puede emplear ascorbato, en donde el ascorbato, una sal de ácido ascórbico con bases o ácidos más fuertes que el ácido ascórbico, se selecciona preferiblemente entre ascorbatos solubles en agua o solubles en lípidos o mezclas de los mismos y se selecciona más preferiblemente a partir del grupo que consiste en ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de sodio, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo o mezclas de los mismos.

La mezcla 1 de composición que contiene o consiste en las vitaminas C, E, B1, B2, B3, B5, B6, B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína se administra (preferiblemente) a pacientes que se están tratando con estatinas.

En el contexto de la presente invención, las estatinas también pueden describirse como inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Por tanto, las estatinas inhiben la enzima HMG-CoA reductasa, necesaria para producir colesterol. Por lo tanto, las estatinas se relacionan con una clase de medicamentos hipolipemiantes que reducen la enfermedad y la mortalidad en quienes tienen un alto riesgo de enfermedad cardiovascular. En el contexto de la presente invención se pueden emplear todas las estatinas adecuadas. Preferiblemente, la estatina se selecciona a partir del grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina o mezclas de las mismas, o cualquier otro tipo o forma de estatina, o una combinación de estatina con niacina.

Según un aspecto de la invención, la mezcla 1 de composición se puede administrar junto con uno o más micronutrientes adicionales además del ácido L-ascórbico o ascorbato. Por ejemplo, para este fin se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende la mezcla 1 de composición y uno o más micronutrientes adicionales.

Preferiblemente, el uno o más micronutrientes adicionales se administran junto con la mezcla 1 de composición y con estatina. El uno o más micronutrientes se seleccionan preferentemente entre minerales traza, vitaminas diferentes de la mezcla de composición que comprende ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína, y mezclas de los mismos. Los seres humanos solo requieren minerales traza en pequeñas cantidades (trazas).

Los minerales traza se seleccionan preferentemente entre boro, cobalto (preferiblemente como componente de la vitamina B12), cromo, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, zinc y mezclas de los mismos.

Las vitaminas diferentes de la vitamina C se seleccionan preferentemente a partir del complejo vitamínico B, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B5 (ácido pantoténico), grupo de vitaminas B6 que incluye piridoxina, piridoxal-5-fosfato y piridoxamina, vitamina B7 (biotina), vitamina B9 (folato o ácido fólico), vitamina B12 (cobalamina), comprendidas en la mezcla de composición, colina, vitamina A (por ejemplo, retinol o carotenoides de provitamina A), vitamina D que incluye ergocalciferol y colecalciferol, vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), vitamina K que incluye la vitamina K1 (filoquinona) y vitamina K2 (menaquinona), carotenoides que incluyen alfa caroteno, beta caroteno, criptoxantina, luteína, licopeno y zeaxantina. Los micronutrientes comprendidos en la mezcla de composición incluyen ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína.

Los aminoácidos y sus derivados incluyen betaína y L-carnitina. Otros micronutrientes son las vitaminas B6 y B12, ácido fólico y betaína. Una combinación preferida de micronutrientes está contenida en la mezcla 1 de composición como se describe a continuación.

Cuando un paciente recibe un tratamiento con estatinas, la cantidad de dosificación diaria puede ser desde la dosis más baja hasta la más alta disponible comercialmente o aplicable clínicamente. La cantidad de dosificación está preferentemente en el intervalo de 5 a 100 mg, preferentemente de 10 a 80 mg, más preferentemente de 10 a 40 mg, lo más preferentemente de 10 a 20 mg.

La cantidad de ácido L-ascórbico o ascorbato administrada a un paciente que recibe un tratamiento con estatinas es

preferiblemente de 10 mg a 100 g, más preferiblemente de 100 mg a 10 g, lo más preferiblemente de 200 mg a 5 g de dosificación diaria.

5 Es posible administrar la mezcla 1 de composición como se describe a continuación, simultáneamente con la estatina, por ejemplo, en un comprimido que contiene tanto la mezcla 1 de composición como se describe a continuación como la estatina. Además, es posible administrar la mezcla 1 de composición como se describe a continuación y la estatina en composiciones farmacéuticas distintas, pero de forma concomitante. El término "concomitantemente" significa que la administración de ambos ingredientes activos tiene lugar dentro de un intervalo de tiempo de 0 a 5 horas, preferiblemente de 0 a 3 horas, más preferiblemente de 0 a 1 hora, basándose en una administración al día.

10 Dado que tanto las estatinas como el ácido L-ascórbico o ascorbato (así como micronutrientes distintos/adicionales diferentes de la vitamina C) están bien establecidos para una administración individual y separada a pacientes que lo necesitan, las composiciones farmacéuticas o nutricionales conocidas o la mezcla 1 como se describe a continuación, se pueden emplear según la presente invención, asegurando al mismo tiempo el uso concomitante de ambos ingredientes activos, la mezcla 1 y la estatina.

15 Una composición de micronutrientes que contiene ascorbato y que puede emplearse ventajosamente en combinación con estatinas es la mezcla 1. La mezcla 1 contiene vitaminas, L-carnitina y betaína, y específicamente contiene o consiste en las vitaminas C, E, B1, B2, B3, B5, B6, B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína, y puede utilizarse como complemento nutricional diario. Normalmente, se toman tres comprimidos al día (un comprimido tres veces al día durante las comidas con abundante líquido (agua, zumo, té)).

La mezcla 1 de composición contiene cada nutriente en el intervalo para uno a tres comprimidos como sigue:

20 Vitamina C (ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio): 300 mg a 1000,2 mg,
 Vitamina E: 27,5 mg a 82,5 mg,
 Vitamina B1: 3,3 mg a 9,9 mg,
 Vitamina B2: 3,3 mg a 9,9 mg,
 Vitamina B3: 115 mg a 350,1 mg,
 25 Vitamina B5: 16,7 mg a 50,1 mg,
 Vitamina B6: 3,3 mg a 9,9 mg,
 Vitamina B12: 10 µg a 30 µg,
 Ácido fólico: 133,3 µg a 399,9 µg,
 Biotina: 33,3 µg a 99,9 µg,
 30 L-carnitina: 33,3 mg a 99,9 mg,
 Betaína: 23,3 mg a 69,9 mg.

La mezcla 1 de composición contiene micronutrientes seleccionados en una combinación sinérgica. Esta fórmula reconstructiva se puede combinar con otras fórmulas básicas, p. ej., Vitacor Plus™.

35 Complementa el espectro de vitaminas específicas y otros micronutrientes con factores importantes para ayudar al metabolismo normal de la homocisteína y el colesterol. Un comprimido contiene normalmente los siguientes ingredientes: vitamina C, agente de relleno de celulosa, vitamina B3, tartrato de L-carnitina al 5,26%, agente de liberación de ácido esteárico, clorhidrato de betaína al 3,24%, vitamina E, vitamina B5, croscarmelosa de sodio, agente de recubrimiento de carbonato de calcio, maltodextrina, agente de liberación de dióxido de silicio, agente de recubrimiento de goma laca, vitamina B1, vitamina B6, biotina, colorante de riboflavina (vitamina B2), extracto de aceite de coco, ácido fólico, vitamina B2, aceite de limón, vitamina B12, sabor natural de limón.

40 Las vitaminas B6 y B12, el ácido fólico y la betaína son factores importantes para favorecer el metabolismo normal de la homocisteína. Por lo tanto, un suministro óptimo de esos micronutrientes es esencial para mantener niveles normales de homocisteína.

45 Los ingredientes de la mezcla 1 de composición favorecen el metabolismo celular de muchas formas simultáneamente, por ejemplo:

- a) con betaína, vitamina B6, vitamina B12 y ácido fólico para favorecer el metabolismo normal de la homocisteína;
- b) con biotina y vitaminas del grupo B como contribución para favorecer el metabolismo energético normal;

c) con vitamina C y vitamina E como contribución a la protección de las células frente al estrés oxidativo.

La dosis diaria recomendada puede ser la indicada anteriormente, o puede ser del 10 al 300%, preferiblemente del 20 al 200%, más preferiblemente del 50 al 150% de la misma. El ascorbato empleado se obtiene preferentemente a partir de cantidades idénticas de ascorbato de calcio y ascorbato de magnesio.

- 5 Si es necesario, la mezcla 1 de composición y/o la estatina se pueden combinar con coenzima Q₁₀ en una composición farmacéutica combinada o en composiciones farmacéuticas separadas, tal y como se describe en el documento US 4.929.437.

Según la presente invención, la mezcla 1 de composición se utiliza para tratar o prevenir la calcificación vascular, específicamente la calcificación vascular inducida en pacientes por la administración de estatinas.

- 10 El término "tratar" en este contexto significa "mitigar" o "revertir".

Las expresiones "mezcla 1", "mezcla 1 de composición farmacéutica", "mezcla 1 de composición (farmacéutica)" o "composición farmacéutica" se utilizan en toda la solicitud para representar la mezcla 1.

- 15 Específicamente, se evitará o mitigará la calcificación de las células del músculo liso vascular (SMCs), más específicamente de las células del músculo liso aórtico humano (AoSMC). La presente invención se basa específicamente en el efecto positivo de la vitamina C sobre las SMCs vasculares, los fibroblastos dérmicos humanos (DFs) así como los osteoblastos fetales humanos inmortalizados (FOBs). El proceso de calcificación vascular requiere una transformación fenotípica de las células del músculo liso vascular (VSMCs) en células osteogénicas.

- 20 Una administración concomitante de al menos una estatina y una mezcla 1 de composición a un paciente es útil para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular, por ejemplo, una enfermedad de las arterias coronarias, una enfermedad cerebrovascular o una enfermedad vascular periférica.

Al aplicar la presente invención, se puede mitigar, revertir o prevenir el aumento de la calcificación observada en caso de tratamientos con estatinas a largo plazo. Por lo tanto, no existe la necesidad de una interpretación hipotética de que la calcificación inducida por estatinas pueda ser beneficiosa o que pueda haber una microcalcificación beneficiosa, en contraposición con una microcalcificación perjudicial.

- 25 **Materiales y métodos**

Reactivos

- 30 El complemento nutricional de la mezcla 1 se disolvió de acuerdo con el procedimiento estándar de la Farmacopea de EE. UU. (USP 2040 *Disintegration and Dissolution of Dietary Supplements*) de la siguiente manera: se trituraron tres dosis diarias recomendadas (nueve comprimidos) y se suspendieron en 900 ml de HCl 0,1 N. Después de una hora de incubación en una incubadora con baño de agua a 37°C en un agitador orbital a 75 rpm, la suspensión del complemento se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 µm y se congelaron partes alícuotas de 1 ml y se almacenaron a 20°C hasta su uso. La solución de la mezcla 1 resultante contenía ácido ascórbico 19 mM según las especificaciones del fabricante.

Todos los reactivos eran de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) excepto cuando se indique lo contrario.

- 35 **Cultivos celulares**

- 40 El ATCC (Manassas, VA, EE. UU.) suministró fibroblastos dérmicos humanos normales (DFs) y osteoblastos fetales humanos inmortalizados (hFOBs). Se adquirieron células de músculo liso aórtico humano (AoSMCs) en Cambrix (East Rutherford, NJ) y se utilizaron en experimentos con 5-7 pases. Los cultivos celulares se mantuvieron en medio DMEM (ATCC) que contenía antibióticos y suero bovino fetal al 5% (FBS, ATCC). En algunos experimentos, las células se incubaron en medio pro-osteogénico, definido como FBS/DMEM al 5% fortificado con beta-glicerofosfato 5 mM con o sin forskolina 25 µM. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C y atmósfera con CO₂ al 5%. La viabilidad celular se controló con un ensayo MTT.

Ensayo de la actividad fosfatasa alcalina en AoSMCs

- 45 Se sembraron las AoSMCs en placas de 96 pocillos y se cultivaron hasta obtener una capa confluyente. Las células se incubaron con ácido ascórbico en medio de crecimiento durante tres días. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se complementaron con 50 µl/pocillo de 25 µg/ml de 4-MUP (sustrato de ALP fluorescente, Sigma) en tampón alcalino (Sigma)/Triton X100 al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió a 360/450 nm.

Acumulación de calcio en la matriz extracelular

- 50 Se sembraron AoSMCs sobre placas de plástico recubiertas con fibronectina a una densidad de 25.000 por cm cuadrado y se cultivaron hasta confluencia durante 5-7 días. Se añadió ácido ascórbico o la mezcla 1 a las células en

- las concentraciones indicadas durante 72 horas en DMEM complementado con FBS al 2% y la matriz extracelular producida por las células se expuso mediante tratamiento secuencial con Triton X100 al 0,5% y sulfato de amonio 20 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Life Technologies) durante 3 minutos, cada una a temperatura ambiente como se describe in Ivanov V, Ivanova S, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Plant-derived micronutrients suppress monocyte adhesion to cultured human aortic endothelial cell layer by modulating its extracellular matrix composition. J Cardiovasc Pharmacol 2008; 52:55-65. Después de cuatro lavados con PBS, las capas de MECs se solubilizaron mediante incubación en HCl 0,6 N durante 48 horas a 37°C. El contenido en calcio en las muestras solubilizadas se midió con el ensayo TECO Ca según el protocolo del fabricante.

Expresión de marcadores de osteoblastos en células cultivadas humanas

- Para los experimentos, se sembraron células AoSMC, DF y hFOB en placas de plástico distintas de 96 pocillos, con una densidad de 25.000 por cm cuadrado y se cultivaron hasta confluencia durante 5 a 7 días. Los compuestos sometidos a ensayo se añadieron a las células con las concentraciones indicadas durante 72 horas en DMEM complementado con FBS al 2%. Las capas celulares se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 3% en PBS a 4°C durante una hora. Las capas de células fijadas se lavaron cuatro veces con PBS y se trataron con BSA/PBS al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Se realizó un inmunoensayo para marcadores osteogénicos mediante incubación secuencial con anticuerpos monoclonales primarios (R&D Systems) en BSA/PBS al 1% durante 2 horas, seguido de 1 hora de incubación con anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de ratón marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP). La actividad peroxidasa retenida se midió después del último ciclo de lavado (tres veces con BSA/PBS al 0,1%) usando un reactivo de sustrato de peroxidasa TMB (Rockland). La densidad óptica se leyó con un lector de placas (Molecular Devices) a 450 nm y se expresó como porcentaje de muestras de células de control incubadas en FBS/DMEM al 2% sin complementar. Para garantizar una comparación directa de la expresión de los marcadores osteogénicos sobre diferentes tipos de células, todas las placas cubiertas con células se trataron de forma idéntica y simultánea durante el inmunoensayo.

Análisis estadístico

- Los resultados en cifras son medias $\pm$ desviación estándar DE de tres o más repeticiones del experimento más representativo de al menos dos experimentos independientes. Las diferencias entre las muestras se estimaron con una prueba t de Student de dos colas, utilizando el programa informático Excel (Microsoft) y se aceptaron como significativas con niveles de p inferiores a 0,05.
- Los resultados en las Figuras 4A, 4B, 5A y 5B se expresan como porcentaje de controles complementados y se presentan como medias $\pm$ DE de seis o más repeticiones del más representativo de al menos dos experimentos independientes.

Resultados

- Realizaciones ejemplares se ilustran a modo de ejemplo y sin limitación en las figuras de los dibujos adjuntos, en los que referencias similares indican elementos similares y en los que la Figura 4A y la Figura 4B son de acuerdo con la presente invención. La Figura 1 muestra los efectos del tratamiento con ácido ascórbico sobre la calcificación de la matriz extracelular en células cultivadas de músculo liso aórtico humano.

La Figura 2A muestra los efectos de la simvastatina sobre la acumulación de Ca en un cultivo de AoSMCs sin forskolina.

- La Figura 2B muestra los efectos de la mevastatina sobre la acumulación de Ca en un cultivo de AoSMCs con forskolina 25 mcM.

La Figura 3A muestra los efectos de ascorbato 200 mcM sobre la expresión de marcadores de osteoblastos en SMCs aórticas humanas incubadas durante 4 semanas en medio osteogénico complementado con beta-glicerofosfato 5 mM y forskolina 25 mcM.

- La Figura 3B muestra los efectos de ascorbato 200 mcM sobre la expresión de marcadores de osteoblastos en fibroblastos dérmicos humanos incubados durante 4 semanas en medio osteogénico complementado con beta-glicerofosfato 5 mM y forskolina 25 mcM.

La Figura 4A muestra los efectos de las estatinas 1 mcM y la Mezcla 1 (con ascorbato 100 mcM) sobre la actividad fosfatasa alcalina en AoSMCs complementadas con FBS/DMEM al 5% durante cuatro días. Incubación de 90 min con sustrato MSU.

- La Figura 4B muestra los efectos de estatinas 1 mcM y la Mezcla 1 (y ascorbato 100 mcM) sobre la actividad fosfatasa alcalina en AoSMCs complementadas con b-GP 5 mM y forskolina 25 mcM durante cuatro días. Incubación de 95 min con sustrato MSU.

La Figura 5A muestra los efectos de estatinas 1 mcM y ascorbato 300 mcM sobre la actividad fosfatasa alcalina en AoSMCs complementadas con FBS/DMEM al 5% simple durante cinco días.

La Figura 5B muestra los efectos de estatinas 1 mcM y ascorbato 300 mcM sobre la actividad fosfatasa alcalina en AoSMCs complementadas con FBS/DMEM al 5%/b-GP 5 mM, forskolina 25 mcM durante cinco días.

El proceso de calcificación celular se investigó en AoSMCs humanas cultivadas en un medio de crecimiento celular regular (FBS/DMEM al 5%) en ausencia y presencia de diversas cantidades de ácido ascórbico. El proceso de calcificación de AoSMCs se evaluó mediante la actividad fosfatasa alcalina celular y la acumulación de calcio en la matriz extracelular producida por las células (Figura 1).

Los resultados muestran que la complementación del medio de las AoSMCs con ácido ascórbico hasta 300 mcM daba como resultado una disminución significativa en el nivel de calcio extracelular y una menor actividad fosfatasa alcalina celular de manera dependiente de la dosis. En presencia de ascorbato 300 mcM, la acumulación de Ca extracelular por las AoSMCs disminuía en un 20% y la actividad fosfatasa alcalina en un 80%.

Los resultados presentados en la Figura 2A muestran que la acumulación de calcio en las capas de AoSMCs aumentaba en presencia de simvastatina en un 23%. Sin embargo, la presencia concomitante de ascorbato de calcio 100 mcM daba como resultado una disminución del 54% del calcio acumulado hasta el valor de 0,2 mcg/pocillo, lo que se correlacionaba con los valores observados en células no expuestas a simvastatina.

En la Figura 2B se presenta el efecto del ascorbato sobre la acumulación de calcio en AoSMCs en condiciones de procalcificación mejorada (con forskolina) y en presencia de una estatina (mevastatina). Los resultados muestran que en presencia de mevastatina 1 mM, la acumulación de calcio aumentaba desde 1,35 mcg/pocillo en el control hasta 1,8 mcg/pocillo con mevastatina. Sin embargo, cuando se añadía ascorbato 100 mcM, la acumulación de calcio disminuía un 19% por debajo de los valores del control (no complementado).

Además de las SMCs, estudiamos el efecto del ascorbato sobre el proceso de calcificación celular en fibroblastos dérmicos (DFs) humanos y osteoblastos fetales humanos (FOBs) inmortalizados mediante la evaluación de cambios en la expresión de diferentes marcadores pro-osteogénicos en esas células. Los efectos del ascorbato en diferentes tipos de células expuestas a condiciones pro-osteogénicas, tales como el cultivo en un medio complementado con beta-glicerofosfato 5 mM y forskolina 25 mcM. Los resultados muestran que la expresión de todos los marcadores osteogénicos analizados se reducía significativamente complementando con ácido ascórbico 100 mcM en cultivos de AoSMCs y DFs (Figura 3). La complementación con ácido ascórbico de osteoblastos hFOS en medio pro-osteogénico durante un período de cuatro semanas era citotóxica. Los datos correspondientes se omitieron en la presentación.

Comparamos los niveles de expresión de los marcadores osteogénicos en los tipos de células humanas de la prueba tal y como se presentan en la Tabla 1. Los resultados indican que en un medio de crecimiento regular, la expresión de osteocalcina, osteoadherina, proteína 1 de la matriz dentinaria (DMP-1) y esclerostina (SOST) eran más prominentes en las células de osteoblastos (FOBs), seguidas de cerca por los fibroblastos (DFs), excepto DMP-1, cuya expresión en los fibroblastos superaba ligeramente a la de los cultivos de FOBs. La expresión celular de esos cuatro marcadores osteogénicos en AoSMCs cultivadas en medio de crecimiento regular, era significativamente (2-4) veces menos prominente que en cultivos de FOBs y DFs.

En las presentes pruebas demostramos que el ácido ascórbico sometido a ensayo en concentraciones de hasta 300 mcM puede reducir la acumulación de calcio en la MEC producida por AoSMCs. Este efecto estaba acompañado por el bloqueo de la transformación osteogénica de las SMCs, como lo indican los cambios en parámetros metabólicos específicos, como la reducción de la actividad fosfatasa alcalina celular y la expresión celular de las proteínas marcadoras de los osteoblastos. Un nivel alto de fosfatasa alcalina (ALP) sérica se asocia con un mayor riesgo de mortalidad e infarto de miocardio. La ALP hidroliza el pirofosfato inorgánico, que es un potente inhibidor del depósito de fosfato cálcico.

Tabla 1

Tipo de célula		Marcador osteogénico							
		Osteocalcina		Osteoadherina/OSAD		DMP-1		SOST/Esclerostina	
		media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
AoSMC	Medio simple	0,288	0,047	0,259	0,025	0,412	0,063	0,212	0,030
	Medio osteogénico	0,429	0,086	0,315	0,061	0,569	0,111	0,289	0,063
hDF	Medio simple	1,087	0,051	0,889	0,093	1,137	0,089	0,657	0,058
	Medio osteogénico	0,614	0,242	0,403	0,119	0,851	0,116	0,374	0,051

Tipo de célula		Marcador osteogénico							
		Osteocalcina		Osteoadherina/OSAD		DMP-1		SOST/Esclerostina	
		media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
FOS	Medio simple	1,206	0,288	1,493	0,147	0,819	0,307	0,956	0,197
	Medio osteogénico	1,003	0,207	1,049	0,213	0,786	0,078	0,633	0,126

En condiciones fisiológicas (células incubadas en medio de cultivo celular normal), la expresión de osteocalcina, osteoadherina y SOST/esclerostina era la más alta en los cultivos de hFOS y la más baja en los cultivos de hAoSMC. La expresión de esos marcadores era intermedia en los cultivos de hDF. En condiciones fisiológicas (células incubadas en medio de cultivo celular normal), la expresión de DMP-1 era la más alta en los cultivos de hDF y la más baja en los cultivos de hAoSMC. La expresión de DMP-1 era intermedia en los cultivos de hFOS. La complementación celular con medio pro-osteogénico en comparación con el medio regular, provocaba la estimulación de todos los osteomarcadores sometidos a ensayo en los cultivos de AoSMC. Por el contrario, la complementación con medio pro-osteogénico provocaba una inhibición de todos los marcadores osteogénicos sometidos a ensayo en los cultivos de hDF y hFOS.

Una descripción de los resultados presentados en las Figuras 4 (A y B) y Figuras 5 (A y B) muestra que el proceso de calcificación celular se investigó en células del músculo liso aórtico humano (AoSMCs) cultivadas en medio de cultivo celular en ausencia y presencia de varias estatinas: simvastatina, mevastatina y pravastatina utilizadas con una concentración de 1 mcM cada una. El proceso de calcificación de las AoSMCs se evaluó a través de la actividad fosfatasa alcalina celular (ALP). El estudio evaluaba los efectos de la mezcla 1 (combinación de micronutrientes que contiene ascorbato) y el ascorbato individualmente en condiciones estándar (FBS/DMEM al 5%) y procalcificación (FBS/DMEM al 5% complementado con beta-glicerofosfato (b-GP) 5 mM y forskolina 25 mcM - Figura 4B).

Los resultados presentados en la Figura 4A muestran que la actividad ALP de las AoSMCs en condiciones normales de cultivo celular no se veía afectada por la simvastatina, pero aumentaba en presencia de mevastatina en un 25% y de pravastatina en un 39%, en comparación con el control. La adición de la Mezcla 1 con una concentración equivalente a ascorbato 100 mcM daba como resultado una disminución de la actividad ALP. Como tal, la ALP era inferior en un 33% en el grupo de control y en un 29%, 25% y 27% en presencia de simvastatina, mevastatina y pravastatina, respectivamente. Una combinación de pravastatina y la mezcla 1 daba como resultado una reducción del proceso de calcificación al nivel observado en el control (sin complementar). La mezcla 1 en presencia de simvastatina y mevastatina disminuía la actividad ALP por debajo de los valores de control. La más eficaz para reducir la actividad ALP era una combinación de la mezcla 1 con simvastatina: un 33% por debajo del valor de control y casi igual al efecto de la mezcla 1 aplicada sola.

Los resultados presentados en la Figura 4B muestran que en condiciones de procalcificación (b-GP 5 mM y forskolina 25 mcM), la presencia de simvastatina daba como resultado un aumento en la actividad ALP de un 22%, con mevastatina de un 39% y con pravastatina de un 25%, en comparación con el control. Al añadir la mezcla 1 en presencia y ausencia de estatinas, la actividad ALP disminuía en un 52% en el control y en presencia de simvastatina, mevastatina y pravastatina, en un 52%, 45%, 44% respectivamente, en comparación con los valores sin mezcla 1. De manera similar a las condiciones normales de cultivo celular, la eficacia de la mezcla 1 para reducir la actividad ALP era mayor cuando se combinaba con simvastatina (40% en comparación con el control). La mezcla 1 en combinación con todas las estatinas del ensayo reducía significativamente la actividad ALP por debajo de los niveles de control. El importante efecto reductor de ALP de la mezcla 1 se comparó con el ácido ascórbico utilizado individualmente con una concentración de 300 mcM, que es tres veces mayor que su cantidad equivalente contenida en la formulación de la mezcla 1.

Los resultados de la Figura 5A muestran que la complementación del medio AoSMC con ácido ascórbico 300 mcM en presencia y ausencia de estatinas del ensayo, daba como resultado una disminución significativa en la actividad fosfatasa alcalina celular (ALP). En condiciones normales de medio de cultivo, el ácido ascórbico disminuía la actividad fosfatasa alcalina en aproximadamente un 43%. En presencia de simvastatina, la actividad ALP era mayor en un 57% y disminuía al nivel de control después de la adición de ascorbato 300 mcM. De manera similar, la mevastatina y la pravastatina aumentaban la actividad ALP en un 61% y un 60%, respectivamente. Estos efectos estimulantes disminuían en un 29% y un 30%, respectivamente, en presencia de ácido ascórbico.

Los resultados de la Figura 5B muestran que, en condiciones de procalcificación, las estatinas provocaban un aumento del 30%, 41% y 25% en la estimulación de la actividad ALP para simvastatina, mevastatina y pravastatina, respectivamente. Una complementación simultánea con ascorbato daba lugar a una disminución en la actividad ALP de un 36%, 37% y 24% para las muestras que contenían simvastatina, mevastatina y pravastatina, respectivamente. En las mismas condiciones experimentales, el ácido ascórbico añadido a AoSMCs en ausencia de estatinas, disminuía la actividad ALP en un 29%.

Por tanto, en este estudio probamos que la mezcla 1 y/o la vitamina C tienen un papel decisivo en la regulación de la estructura y función celular y extracelular dentro de la pared vascular. Con una disponibilidad óptima de ascorbato o de la mezcla 1, la integridad y la estabilidad de la pared vascular estaría garantizada, sobre todo, a través de una síntesis óptima de colágeno y otras moléculas de la MEC.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de composición que comprende ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína para uso en el tratamiento o la prevención de la calcificación vascular inducida en pacientes por la administración de estatinas.
- 5 2. La mezcla de composición según la reivindicación 1, para uso en pacientes en tratamiento que reciben un tratamiento concomitante con estatinas.
3. La mezcla de composición para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la mezcla de composición contiene las siguientes cantidades:

ácido L-ascórbico o ascorbato: 300 mg a 1000,2 mg,
10 vitamina E: 27,5 mg a 82,5 mg,
vitamina B1: 3,3 mg a 9,9 mg,
vitamina B2: 3,3 mg a 9,9 mg,
vitamina B3: 115 mg a 350,1 mg,
vitamina B5: 16,7 mg a 50,1 mg,
15 vitamina B6: 3,3 mg a 9,9 mg,
vitamina B12: 10 µg a 30 µg,
ácido fólico: 133,3 µg a 399,9 µg,
biotina: 33,3 µg a 99,9 µg,
L-carnitina: 33,3 mg a 99,9 mg,
20 betaína: 23,3 mg a 69,9 mg.
4. La mezcla de composición para uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el ascorbato se selecciona a partir de ascorbatos solubles en agua o solubles en lípidos o mezclas de los mismos, preferiblemente a partir de ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de sodio, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo o mezclas de los mismos.
- 25 5. Una composición farmacéutica que contiene al menos una estatina y ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína en una forma de dosificación que permite la administración concomitante a un paciente de al menos una estatina y ácido L-ascórbico o ascorbato y vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína.
- 30 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 6, en la que al menos una estatina y ácido L-ascórbico o ascorbato, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína están presentes como una mezcla física o como composiciones farmacéuticas separadas destinadas a una administración concomitante a un paciente.
- 35 7. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.
8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, en donde la enfermedad cardiovascular es enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cerebrovascular o enfermedad vascular periférica.
9. La composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la estatina se selecciona a partir del grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina o mezclas de las mismas.
- 40 10. La composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 5 a 9, en donde el ascorbato se selecciona a partir de ascorbatos solubles en agua o solubles en lípidos o mezclas de los mismos, preferiblemente a partir de ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de sodio, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo o mezclas de los mismos.
- 45 11. La composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 5 a 10, que contiene adicionalmente coenzima Q₁₀ en una forma de dosificación que permite la administración concomitante a un paciente de al menos una estatina, ácido L-ascórbico o ascorbato y coenzima Q₁₀.

12. La composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 5 a 11, que comprende una cantidad de dosificación diaria de ácido L-ascórbico o ascorbato de 10 mg a 100 g y de al menos una estatina de 5 mg a 100 mg.

13. La composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 5 a 12, que contiene las siguientes cantidades:

ácido L-ascórbico o ascorbato: 300 mg a 1000,2 mg,

5 vitamina E: 27,5 mg a 82,5 mg,

vitamina B1: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B2: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B3: 115 mg a 350,1 mg,

vitamina B5: 16,7 mg a 50,1 mg,

10 vitamina B6: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B12: 10 µg a 30 µg,

ácido fólico: 133,3 µg a 399,9 µg,

biotina: 33,3 µg a 99,9 µg,

L-carnitina: 33,3 mg a 99,9 mg,

15 betaína: 23,3 mg a 69,9 mg

en la composición farmacéutica.

14. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, que contiene adicionalmente niacina, preferiblemente en una mezcla con la estatina.

20 15. Una mezcla 1 de composición que comprende o consiste en vitamina C, vitamina E, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, L-carnitina y betaína que contiene o consiste en las siguientes cantidades:

vitamina C: 300 mg a 1000,2 mg,

vitamina E: 27,5 mg a 82,5 mg,

vitamina B1: 3,3 mg a 9,9 mg,

25 vitamina B2: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B3: 115 mg a 350,1 mg,

vitamina B5: 16,7 mg a 50,1 mg,

vitamina B6: 3,3 mg a 9,9 mg,

vitamina B12: 10 µg a 30 µg,

30 ácido fólico: 133,3 µg a 399,9 µg,

biotina: 33,3 µg a 99,9 µg,

L-carnitina: 33,3 mg a 99,9 mg,

betaína: 23,3 mg a 69,9 mg

en la mezcla de composición.

35 16. La mezcla 1 de composición según la reivindicación 15, en donde la vitamina C está en forma de ascorbato, en donde el ascorbato se selecciona preferentemente a partir de ascorbatos solubles en agua o solubles en lípidos, o mezclas de los mismos, más preferentemente en donde el ascorbato se selecciona a partir de ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de sodio, fosfato de ascorbilo, palmitato de ascorbilo o mezclas de los mismos.

40 17. La mezcla 1 de composición según una de las reivindicaciones 15 o 16, que contiene adicionalmente una coenzima Q₁₀.

Fig. 1

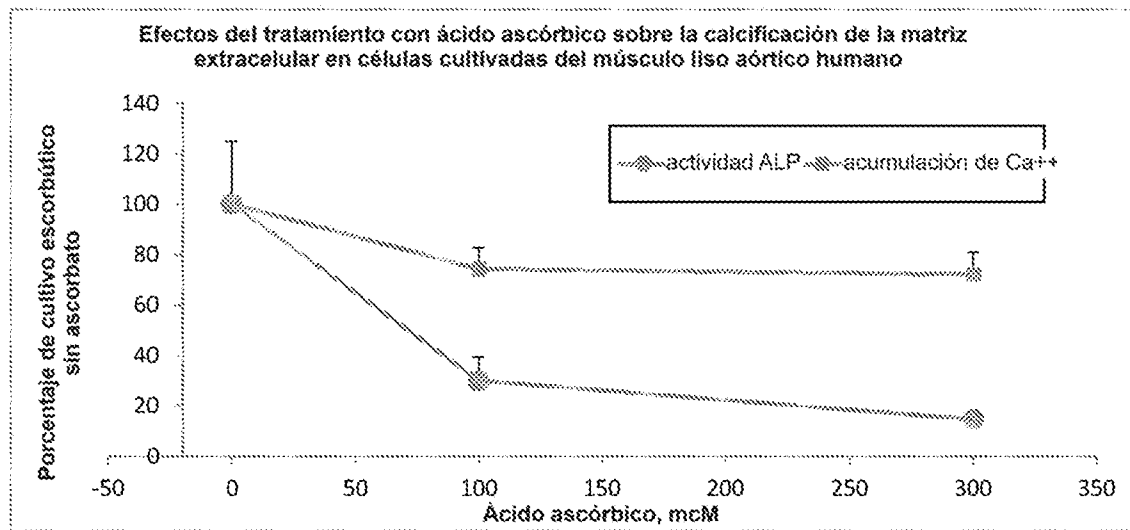


Fig. 2A

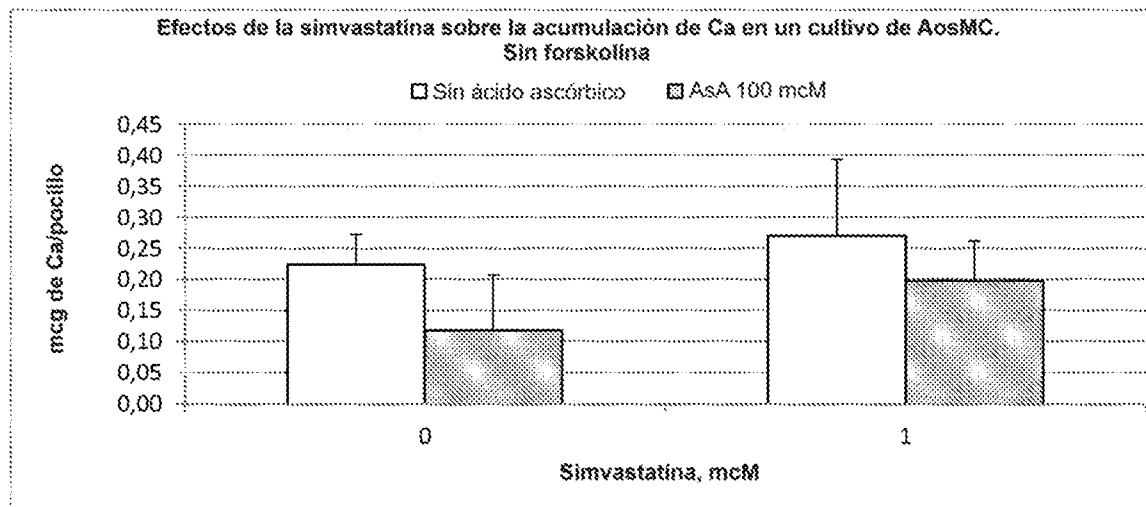


Fig. 2B

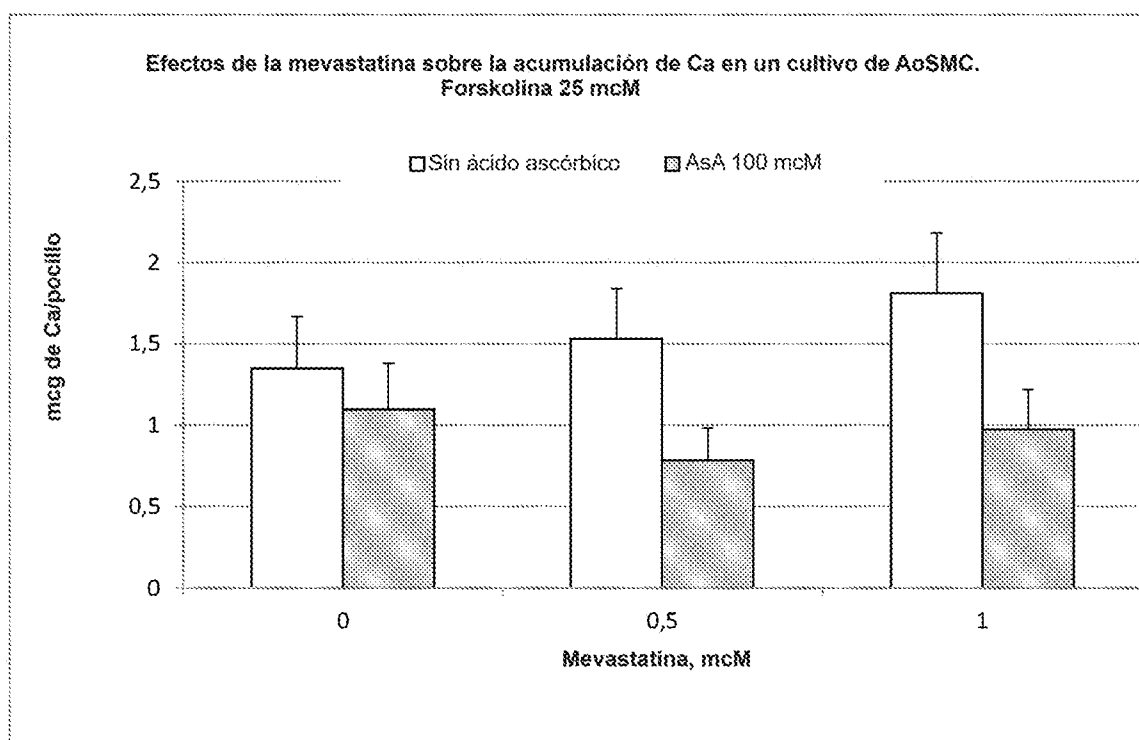


Fig. 3A

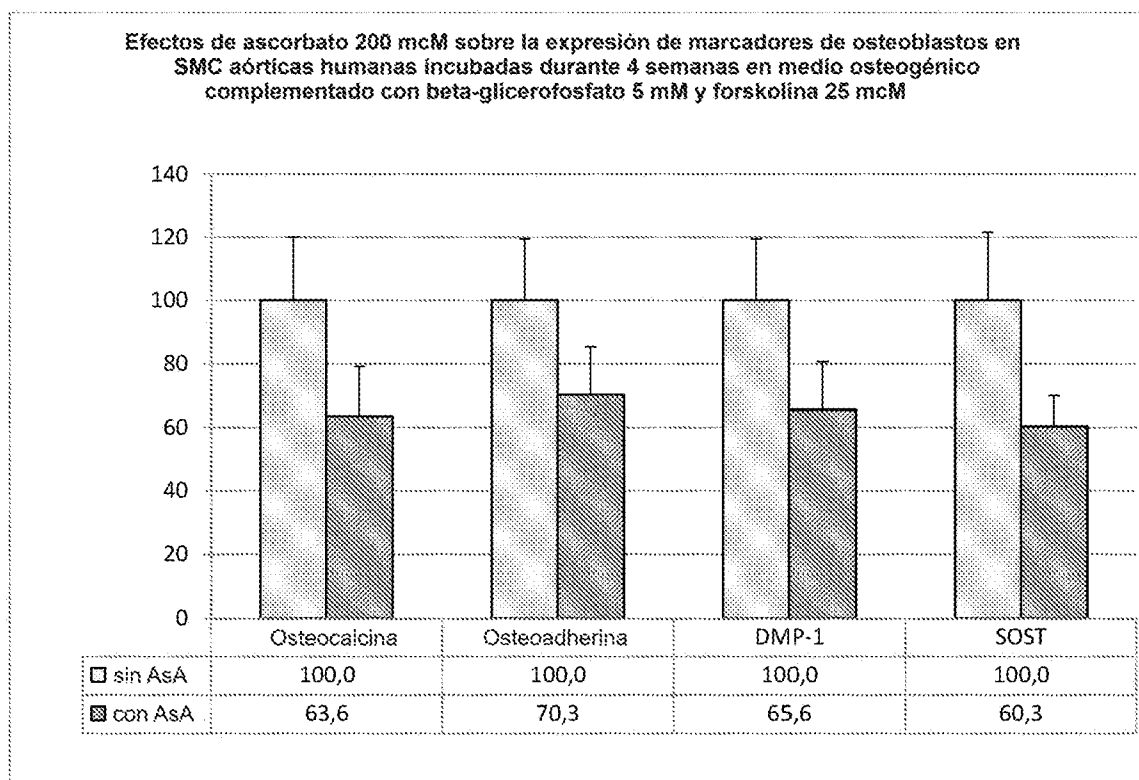


Fig. 3B

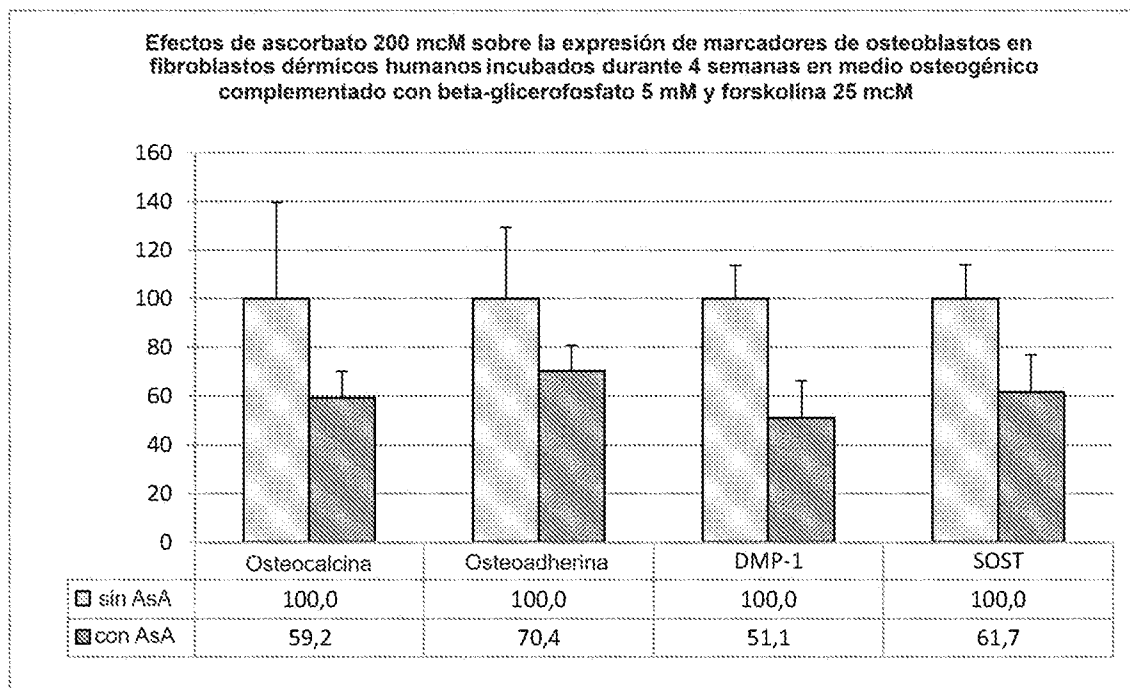


Fig. 4A

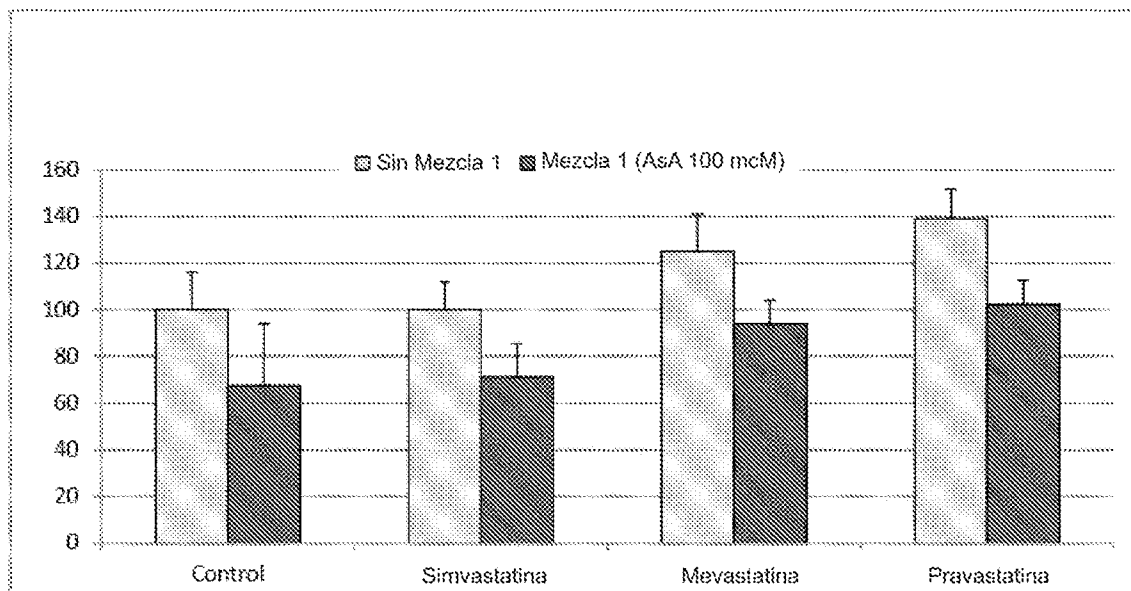


Fig. 4B

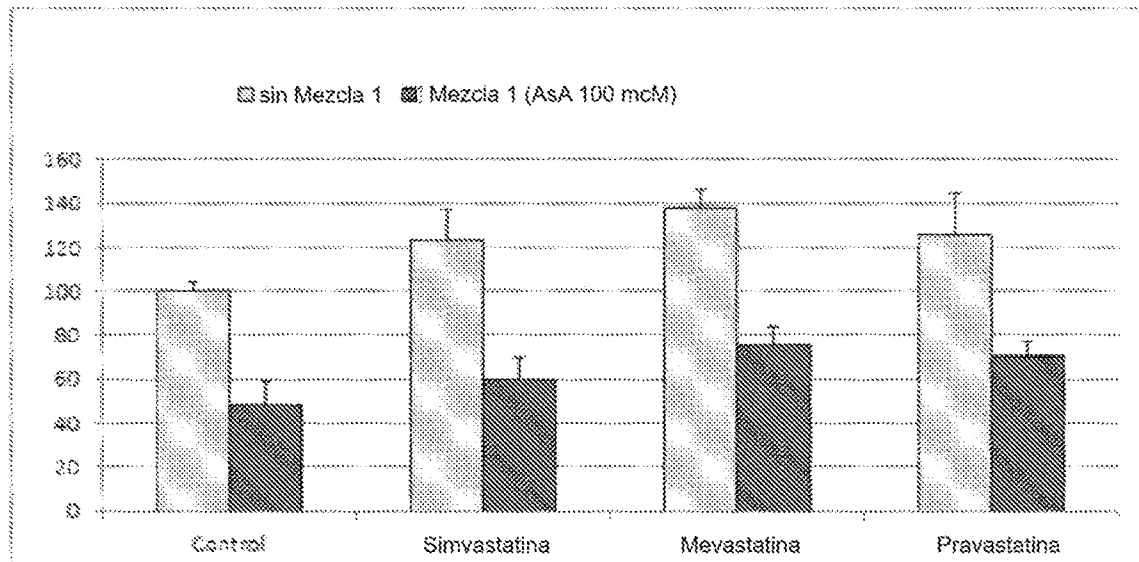


Fig. 5A

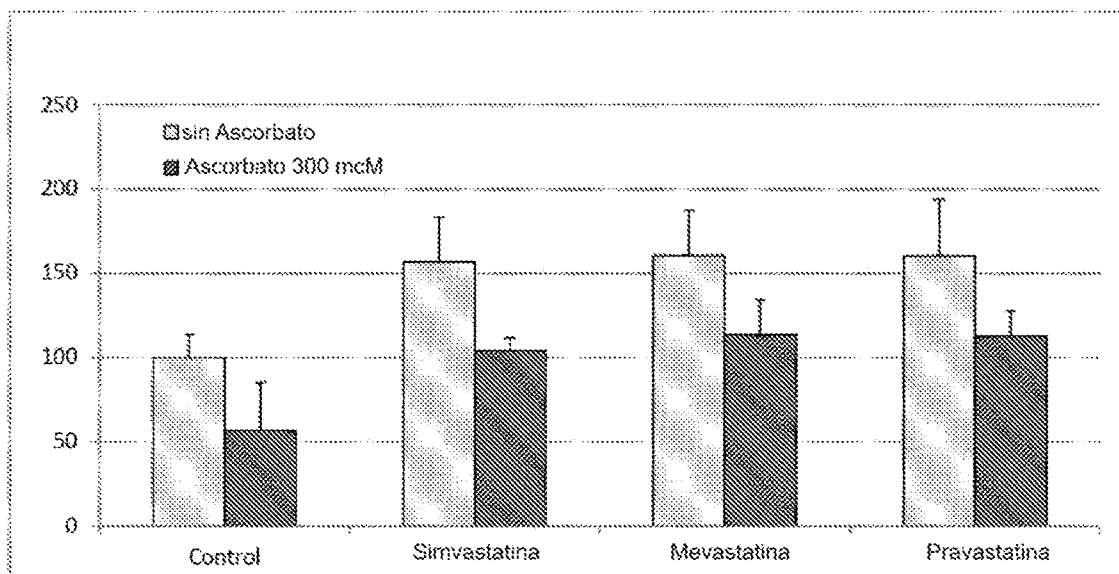


Fig. 5B

