

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.06.06	(73) Titular(es): NATTOPHARMA ASA HENRIK IBSEN GATE 100 0230 OSLO NO
(30) Prioridade(s): 2005.06.03 US 144853	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.12.06	(72) Inventor(es): CEES VERMEER NL
(45) Data e BPI da concessão: 2011.03.16 102/2011	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE VITAMINA K PARA INVERTER A CALCIFICAÇÃO DOS VASOS SANGUÍNEOS**

(57) Resumo:

A VITAMINA K É EFICAZ A CONTRARIAR DOENÇAS CARDIOVASCULARES TAIS COMO A REDUÇÃO DA ELASTICIDADE ARTERIAL NORMALMENTE ASSOCIADA AO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO. UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA OU FORMULAÇÃO NUTRICIONAL COMPREENDENDO VITAMINA K PODE SER UTILIZADA PARA COMBATER A RIGIDEZ DAS ARTÉRIAS RELACIONADA COM O ENVELHECIMENTO E AS SUAS CONSEQUÊNCIAS, NOMEADAMENTE CONGESTÃO PULMONAR, HIPERTENSÃO, HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA, INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CONGESTIVA (DO LADO DIREITO), INSUFICIÊNCIA VENTRICULAR DO LADO ESQUERDO OU ESQUERDA, INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CRÓNICA, ANGINA DE PEITO, ENFARTE DO MIOCÁRDIO, ESCLEROSE DE MÖNCKEBERG E ACIDENTE VASCULAR. EM VÁRIAS FORMAS DE REALIZAÇÃO, A VITAMINA K TAMBÉM PODE SER UTILIZADA PARA REDUZIR OU INVERTER A CALCIFICAÇÃO DE UM VASO SANGUÍNEO EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES PRÉ-EXISTENTES TAIS COMO A ARTERIOSCLEROSE.

RESUMO**"UTILIZAÇÃO DE VITAMINA K PARA INVERTER A CALCIFICAÇÃO DOS
VASOS SANGUÍNEOS"**

A vitamina K é eficaz a contrariar doenças cardiovasculares tais como a redução da elasticidade arterial normalmente associada ao processo de envelhecimento. Uma composição farmacêutica ou formulação nutricional compreendendo vitamina K pode ser utilizada para combater a rigidez das artérias relacionada com o envelhecimento e as suas consequências, nomeadamente congestão pulmonar, hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva (do lado direito), insuficiência ventricular do lado esquerdo ou esquerda, insuficiência cardíaca crónica, angina de peito, enfarte do miocárdio, esclerose de Mönckeberg e acidente vascular. Em várias formas de realização, a vitamina K também pode ser utilizada para reduzir ou inverter a calcificação de um vaso sanguíneo em doenças cardiovasculares pré-existentes tais como a arteriosclerose.

DESCRIÇÃO**"UTILIZAÇÃO DE VITAMINA K PARA INVERTER A CALCIFICAÇÃO DOS
VASOS SANGUÍNEOS"****CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se à utilização de vitamina K para inverter a calcificação dos vasos sanguíneos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O processo de envelhecimento está associado a alterações fisiológicas irreversíveis do sistema circulatório, levando a um risco aumentado de doenças da pressão arterial, doença cardíaca coronária (CHD) e acidente vascular. Para as mulheres, esse risco aumenta drasticamente após o início da menopausa. Estas patologias têm um impacto significativo na qualidade de vida para as pessoas de meia-idade e os idosos e são responsáveis por uma grande proporção de mortes e doenças crónicas nas sociedades modernas.

Aos doentes que sofrem de doenças cardiovasculares são frequentemente receitados anticoagulantes, anti-hipertensores, medicamentos para abaixamento do colesterol,

e outros semelhantes. Estes medicamentos normalmente apresentam efeitos secundários nocivos ou riscos para a saúde e além disso não estão bem estudados os efeitos crónicos de tomar essa medicação regularmente ao longo de anos ou décadas. À medida que aumenta a esperança de vida, seria desejável encontrar terapêuticas naturais seguras e fiáveis de longo prazo para prevenir, tratar ou até mesmo inverter as consequências do envelhecimento sobre a vasculatura.

Há muito que foi reconhecido que a vitamina K é um componente essencial da dieta. Foi identificada primeiramente como um elemento necessário para impedir hemorragias por activação de factores de coagulação do sangue. Os vitâmeros K naturais são derivados de menadiona que diferem uns dos outros quanto à cadeia lateral poliisoprenóide ligada à posição 3 da estrutura do anel. A vitamina K pode ser fornecida na dieta por legumes com folhas verdes escuras (K₁ ou filoquinona) e por alimentos fermentados tais como queijo e requeijão (K₂ ou menaquinona). As vitaminas K₂ também são sintetizadas no intestino delgado por bactérias simbióticas residentes. A vitamina K também é necessária para a carboxilação de duas proteínas da matriz óssea necessária para o metabolismo normal do osso.

No EP-A-0 679 394 e também em *Jpn. J. Pharmacol.* (1997) 75:135-143, está descrito que uma ingestão dietética elevada de vitamina K e moléculas relacionadas pode reduzir mais a calcificação arterial, mas não invertê-la, de onde se conclui que a arteriosclerose pode ser tratada utili-

zando vitamina K. A arteriosclerose é uma doença das artérias caracterizada por inflamação, invasão de macrófagos, formação de células esponjosas, espessamento da íntima, acumulação de colesterol e formação de uma placa aterosclerótica, que com o tempo pode ficar calcificada. O aparecimento da aterosclerose é invariavelmente nas grandes artérias tais como, por exemplo, a aorta e as artérias coronárias. Em fases mais avançadas pode observar-se a ruptura da placa que leva à oclusão vascular súbita, enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral (enfarte cerebral).

Um processo completamente diferente é o da rigidez vascular devida à perda de elasticidade das artérias. A rigidez vascular está associada ao envelhecimento, diabetes mellitus e disfunção renal; é o resultado da degradação das lamelas elásticas da túnica média, resultando em perda de elasticidade. O início da rigidez vascular é geralmente observado nos vasos menores, mas estende-se até às artérias maiores. Isto vai levar a pressão arterial aumentada, alargamento vascular, e em fases posteriores à ruptura (principalmente das pequenas) artérias e capilares.

O WO 2004/019923 descreve que a vitamina K é eficaz para contrariar a redução da elasticidade arterial normalmente associada ao envelhecimento.

Os estudos demonstraram que também ao nível molecular a rigidez das artérias relacionada com o envelheci-

mento pode ser distinguida da calcificação arteriosclerótica/aterosclerótica.

Há necessidade de composições e métodos eficazes para inverter a calcificação dos vasos sanguíneos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num primeiro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de vitamina K para a preparação de uma formulação farmacêutica ou nutricional para inverter a calcificação de um vaso sanguíneo num mamífero que sofre de calcificação de um vaso sanguíneo, quando se administra ao mamífero uma quantidade eficaz da referida vitamina K para inverter a calcificação de um vaso sanguíneo.

Especificamente constatou-se que a ingestão elevada de vitamina K pode levar à remoção de precipitados calcificados de vasos sanguíneos que já foram afectados por calcificação pré-existente. Esta é uma constatação nova e surpreendente com enorme importância para doentes com doença arterial existente. As implicações para a indústria de nutrição são que podem ser desenvolvidos alimentos e suplementos alimentares enriquecidos em vitamina K.

A calcificação de um vaso sanguíneo associada a uma doença seleccionada do grupo que consiste em arteriosclerose, incluindo esclerose de Mönckeberg, osteoartrite, calcificação induzida por inflamação, incluindo

doença de Bechterev, calcificação induzida por tumor, calcificação da pele, incluindo pseudoxantoma elástico (PXE) e calcifilaxia na insuficiência renal crónica terminal.

Noutro aspecto, a invenção proporciona uma composição para promoção de artérias saudáveis, compreendendo vitamina K ou um seu derivado, e opcionalmente vitamina D ou um seu derivado, e um ou mais componentes adicionais seleccionados de: polifenóis, vitamina C, vitamina E (tocoferóis e/ou tocotrienóis), L-arginina, fitosteróis, péptidos anti-hipertensores, fibras solúveis (e.g. guar, pectina), ácidos gordos omega-3, omega-6 e/ou omega-9, carnitina, taurina, coenzima Q10, creatina, ácido fólico, folatos, magnésio, potássio, vitamina B6 e vitamina B12.

Ainda noutro aspecto da invenção é proporcionado um kit compreendendo vitamina K ou um seu derivado, e opcionalmente vitamina D ou um seu derivado e um medicamento, para administração simultânea, separada ou sequencial, em que o referido medicamento é seleccionado do grupo que consiste em: anticoagulantes, antitrombóticos, fibrinolíticos, anti-hipertensores, diuréticos, anti-anginosos, agentes hipolipidémicos, bloqueadores beta, inibidores de ACE, glicosidos cardíacos, inibidores de fosfodiesterases, anti-arrítmicos e antagonistas do cálcio.

Noutro aspecto da invenção, é proporcionada uma composição para inverter a calcificação de um vaso sanguíneo num ser humano, compreendendo cerca de 50 microgramas a 50 miligramas de vitamina K.

Características adicionais e vantagens de várias formas de realização serão apresentadas em parte na descrição que se segue, e em parte serão evidentes a partir da descrição, ou podem ser aprendidas por prática de várias formas de realização. Os objectivos e outras vantagens de várias formas de realização serão realizados e atingidos por meio dos elementos e combinações especificamente assinaladas na descrição e reivindicações anexas.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra como o Coeficiente de Distensibilidade (DC) varia ao longo de um período de estudo de 3 anos, quando placebo, vitamina D (MD) e vitaminas K mais D (MDK) são administradas a um grupo de mulheres pós-menopáusicas.

A Figura 2 mostra como o Coeficiente de *Compliance* (CC) varia ao longo de um período de estudo de 3 anos, quando placebo, vitamina D (MD) e vitaminas K mais D (MDK) são administradas a um grupo de mulheres pós-menopáusicas.

Em cada caso, a barra preta representa a medida da linha de base (100%), e as barras sombreadas são a % de alteração em relação à linha de base após 3 anos.

A Figura 3 é um gráfico que mostra os dados de 18 ratos numa dieta controlada (contendo 5 µg/g de vitamina

K). Seis ratos foram sacrificados na linha de base, seis após 6 semanas e seis após 12 semanas. Com exceção do cálcio celular, não se observou aumento do cálcio durante o período do teste.

A Figura 4 é um gráfico que mostra resultados obtidos quando ratos receberam um tratamento de 6 semanas com o antagonista de vitamina K warfarina (indicado como "pobre em vitamina K") num protocolo que não influencia a coagulação do sangue, mas afecta sobretudo o estado da vitamina K óssea e vascular. Seis ratos foram sacrificados após 6 semanas de tratamento e outros seis após 12 semanas de tratamento. Tal como ilustrado, houve um aumento constante de cálcio na parede arterial.

A Figura 5 é um gráfico que mostra os resultados obtidos depois de os ratos serem tratados com warfarina durante seis semanas e subsequentemente alimentados com uma dieta normal contendo 5 µg de vitamina K por g de alimento (indicada como "K normal"). A calcificação não parou utilizando a dieta normal.

A Figure 6 é um gráfico que mostra os resultados obtidos depois de os ratos serem tratados com warfarina durante seis semanas e subsequentemente receberem durante outras seis semanas uma dieta rica em vitamina K. Um grupo recebeu uma dieta contendo 100 µg/g de vitamina K₁, o outro grupo recebeu uma dieta contendo 100 µg/g de vitamina K₂ (menaquinona-4). Estas dosagens representam cerca de 20

vezes a ingestão normal de vitamina K para ratos. A constatação mais surpreendente foi que os cristais de cálcio pré-formados se tinham dissolvido em grande extensão como indicado pela diminuição da calcificação aórtica.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Para os efeitos desta especificação e reivindicações anexas, salvo indicação em contrário, todos os números que exprimem quantidades de ingredientes, percentagens ou proporções de materiais, condições reaccionais, e outros valores numéricos utilizados na especificação e reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo "cerca de". Em conformidade, salvo indicação em contrário, os parâmetros numéricos apresentados na especificação seguinte e reivindicações anexas são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas que se procura obter pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa para limitar a aplicação da doutrina dos equivalentes ao âmbito das reivindicações, cada parâmetro numérico deve pelo menos ser interpretado à luz do número de dígitos significativos descrito e por aplicação de técnicas de arredondamento correntes.

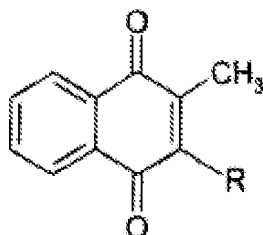
Não obstante os valores numéricos e parâmetros apresentados, o âmbito alargado da invenção são aproximações, os valores numéricos apresentados nos exemplos específicos são descritos com tanta exactidão quanto possí-

vel. Qualquer valor numérico, contudo, contém inerentemente determinados erros que resultam necessariamente do desvio padrão associado às correspondentes determinações de teste. Além disso, todas as gamas aqui descritas são para ser entendidas como abrangendo todas e quaisquer subgamas aí incluídas. Por exemplo, uma gama de "1 a 10" inclui todas e quaisquer subgamas entre (e incluindo) o valor mínimo de 1 e o valor máximo de 10, isto é, todas e quaisquer subgamas que têm um valor mínimo igual ou maior do que 1 e um valor máximo igual ou menor do que 10, e.g., 5,5 a 10.

Note-se que, tal como utilizadas nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas no singular "um/uma" e "o/a" incluem os termos no plural salvo se expressamente e inequivocamente limitados a um referente. Assim, por exemplo, referência a "um monómero" inclui dois ou mais monómeros.

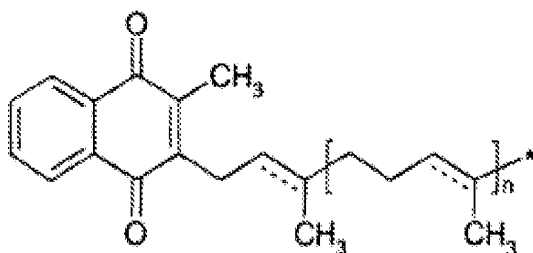
Vai agora ser feita referência em pormenor a determinadas formas de realização da invenção, exemplos das quais estão ilustrados nos desenhos anexas. Embora a invenção vá ser descrita em conjunto com as formas de realização ilustradas, entender-se-á que não há intenção de limitar a invenção a essas formas de realização. Pelo contrário, a invenção pretende abranger todas as alternativas, modificações e equivalentes, que podem estar incluídas dentro da invenção tal como definida pelas reivindicações anexas.

Preferencialmente vitamina K e derivados refere-se a um ou mais compostos de Fórmula 1', e/ou os seus sais farmacêuticamente ou nutricionalmente aceitáveis,



Fórmula 1'

em que R pode ser qualquer grupo orgânico ligado covalentemente incluindo resíduos poliisoprenóides, ésteres, éteres, adutos de tióis, etc. e especialmente os seus compostos de Fórmula 2:



Fórmula 2

em que n é um número inteiro de 1 a 12; e em que as linhas a tracejado indicam a presença opcional de uma ligação dupla.

Vitamina K e os seus derivados, tal como aqui utilizado, refere-se em particular a filoquinona (também conhecida como vitamina K₁), di-hidrofiloquinona; mena-

quinona-4 (MK-4) e as menaquinonas de cadeia longa. É geralmente aceite que a naftoquinona é o grupo funcional, pelo que o mecanismo de acção é semelhante para todas as vitaminas K. Pode, contudo, esperar-se diferenças no que diz respeito à absorção intestinal, transporte, distribuição nos tecidos e biodisponibilidade. Para utilização na presente invenção são preferidas filoquinona e MK-4, e é particularmente preferida a filoquinona.

Fontes de vitamina K que podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção incluem as seguintes: filoquinona de fontes naturais tais como extractos vegetais, óleos e gorduras, filoquinona sintética, vitamina K3 sintética (menadiona), diferentes formas da vitamina K2: MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10, MK-11, MK-12 e MK-13 sintéticas, natto (alimento preparado a partir de soja fermentada, rico em MK-7), e outros alimentos fermentados ou produtos lácteos.

Podem ser fabricados produtos nutricionais enriquecidos em vitamina K para fornecer os requisitos diários de vitamina K. Por exemplo, a vitamina K pode ser adicionada a produtos alimentares, tais como por exemplo substitutos de refeições, gelados, molhos, temperos, pastas para barrar, barritas, doces, aperitivos, cereais, bebidas, etc. por métodos como os descritos na EP 1153548. Além disso, a vitamina K pode ser utilizada em suplementos alimentares tais como multivitaminas, comprimidos, cápsulas e outras formas.

A dose de vitamina K útil na realização da invenção não está restrita, mas varia, dependendo, por exemplo, da idade do indivíduo e do grau de risco de desenvolver rigidez arterial ou do grau de calcificação do vaso sanguíneo. Os valores AI correntes ou Ingestões Adequadas (determinados pelo Instituto de Medicina) são 120 µg para homens e 90 µg para mulheres. Os benefícios podem ser obtidos por selecção de dosagens mais elevadas do que os valores de AI, particularmente em grupos populacionais em que são comuns as deficiências de vitamina K, por exemplo entre as mulheres pós-menopáusicas. Por exemplo, as dosagens adequadas podem estar na gama de 1 a 1000 µg, de um modo mais preferido 5 a 500 µg, e de um modo ainda mais preferido 100 a 200 µg de vitamina K/dia. Quando a legislação nacional permite, pode ser aconselhável proporcionar gamas de dosagem tão altas como desde 1 a 200 mg/dia, de um modo preferido 5 a 150 mg/dia, e de um modo ainda mais preferido 10 a 100 mg/dia.

Em várias formas de realização da presente invenção, a ingestão de um teor elevado de vitamina K induziu a remoção de depósitos de cálcio pré-existentes dentro das paredes dos vasos sanguíneos. Estas doses em seres humanos estavam entre 50 µg/dia a 2 mg/dia.

Em termos de peso corporal, a dosagem diária pode variar entre 0,5 a 200 µg/kg de peso corporal/dia, preferencialmente 0,75 a 25 µg/kg de peso corporal/dia, mais preferencialmente 1 a 15 µg/kg de peso corporal/dia.

Tal como aqui utilizado, os termos "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" são utilizados indistintamente e referem-se a uma quantidade que resulta num melhoramento, inversão ou remediação dos sintomas da doença ou patologia. Por exemplo, uma quantidade eficaz de vitamina K para remover cálcio, reduzir ou inverter a calcificação de um vaso sanguíneo em seres humanos pode estar entre cerca de 50 microgramas/dia e um limite superior de cerca de 50 miligramas/dia. Em várias formas de realização, para remover cálcio, reduzir ou inverter a calcificação de um vaso sanguíneo em seres humanos, é preferida uma dose entre cerca de 100 microgramas e cerca de 2 miligramas/por dia. Estas doses são especialmente úteis no tratamento ou inversão de doenças tais como, por exemplo, arteriosclerose.

A vitamina D é incluída juntamente com vitamina K na composição utilizada no estudo clínico, e pode desempenhar um papel importante no apoio à função da vitamina K de prevenir a rigidez arterial. Pode ser utilizada qualquer forma de vitamina D natural ou sintética, incluindo vitamina D₁, vitamina D₂ (calciferol), vitamina D₃ (colecalfiferol) e análogos da vitamina D (e.g. alfacalcidol, di-hidrotaquisterol, calcitriol). As fontes naturais de vitamina D incluem peixes de água salgada, carne de órgãos, óleos de fígado de peixe e gema de ovo. As dosagens adequadas de vitamina D são 2 a 50 µg/dia, de um modo preferido 5 a 20 µg/dia, e de um modo mais preferido cerca de 7 a 10 µg/dia.

No estudo clínico descrito no Exemplo 1, as medições das propriedades da parede arterial foram feitas aos $t = 0$ e $t = 3$ anos. Este é um bom suporte para a conclusão de que a ingestão de vitamina K durante períodos longos é uma maneira eficaz de limitar o aumento da rigidez arterial. O período de tratamento preferido é um mínimo de 6 meses, de um modo mais preferido pelo menos 18 meses e idealmente pelo menos 36 meses. De facto, como não há efeitos secundários adversos associados à suplementação com vitamina K dietética, deve ser considerada como um componente essencial de um estilo de vida saudável ao longo de toda a vida, e especialmente ao longo da meia-idade e da velhice.

A via de administração preferida de vitamina K é a entérica, em especial oral, mas as vias parentérica ou tópica são alternativas viáveis. "Administração oral" tal como aqui utilizada inclui administração oral, bucal, entérica ou intragástrica. O termo "administração parentérica" tal como aqui utilizado inclui qualquer forma de administração em que a vitamina K é absorvida na corrente sanguínea sem envolvimento da absorção através dos intestinos. Administrações parentéricas exemplificativas que são utilizadas na presente invenção incluem, mas não estão limitadas a administração intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intra-ocular, subcutânea ou intra-articular.

A vitamina K é convencionalmente proporcionada na forma de comprimidos ou cápsulas, *i.e.* num formato de

suplemento farmacêutico ou dietético. Para preparações farmacêuticas ou suplementos dietéticos a vitamina K pode ser combinada com veículos, excipientes ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis na forma de pílulas, comprimidos (revestidos ou não revestidos), cápsulas duras ou moles, drageias, pastilhas, soluções, suspensões e dispersões orais, xaropes ou preparações parentéricas estéreis. Os excipientes apropriados incluem diluentes inertes tais como carbonato de cálcio, carbonato de sódio, lactose, fosfato de cálcio, fosfato de sódio; agentes de granulação e desintegração tais como amido de milho ou ácido algínico; agentes aglutinantes tais como amido, gelatina ou acácia; efervescentes; e agentes lubrificantes tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

Também é possível administrar vitamina K (opcionalmente em conjunto com vitamina D) num produto alimentar ou bebida fortificada. Os formatos de produtos nutricionais preferidos são: bebidas de sumos, bebidas lácteas, bebidas em pó, bebidas desportivas, água mineral, bebidas de soja, chocolate quente, bebidas de malte, biscoitos, pão, bolachas de água e sal, produtos de confeitaria, chocolate, goma de mascar, margarinas, cremes para barrar, iogurtes, cereais de pequeno-almoço, barras de aperitivo, substitutos de refeições, pós de proteínas, sobremesas, e alimentos médicos para alimentação por sonda e suplementos nutricionais.

Podem ser incluídos aditivos convencionais nas composições da invenção, incluindo quaisquer dos seleccio-

nados de conservantes, agentes quelantes, agentes efervescentes, edulcorantes naturais ou artificiais, agentes aromatizantes, agentes corantes, agentes de dissimulação do sabor, acidificantes, emulsionantes, agentes espessantes, agentes de suspensão, agentes dispersantes ou molhantes, anti-oxidantes e outros semelhantes.

"Tensão arterial elevada" ou "hipertensão" tal como aqui utilizado refere-se a uma pressão arterial que excede persistentemente 140/90 mmHg (sistólica/diastólica).

Em várias formas de realização da presente invenção, a vitamina K induz a remoção de depósitos de cálcio pré-existentes do mamífero. Os vasos sanguíneos são constituídos por três camadas, chamadas a partir da camada do lado exterior luminal, a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia. A calcificação pode ocorrer em ou numa qualquer destas camadas. Tipicamente, a calcificação do vaso sanguíneo torna a parede do vaso rígida, frágil e sujeita a ruptura. Para efeitos da presente invenção, os vasos sanguíneos incluem capilares, veias, artérias, vênulas e/ou arteríolas.

A calcificação inclui a deposição anormal de cristais de cálcio em sítios no seio e/ou nos vasos sanguíneos. Pode ocorrer calcificação pré-existente em doenças tais como, por exemplo, arteriosclerose em que a placa aterosclerótica que sofreu calcificação pode ocluir parcialmente ou completamente os vasos sanguíneos. Em

várias fases da aterosclerose não só a placa, mas também o tecido vascular que rodeia a placa pode calcificar.

Para o presente pedido, arteriosclerose também inclui a esclerose de Mönckeberg. Outras doenças associadas a calcificação patológica incluem, mas não estão limitadas a calcificação de cartilagem (osteoartrite), calcificação induzida por inflamação (e.g. na doença de Bechterev), calcificação induzida por tumor (frequentemente observada no cancro da mama), calcificação da pele tal como no pseudoxantoma elástico (PXE) e calcifilaxia na insuficiência renal crónica terminal.

Frequentemente as modalidades de tratamento não farmacológico/nutricional para a arteriosclerose envolvem procedimentos com base em cateteres, tais como a angioplastia, que utilizam um cateter inserido numa artéria para pressionar a placa contra as paredes das artérias para aumentar o espaço para o sangue fluir. A colocação de um "stent", normalmente feita após angioplastia, utiliza um tubo de rede de arame colocado na artéria danificada para suportar as paredes arteriais e é utilizado para manter o vaso aberto. Pode ser realizada uma aterectomia quando se utiliza instrumentos inseridos através de um cateter para cortar e retirar placa para que o sangue possa fluir mais facilmente.

Também são realizados procedimentos cirúrgicos para tratar a aterosclerose. Estes incluem endarterectomia ou a remoção do revestimento de uma artéria obstruída com

grandes placas. A arterioplastia, outro tipo de cirurgia, envolve a reparação de um aneurisma utilizando tecido sintético. Também pode ser realizada cirurgia de derivação quando o fluxo sanguíneo é restabelecido utilizando vasos sanguíneos obtidos de diferentes áreas do corpo.

Em várias formas de realização da presente invenção, por administração de vitamina K, a necessidade de tratamento da aterosclerose à base de cateter ou cirúrgico pode ser reduzida ou evitada. Alternativamente, a vitamina K pode ser administrada como parte de um plano de tratamento completo da arteriosclerose com os procedimentos cirúrgicos e/ou à base de cateter para remover a calcificação.

Preferencialmente, há remoção desde cerca de 10% a cerca de 100% de depósitos de cálcio anormais do vaso sanguíneo. O período de tratamento preferido para remoção da calcificação pode ser um mínimo de 6-12 semanas, de preferência pelo menos 6 a 8 meses e mais preferencialmente pelo menos 12 meses ou mais. Em várias formas de realização, o período de tratamento pode ser para toda a vida do indivíduo.

Clinicamente, a calcificação pode ser detectada, por exemplo, por ensaio de stress com tálho, radiografia, varrimentos de calcificações das coronárias, fluoroscopia, CT, angioplastia, imagiologia por MRI, sonografia, biópsia, por histoquímica ou outra semelhante.

O termo "redução da calcificação" ou "calcificação reduzida" inclui diminuir a taxa de calcificação no e/ou sobre o vaso sanguíneo. Tal como aqui utilizado, o termo "inversão da calcificação" inclui a remoção de cálcio pré-existente depositado no e/ou sobre o vaso sanguíneo. Embora o mecanismo não seja completamente compreendido, crê-se que a vitamina K aumenta a MGP (proteína Gla da matriz) para proteger rigorosamente contra mais acréscimo de cálcio, enquanto que outras proteínas ou células (macrófagos, células de músculo liso semelhantes a osteoclastos, ou outras) participam na remoção propriamente dita do cálcio. Alternativamente, os resíduos Gla da MGP (formados sob a influência da vitamina K) têm alguma semelhança estrutural com o EDTA, e podem actuar como tal para dissolver directamente o cálcio. Finalmente, pode ser que a MGP (através dos seus resíduos Gla) se possa ligar directamente aos precipitados de cálcio (como fazem todas as proteínas Gla) e exerça actividade quimio-atractora em relação a macrófagos, que se pensa então que removem os complexos de cálcio-MGP.

Em várias formas de realização da presente invenção, verificou-se que a vitamina K pode ser utilizada para tratar e/ou inverter a arteriosclerose num mamífero. Tipicamente, a arteriosclerose é uma doença das artérias caracterizada por inflamação, invasão de macrófagos, formação de células esponjosas, espessamento da íntima, aumento do colesterol e formação de uma placa aterosclerótica, que com o tempo pode ficar calcificada. O início da arteriosclerose é invariavelmente nas artérias maiores tais

como a aorta e artérias coronárias. Nas fases mais avançadas pode observar-se ruptura da placa levando a oclusão vascular súbita, enfarte do miocárdio e acidente cerebrovascular (enfarte cerebral).

Em várias formas de realização, a vitamina K é administrada a um mamífero que sofre de uma doença cardiovascular pré-existente que requer tratamento. Os mamíferos incluem, por exemplo, seres humanos, bem como animais de estimação tais como cães e gatos, animais de laboratório tais como ratos e murganhos, e animais de exploração, tais como ovelhas, cavalos e vacas.

Tendo já descrito genericamente a invenção, a mesma pode ser entendida mais facilmente através da seguinte referência aos exemplos seguintes, que são apresentados a título ilustrativo e não pretendem limitar a presente invenção salvo se assim especificado.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Estudo clínico para comparar os efeitos da suplementação com vitamina D e vitamina D + vitamina K num grupo de mulheres pós-menopáusicas saudáveis.

Indivíduos

Os participantes foram inscritos num ensaio

clínico duplamente cego controlado por placebo de 3 anos em que foram investigados os efeitos de suplementos contendo minerais, vitamina D e vitamina K sobre a densidade mineral óssea e as características das paredes dos vasos sanguíneos. Os critérios de inclusão foram: mulheres aparentemente saudáveis, caucasianas, entre 50 e 60 anos, e pelo menos dois anos pós-menopáusicas. Os critérios de exclusão foram: utilização de anticoagulantes orais, corticosteróides, terapêutica de substituição hormonal, concentrados vitamínicos ou suplementos alimentares, e consumo de álcool elevado (> 6 copos/dia). No total, 181 mulheres preencheram os critérios de participação e foram randomizadas para o estudo. A informação sobre factores de risco cardiovascular, estado de saúde actual, história médica, uso de drogas e comportamento tabágico foi recolhida antes do início do estudo. Dentro deste ensaio os participantes foram submetidos a exames clínicos nos meses 0, 3, 12, 18, 24 e 36. Os exames vasculares tiveram lugar no início e no final do estudo após 3 anos.

Todos os participantes deram consentimento informado por escrito e o ensaio foi aprovado pela Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário de Maastricht.

Concepção do estudo

Os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente por três grupos. No primeiro grupo (n = 60) os participantes receberam um placebo (maltodextrina), no segundo grupo (n =

58), os participantes receberam um suplemento contendo 500 mg de cálcio (complexo de cálcio natural derivado do leite), 10 mg de zinco, 150 mg de magnésio e 8 µg de vitamina D₃ (minerais + vitamina D = grupo MD), e no terceiro grupo (n = 63) os participantes receberam um suplemento contendo os mesmos componentes que o grupo DM, mas com um adicional de 1 mg de vitamina K₁ (minerais + vitaminas D+K = grupo MDK). Os três tipos diferentes de suplementos tinham aspecto e sabor semelhantes, e os participantes puderam escolher entre um suplemento na forma de um pó insípido (para ser misturado com água antes do consumo) ou na forma de comprimidos revestidos com chocolate com um núcleo de malte crocante. Os participantes foram instruídos a tomar uma saqueta com pó ou três comprimidos por dia ao fim do dia, de preferência após a refeição. Além disso, foram aconselhados a manter as suas dietas habituais e evitar tomar suplementos contendo cálcio, vitamina D ou vitamina K durante dois meses antes e ao longo do estudo. A Novartis Consumer Health SA (Nyon, Suíça) preparou e forneceu todos os suplementos.

A artéria carótida comum direita de cada doente foi investigada. O mesmo investigador realizou todos os exames no início e no final do estudo e para cada participante são feitas diversas medições repetidas (5-7) durante uma sessão. A reprodutibilidade foi avaliada para avaliação da distensão e diâmetro da artéria carótida comum.

Antes do exame vascular, determinou-se o peso e a altura com equipamentos normalizados para estimar o índice de massa corporal (peso/altura²).

Determinações

As medidas dos resultados primários para efeitos deste estudo foram as características da parede dos vasos da artéria carótida comum medida com ultra-sons (ATL Mark V).

O sistema de rastreio ultrassónico das paredes vasculares (WTS) para determinar as propriedades da parede arterial foi descrito em pormenor anteriormente (Hoeks A. P. *et al.*, *Ultrasound Med. Biol.* 1990; 16: 121-8, e Kool M. J. F. *et al.*, *Cardiovascular Research* 1994; 28: 610-614). Este sistema de ultrassons dá estimativas do diâmetro arterial diastólico final (d) e a variação do diâmetro da diástole para a sístole (Δd) normalizado para o diâmetro diastólico final ($\Delta d/d$) para cada batida do coração capturada. Em paralelo com a determinação da alteração do diâmetro, registou-se a pressão arterial ao nível da artéria braquial por meio de um dispositivo oscilométrico semi-automatizado (DINAMAP). A pressão de pulso (Δp), definida como a pressão arterial sistólica menos a diastólica, foi determinada pela média das três determinações mais próximas das medidas de distensão. A partir de d , Δd e Δp , calculou-se a distensibilidade

vascular (DC) e a *compliance* (CC) de acordo com as seguintes equações:

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

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

A espessura média da íntima (IMT) da parede posterior foi medida simultaneamente no mesmo local (2-3 cm proximal à bifurcação) da artéria carótida comum, onde foram medidos o diâmetro e as alterações de diâmetro. No final da sessão, os ficheiros das ITM registadas são processados utilizando o programa de espessura da parede. O limite para a derivada foi mantido em 0,025. Cada batida do coração num registo resultou numa estimativa da espessura da parede; utilizou-se a mediana das estimativas por registo para avaliação futura.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS (SPSS Corp, Chicago, IL). Os resultados são apresentados na forma média \pm desvio padrão (DP), salvo indicação em contrário. Somente os participantes que completaram o estudo foram incluídos na análise. Além disso, foram excluídos da análise os participantes que durante o estudo tinha começado a usar medicamentos que são conhecidos por terem um efeito directo sobre a parede

vascular. Além disso, foram excluídos os participantes com placas ateroscleróticas na artéria carótida comum e uma variabilidade elevada nos resultados (tradução arterial de > 2 mm e variação batimento a batimento na distensão de > 20%).

Um teste t para amostras emparelhadas foi utilizado para avaliar a alteração das características da parede dos vasos ao longo dos três anos dentro de cada grupo. Considerou-se um nível de $p < 0,05$ como sendo estatisticamente significativo. Para cada participante, foi calculada a variação percentual em relação à linha de base de todos os parâmetros e calculada a variação média em relação à linha de base por grupo. A análise de resultados primária consistiu na comparação da alteração em DC, CC, PP e IMT entre o grupo MD e o placebo e entre o grupo MDK e o placebo. A análise de regressão linear foi utilizada com a alteração de parâmetros vasculares em relação à linha de base como variável dependente e os grupos de tratamento e as diversas covariáveis como variáveis explicativas. Os valores de linha de base de idade, BMI, tabagismo (sim ou não), frequência cardíaca e pressão arterial média foram escolhidos como covariáveis, porque a sua influência sobre a modificação das propriedades vasculares ou a resposta à suplementação não puderam ser excluídas.

Parâmetros vasculares de elasticidade

A Tabela 1 pormenoriza as determinações de linha

de base de cada grupo de estudo. A Tabela 2 sumaria por grupo as diferenças entre os valores médios na linha de base e no final do estudo para todos os parâmetros vasculares com seus níveis de significância para amostras emparelhadas. Como era de se esperar, o DC e o CC no grupo do placebo diminuiu significativamente (de 10% e 6%, respectivamente). O PP, por outro lado, aumentou em 7%, mas o aumento não atingiu o nível de significância. No grupo MD, o DC diminuiu significativamente (em 7%) e o CC diminuiu em 4%, enquanto a PP aumentou em 6%; no entanto estas duas últimas alterações não atingiram o nível de significância. No grupo MDK, no entanto, o DC e o CC permaneceram aproximadamente constantes durante o período de três anos, tendo o CC mostrando mesmo uma tendência para aumentar (+3%). A PP manteve-se inalterada durante todo o período de estudo.

As Figuras 1 e 2 (ver também Tabela 3 e Tabela 3a) ilustram a variação percentual do DC e do CC, respectivamente, dos três grupos. Após o ajustamento para a frequência cardíaca basal, pressão arterial média, idade, peso e tabagismo, as alterações no grupo do placebo, em relação ao grupo MDK mantiveram-se estatisticamente significativas e foram: decréscimo de 8,8% da DC (IC de 95%: 1,9-21,4), 8,6% de redução do CC (IC de 95%: 1,8 a 20,3), e aumento de 6,3% da PP (IC de 95%: -17,1 a -0,7). Na mesma análise, não foram encontradas diferenças entre as alterações no grupo do placebo e MD: diminuição de 2,5% do DC (IC de 95%: -14,8 a 6,3), 2,2% de redução do CC (IC de

95%: -13,8 a 6,3), e aumento de 0,11% da PP (IC de 95%: -5,6 a 12,1).

Discussão dos resultados

Os efeitos nocivos sobre as artérias do envelhecimento da população durante um período de três anos são claramente evidentes a partir do grupo de controlo (placebo) e sublinham o quão rapidamente a vasculatura pode entrar em declínio. O médico, consciente da ligação entre a diminuição da elasticidade das artérias e diversas doenças cardiovasculares, reconheceria a partir destes dados que há uma necessidade urgente de encontrar um método de tratamento capaz de combater o declínio rápido da elasticidade arterial, particularmente em mulheres pós-menopáusicas.

O grupo MD, que recebeu um suplemento de vitamina D, não evidenciou qualquer melhoramento nas medidas do envelhecimento da parede vascular em relação ao grupo do placebo. Pode-se concluir que o fornecimento só de vitamina D não é capaz de oferecer benefícios cardiovasculares às mulheres na pós-menopausa que preencham os critérios aplicados no presente estudo.

Em nítido contraste com os grupos do placebo e MD, o grupo MDK mostrou melhoramento relativo significativo em distensibilidade, *compliance* e pressão de pulso durante o período de 3 anos do estudo. Estes resultados demonstram

que o consumo regular de vitamina K, ou da combinação de vitamina K e vitamina D, pode desacelerar e talvez até mesmo inverter o processo de rigidez das artérias. Como consequência da desaceleração do processo de rigidez arterial, a suplementação com vitamina K inevitavelmente tem impacto na incidência de doenças cardiovasculares ligadas à rigidez das artérias, incluindo as relacionadas com aumento da tensão sobre o coração e responsividade reduzida do sistema circulatório a alterações requeridas.

Tabela 1

Características basais (média ± desvio padrão) nos três grupos de tratamento			
Características basais	Placebo (n=40)	Grupo MD (n=30)	Grupo MDK (n=38)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Idade (anos)	54,1 ± 3,0	55,9 ± 2,8*	55,4 ± 2,8
Peso (kg)	69,5 ± 11,9	70,6 ± 11,1	66,3 ± 9,5
Altura (m)	1,65 ± 0,05	1,65 ± 0,07	1,63 ± 0,06
BMI (kg/m ²)	25,6 ± 4,3	26,0 ± 4,4	25,1 ± 3,1
Idade pós-meno-páusica (anos)	4,6 ± 3,7	7,6 ± 5,1**	5,1 ± 4,3
Não fumadores (%)	75,0	73,9	85,0
Diâmetro (µ)	7162 ± 562	7314 ± 582	7173 ± 411
Distensão (µm)	372 ± 118	353 ± 83	332 ± 83
Pressão de pulso (mmHg)	51,9 ± 11,1	52,9 ± 10,1	53,7 ± 14,3
Frequência cardíaca (pulsações/min)	60,8 ± 9,2	63,1 ± 8,9	60,6 ± 6,6
CC (mm ² /kPa)	0,64 ± 0,23	0,61 ± 0,20	0,56 ± 0,17
DC (MPa ⁻¹)	15,8 ± 5,2	14,5 ± 4,0	14,0 ± 4,0
IMT (mm)	0,63 ± 0,11	0,64 ± 0,10	0,61 ± 0,08
* significativamente diferente do placebo (p < 0,05)			
** significativamente diferente do placebo e do grupo MK (p < 0,05)			

Tabela 2

Alteração das características das paredes vasculares (média ± desvio padrão) na população do estudo após 3 anos			
Características das paredes dos vasos	Placebo (n=40) Diferença entre T=0 e T=3 anos (teste t emparelhado)	Grupo MD (n=30) Diferença entre T=0 e T=3 anos (teste t emparelhado)	Grupo MDK (n=38) Diferença entre T=0 e T=3 anos (teste t emparelhado)
Diâmetro (μ)	196±295 (p=0,00)	154±179 (p=0,00)	131±226 (p=0,00)
Distensão (μ m)	-21±61 (p=0,03)	-12,6±47 (p=0,15)	-3,9±49 (p=0,63)
Pressão de pulso (mmHg)	2,7±9,9 (p=0,09)	2,8±10,1 (p=0,14)	-0,18±7,6 (p=0,89)
DC (MPa^{-1})	-1,8±3,4 (p=0,00)	-1,4±3,0 (p=0,02)	-0,39±3,0 (p=0,43)
CC (mm^2/kPa)	-0,05±0,1 (p=0,01)	-0,04±0,11 (p=0,10)	0,01±0,11 (p=0,75)
IMT (mm)	0,05±0,08 (p=0,00)	0,02±0,09 (p=0,32)	0,06±0,06 (p=0,00)
Frequência cardíaca (pulsações/min)	3,0±7,0 (p=0,01)		

Tabela 3

% média de alteração em relação à linha de base das características das paredes dos vasos. (para cada indivíduo a alteração % em relação à linha de base é calculada para cada variável e em seguida é calculada a média destas alterações individuais por cada grupo)			
Características das paredes dos vasos	Placebo (n=40) % de alteração média em relação à linha de base	Grupo MD (n=30) % de alteração média em relação à linha de base	Grupo MDK (n=38) % de alteração média em relação à linha de base
Diâmetro (μ)	2,8% ± 4,1	2,2% ± 2,5	1,8% ± 3,1
Distensão (μ m)	-4,3% ± 15,9	-2,4% ± 13,0	0,3% ± 15,9
Pressão de pulso (mmHg)	6,5% ± 19,7	6,3% ± 30,0	0,2% ± 13,4*
DC (MPa^{-1})	-9,6% ± 21,4	-7,1% ± 18,3	-0,8% ± 21,9*
CC (mm^2/kPa)	-5,9% ± 19,5	-3,7% ± 18,6	2,7% ± 20,4*
IMT (mm)	8,6% ± 13,5	4,0% ± 13,9	9,8% ± 9,8*
*diferença significativa em relação ao placebo após ajustamento quanto à idade, peso, tabagismo, pressão arterial média e ritmo cardíaco (análise de regressão linear Tabela 3a)			

Tabela 3a

Análise de regressão multivariada dos efeitos do grupo MDK e do grupo MD em comparação com o placebo sobre a alteração das características das paredes do vaso após três anos com as seguintes co-variáveis: idade, peso, tabagismo, frequência cardíaca e pressão arterial média da linha de base			
Variáveis	Coeficiente \pm MEP	<u>P</u>	IC 95%
Y = alteração da DC (% em relação à linha de base)			
X = MDK	11,7 \pm 4,8	0,020	1,9 a 21,4
X = MD	4,2 \pm 5,3	0,430	-6,3 a 14,8
Y = alteração da CC (% em relação à linha de base)			
X = MDK	11,1 \pm 4,7	0,019	1,8 a 20,3
X = MD	3,8 \pm 5,0	0,459	-6,3 a 13,8
Y = alteração da PP (% em relação à linha de base)			
X = MDK	-8,9 \pm 4,1	0,034	-17,1 a -0,70
X = MD	-3,3 \pm 4,5	0,0465	-12,1 a 5,6
Y = alteração da IMT (% em relação à linha de base)			
X = MDK	3,0 \pm 3,1	0,345	-3,23 a 9,15
X = MD	-2,4 \pm 3,3	0,476	-8,9 a 4,2

Exemplo 2

Neste exemplo demonstra-se que uma dieta rica em vitamina K induz o desaparecimento de calcificações arteriais pré-existentes. A experiência foi realizada utilizando 48 ratos. Cada ponto nas várias curvas ilustradas nas Figuras 3-6 é a média de seis, que foram sacrificados. A aorta torácica foi dissecada, homogeneizada, e os sais de

cálcio precipitados foram dissolvidos em ácido fórmico. A concentração de cálcio total no extracto foi avaliada por absorciometria atómica, e está expressa em microgramas de cálcio por grama de tecido.

A Figura 3 mostra os dados de 18 ratos numa dieta de controlo (contendo 5 g/g de vitamina K). Seis deles foram mortos na linha de base, seis após 6 semanas e os últimos seis após 12 semanas. Com excepção do cálcio celular, não se observou aumento de cálcio durante o período do ensaio. Os restantes 30 ratos receberam um tratamento de 6 semanas com o antagonista de vitamina K warfarina num protocolo que não influencia a coagulação do sangue, mas afecta sobretudo o estado da vitamina K óssea e vascular. O protocolo utilizado envolve a administração oral de uma mistura de warfarina (3 mg/g de alimento) e vitamina K1 (1,5 mg/g de alimento) e está amplamente explicado em: H. M. H. Spronk et al., Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats, *Journal of Vascular Research* 2003; 40:531-537. Este tratamento é designado como "de baixo teor de K". Seis ratos foram sacrificados após seis semanas de tratamento, e outros seis após 12 semanas de tratamento. Como se pode ver a partir da figura 4, houve um aumento constante de cálcio na parede arterial, que pode ser identificado como precipitados calcificados por histoquímica, em que as artérias foram fixadas em formol tamponado com fosfato a 4% e os tecidos foram completamente seccionados e cada quinta secção foi rastreada quanto a calcificação utilizando coloração de Von

Kossa (30 minutos, 5% de nitrato de prata) (dados não apresentados).

Os outros ratos foram primeiramente tratados durante seis semanas com warfarina. Um grupo de animais foi subsequentemente alimentado com a dieta padrão contendo 5 µg de vitamina K por g de alimento (indicado como "K normal"). Surpreendentemente, a calcificação não parou com a mudança de dieta: a calcificação continuou como na experiência anterior. Aparentemente, a presença de precipitados de cálcio é um iniciador suficiente para continuar a calcificação posterior (ver Figura 5) quando se utiliza uma dieta normal.

Finalmente, utilizou-se dois grupos de seis ratos que tinham recebido o primeiro tratamento de seis semanas com warfarina, e uma dieta rica em vitamina K no segundo período de 6 semanas. Um grupo recebeu uma dieta contendo 100 µg/g de vitamina K₁, o outra uma dieta contendo 100 µg/g de vitamina K₂ (menaquinona-4). Como não houve diferença entre os resultados para K₁ e K₂, apresenta-se as médias de ambos os grupos na figura 6 (designadas como "ricas em K"). As conclusões surpreendentes foram que não foi encontrada uma diferença entre os efeitos da vitamina K₁ e K₂, enquanto que essas diferenças foram encontradas na prevenção da calcificação. Isto pode estar relacionado com a dose relativamente elevada utilizada, e podem ainda ser encontradas eficácias diferentes a partir de experiências de resposta à dose. A constatação mais surpreendente, porém, foi que os cristais de cálcio pré-formados se tinham

dissolvido em grande medida, mesmo neste período relativamente curto de tratamento. Pode-se esperar que após tratamento prolongado todos os precipitados calcificados se vão dissolver pela ingestão elevada de vitamina K. A dose utilizada para dissolver precipitados calcificados na aorta foi 20 vezes a dose normal utilizado (em comparação com a dose diária recomendada em seres humanos). Se extrapolados para seres humanos o consumo efectivo de vitamina K deve portanto ser aumentado de 100 µg/dia para 2 mg/dia. Vão ser iniciadas experiências em que são utilizadas doses mais baixas. No entanto, é provável que possa ser observado um efeito semelhante em doses mais baixas, mesmo tão baixas quanto 1-2 vezes o consumo diário normal. Isto acabou por estar relacionado com a dose relativamente elevada utilizada. A experiência foi repetida com doses cinco vezes mais baixas de K1 e MK-4. Resultou que, em doses de 20 µg/g de alimento, a vitamina K1 não diminuiu significativamente a taxa de calcificação das artérias, resultando num teor de cálcio de 2,8 µg/g de tecido arterial. A suplementação do alimento com quantidades semelhantes de K2 (menaquinona-4), por outro lado, resultou em concentrações de cálcio nos tecidos de 0,8 µg/g de tecido arterial, que era significativamente inferior ao teor de cálcio do tecido antes do tratamento (1,7 µg/g de tecido). A constatação mais surpreendente destas experiências foi a de que os cristais de cálcio pré-formados se tinham dissolvido em grande extensão, mesmo neste período de tratamento relativamente curto. Pode esperar-se que após tratamento prolongado todos os precipitados calcificados se vão dissolver pela ingestão elevada de vitamina K. A dose

utilizada para dissolver precipitados calcificados na aorta era 4-20 vezes a dose normal utilizada (em comparação com a dose diária recomendada em seres humanos). Se extrapolado para seres humanos, o consumo efectivo de vitamina K deve ser assim aumentado de 100 µg/dia para 2 mg/dia para K₁ e 400 µg/dia para K₂. Vão ser iniciadas experiências em que são utilizadas doses ainda mais baixas. É provável que um efeito semelhante possa ser observado em doses mais baixas de vitamina K, mesmo tão baixas como 1-2 vezes o consumo diário normal. Isto vai depender de factores como a absorção de vitamina K uma vez que a vitamina K suplementada sintética é tipicamente melhor absorvida (e.g. 10-20 vezes) do que a vitamina K nutricional (e.g. que pode estar ligada a cloroplastos na matriz alimentar).

Exemplo 3

Noutra experiência foi induzida calcificação vascular em ratos (n = 30) alimentando-os com a dieta descrita anteriormente contendo warfarina (3 mg/g de alimento) e vitamina K₁ (1,5 mg/g de alimento). Estes animais são designados como o grupo W&K. Ratos do grupo controlo (n = 18) não receberam warfarina e receberam uma dose normal de vitamina K₁ (5 µg/g de alimento: ~ 10 vezes a quantidade mínima necessária para a coagulação do sangue ideal). A partir do grupo de controlo, seis ratos foram sacrificados no início da experiência para medir o teor de cálcio da linha de base da aorta abdominal e artéria carótida esquerda. Após seis semanas de tratamento, 6 ratos do grupo

de controlo e 6 ratos W&K foram sacrificados para monitorizar o efeito do tratamento. Os restantes animais do grupo W&K (n = 24) foram subdivididos em quatro grupos de seis ratos para outro tratamento de seis semanas. Um grupo continuou com a dieta W&K, enquanto que a warfarina foi interrompida nos restantes três grupos: um grupo recebeu vitamina K₁ normal (5 µg/g de alimentos), um grupo recebeu dieta rica em vitamina K₁ (100 µg/g de alimento: ~ 200 vezes a dose mínima necessária), e o último grupo recebeu dieta rica em vitamina K₂ (menaquinona-4, 100 µg/g de alimento). Além disso, os restantes 6 ratos do grupo de controlo continuaram a sua dieta durante mais seis semanas. A artéria carótida direita de todos os animais foi dissecada e utilizada para determinar a distensibilidade arterial. Segmentos da artéria (3-4 mm) foram montados num arteriógrafo (Living System Instrumentation, Burlington, EUA) em que o diâmetro arterial pode ser monitorizado continuamente. Ambas as extremidades dos vasos foram canuladas em micropipetas de vidro com 120 a 150 µm de largura e amarradas com dois fios de nylon com espessura de 17 µm. Os segmentos arteriais foram banhados numa câmara de órgãos de 10 mL cheia com soro fisiológico isento de cálcio (composição em mmol/L: NaCl 144, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, 1,2 KH₂PO₄, HEPES 14,9 e glucose 5,5, pH 7,4), que foi mantida a 37°C e gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após a administração de 10 µmol/L de nitroprussiato de Na para garantir vasodilatação máxima, a pressão intra-arterial foi progressivamente aumentada de 10 para 200 mm Hg. A distensibilidade arterial ou a mudança relativa do volume

do lúmen arterial induzida por um determinado aumento de pressão foi calculada por: $\Delta C = \Delta A/A_{n-1} * \Delta P$ (DC = distensibilidade, A = área, P = pressão). A Tabela 4 sumaria a relação pressão-diâmetro das artérias carótidas isoladas durante a vasodilatação máxima (cinco grupos da experiência de 7-12 semanas). Dentro de uma gama de pressão fisiológica (80-120 mm Hg) a distensibilidade arterial era significativamente menor nos grupos W&K e K normal do que nos grupos de controlo e de dieta rica em vitamina K. A 100 mmHg a distensibilidade média era de $0,59 \pm 0,31$, $0,34 \pm 0,09$, $0,41 \pm 0,08$, $0,60 \pm 0,12$ e $0,80 \pm 0,07$ mmHg⁻¹ para o controlo, W&K, K₁ normal, K₁ alta e K₂ alta, respectivamente (significância p <0,02 em comparação com a W&K). A níveis de pressão arterial > 100 mmHg a distensibilidade no grupo K₂ foi substancialmente e significativamente (p <0,01) maior do que em qualquer grupo de K₁ alta ou nos animais de controlo.

Colectivamente, estes resultados indicam que o tratamento W&K aumentou a rigidez arterial e que este só foi revertido pela ingestão de dieta rica em vitamina K e não pela ingestão da dieta com vitamina K normal, e que a K₂ teve um efeito mais pronunciado do que a K₁. Mediu-se a distensibilidade arterial como um parâmetro clínico de elasticidade vascular. A experiência apresentada na Tabela 4 demonstra que a warfarina induziu rigidez da parede dos vasos arteriais. Isto é consistente com o trabalho de Essahili et al. (Essalihi R., Dao H. H., Yamaguchi N., Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension

induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am. J. Hypertens.* 2003; 16:103-10) que mostraram que o tratamento com warfarina resultou em aumentos da pressão de pulso aórtica, pressão de pulso e pressão arterial sistólica. No nosso modelo, vitamina K₁ normal na dieta não foi capaz de afectar a elasticidade vascular. Surpreendentemente, porém, durante a dieta rica em vitamina K (ambos K₁ e K₂) foram restauradas as propriedades vasculares que haviam sido perdidas por calcificação induzida pela warfarina.

Tabela 4

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

Tabela 4: Efeitos do estado de vitamina K sobre as propriedades mecânicas de artérias carótidas isoladas de rato. A relação pressão-diâmetro foi monitorizada para animais no ponto de tempo de 12 semanas, recebendo a dieta

de controlo (n = 6), os da dieta W&K (n = 6), em dieta de vitamina K normal (n = 6) e animais com dieta rica em vitamina K₁ ou K₂ (n = 6 por grupo). O diâmetro arterial é expresso como uma função do aumento da pressão. Os dados são apresentados como a média \pm DP.

O modelo animal que foi utilizado imita a esclerose da média arterial (também conhecida como esclerose de Mönckeberg). A esclerose da média é particularmente comum na diabetes mellitus, insuficiência renal crónica terminal e envelhecimento. É de notar que os doentes com doença renal crónica (DRC) apresentam um risco elevado de doença cardiovascular. Esses doentes frequentemente recebem uma dieta rica em cálcio (para complexar fosfato), vitamina D e warfarina (para prevenir eventos trombóticos). Recentemente demonstrou-se, contudo, que cada um destes tratamentos está associado a um risco aumentado de calcificação arterial. Dado o facto de as calcificações arteriais permitirem prever eventos cardiovasculares, a regressão da calcificação arterial pela ingestão de vitamina K pode ajudar a reduzir o risco de morte em pacientes com DRC e doença arterial coronariana. Evidentemente que esse tratamento só é possível em doentes que não estão a receber tratamento com anticoagulante oral.

Lisboa, 20 de Maio de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização da vitamina K para a preparação de uma formulação farmacêutica ou nutricional para inverter a calcificação de um vaso sanguíneo num mamífero que sofre de calcificação de um vaso sanguíneo, quando administrada ao mamífero uma quantidade eficaz da referida vitamina K para inverter a calcificação do vaso sanguíneo.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a inversão da calcificação de um vaso sanguíneo inclui a remoção dos depósitos de cálcio pré-existentes no e/ou sobre o vaso sanguíneo.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a calcificação de um vaso sanguíneo está associada a uma doença seleccionada do grupo que consiste em arteriosclerose, incluindo a esclerose de Mönckeberg, osteoartrite, calcificação induzida por inflamação, incluindo a doença de Bechterev, calcificação induzida por tumor, calcificação da pele incluindo o pseudoxantoma elástico (PXE) e calcificação na insuficiência renal crónica terminal.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a vitamina K está contida num produto alimentar ou bebida ou num suplemento dietético.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a formulação compreende ainda vitamina D.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a calcificação é da túnica média da aorta ou artéria carótida comum.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a vitamina K compreende vitamina K₁ (filoquinona), vitamina K₂ (menaquinona) ou uma sua associação.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a dosagem diária de vitamina K é 50 µg-2000 µg.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a vitamina D é vitamina D₃ (colecalfiferol).

10. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o mamífero é um ser humano.

11. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a vitamina K é administrada a um mamífero numa toma eficaz de vitamina K₁ de 2 mg/dia ou uma toma eficaz de vitamina K₂ de 400 µg/dia.

Lisboa, 20 de Maio de 2011

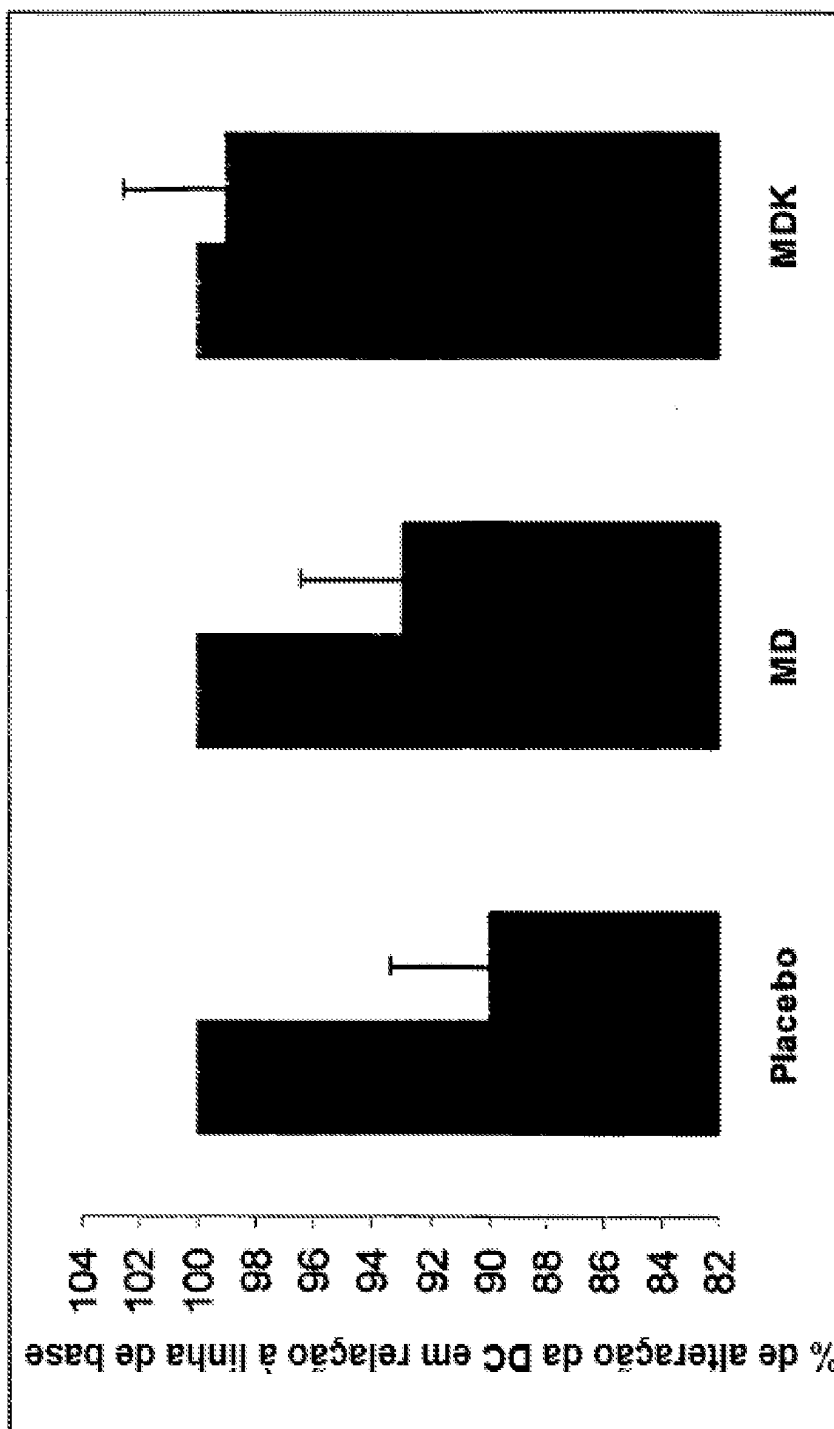


FIG. 1

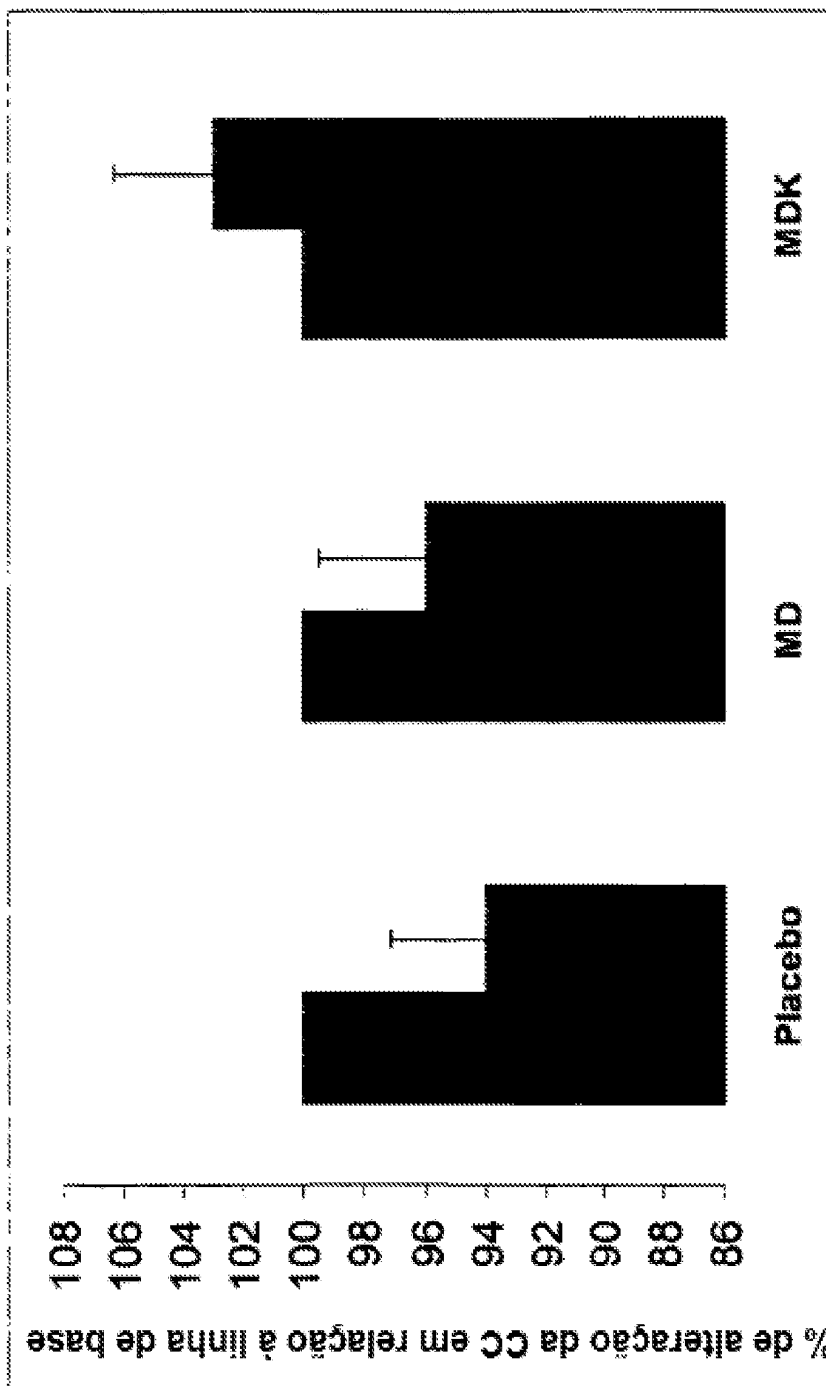


FIG. 2

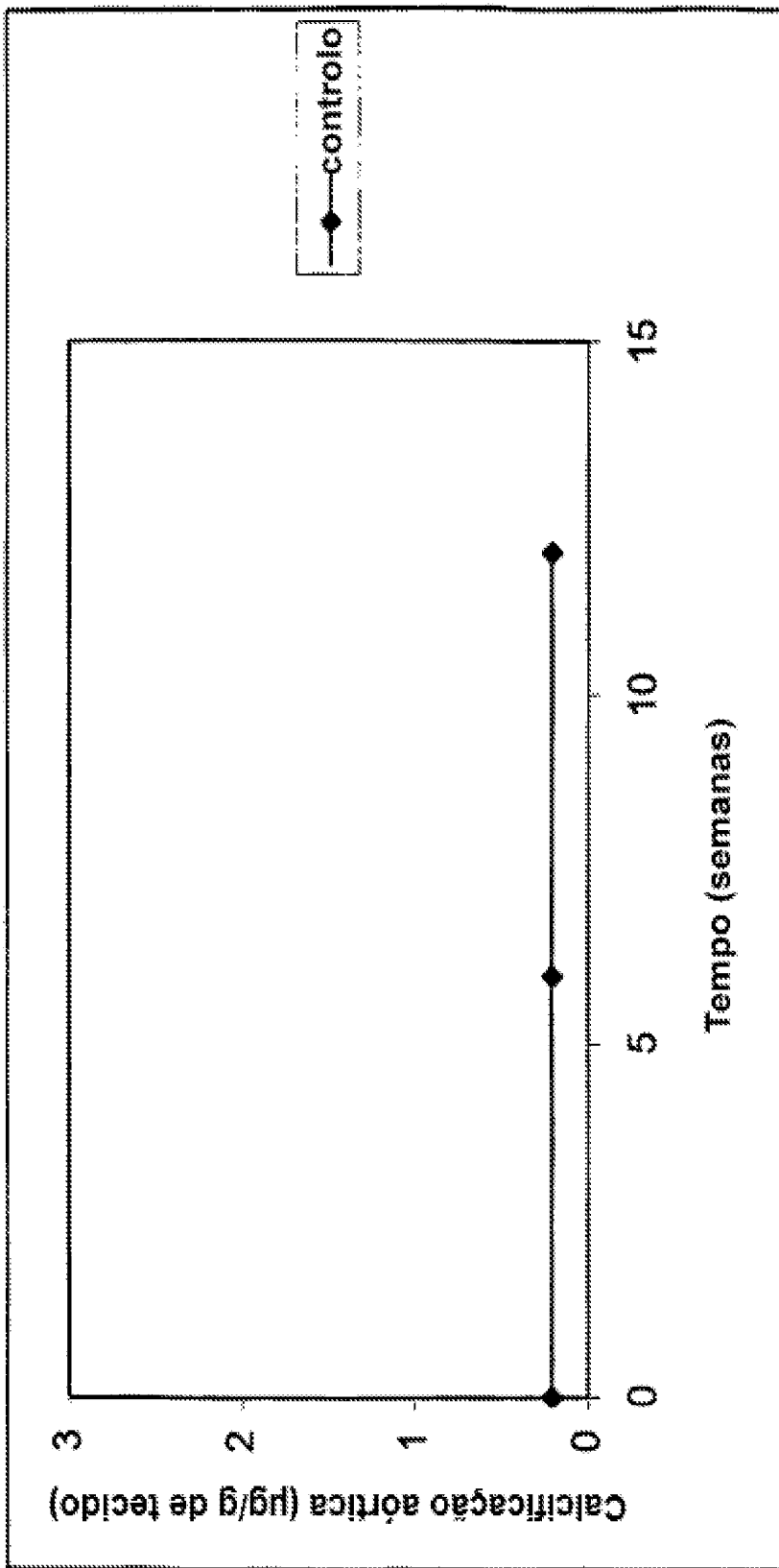


FIG. 3

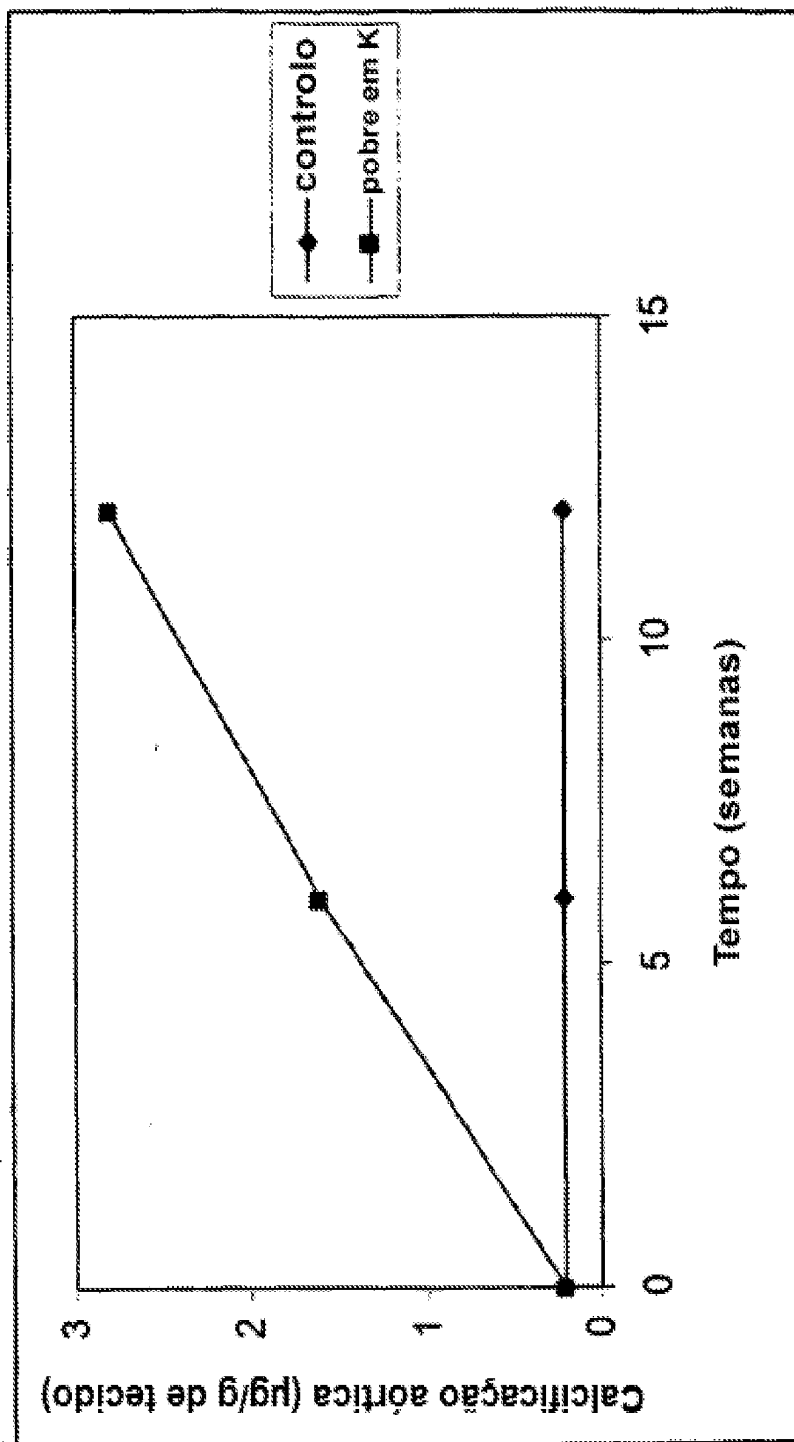


FIG. 4

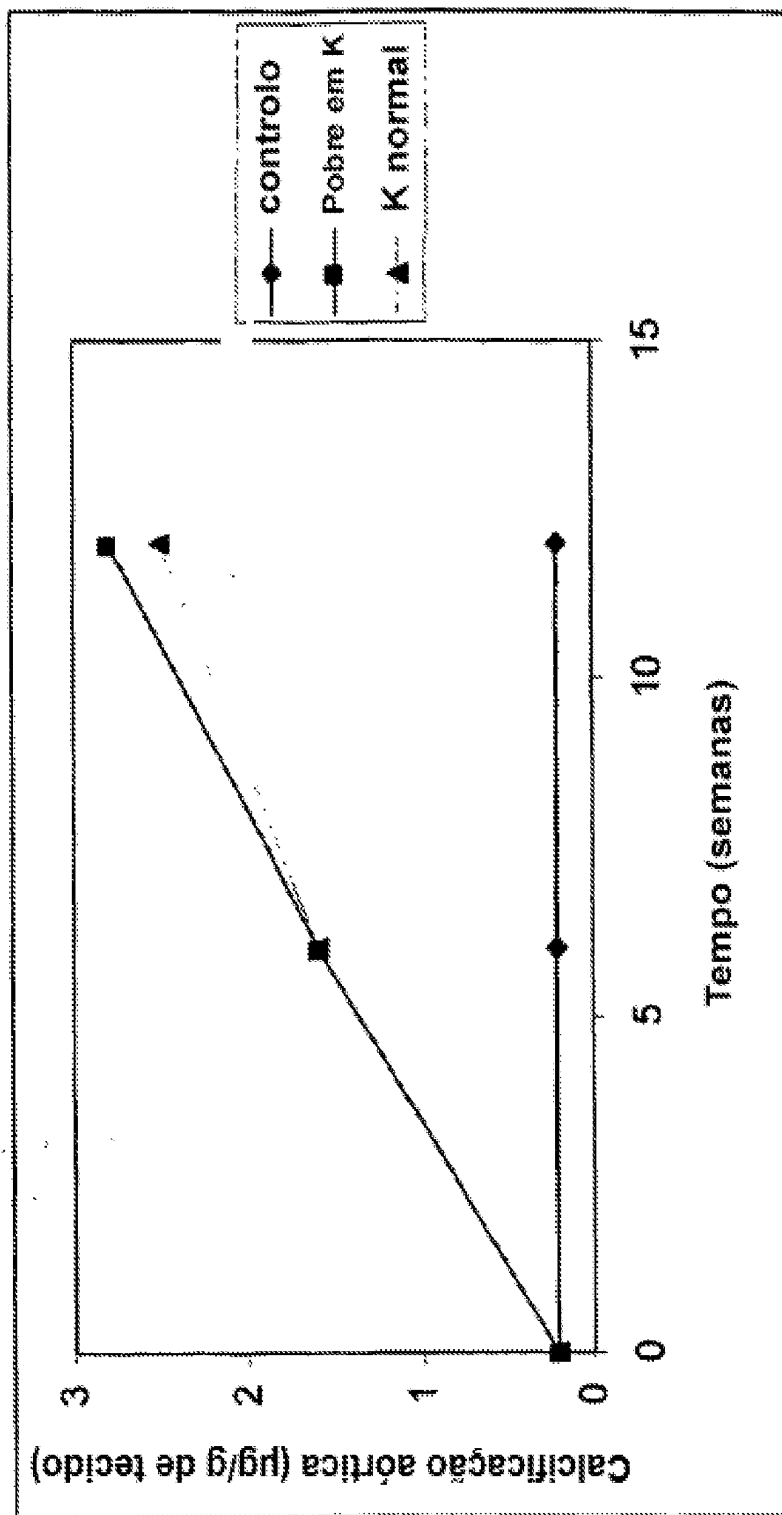


FIG. 5

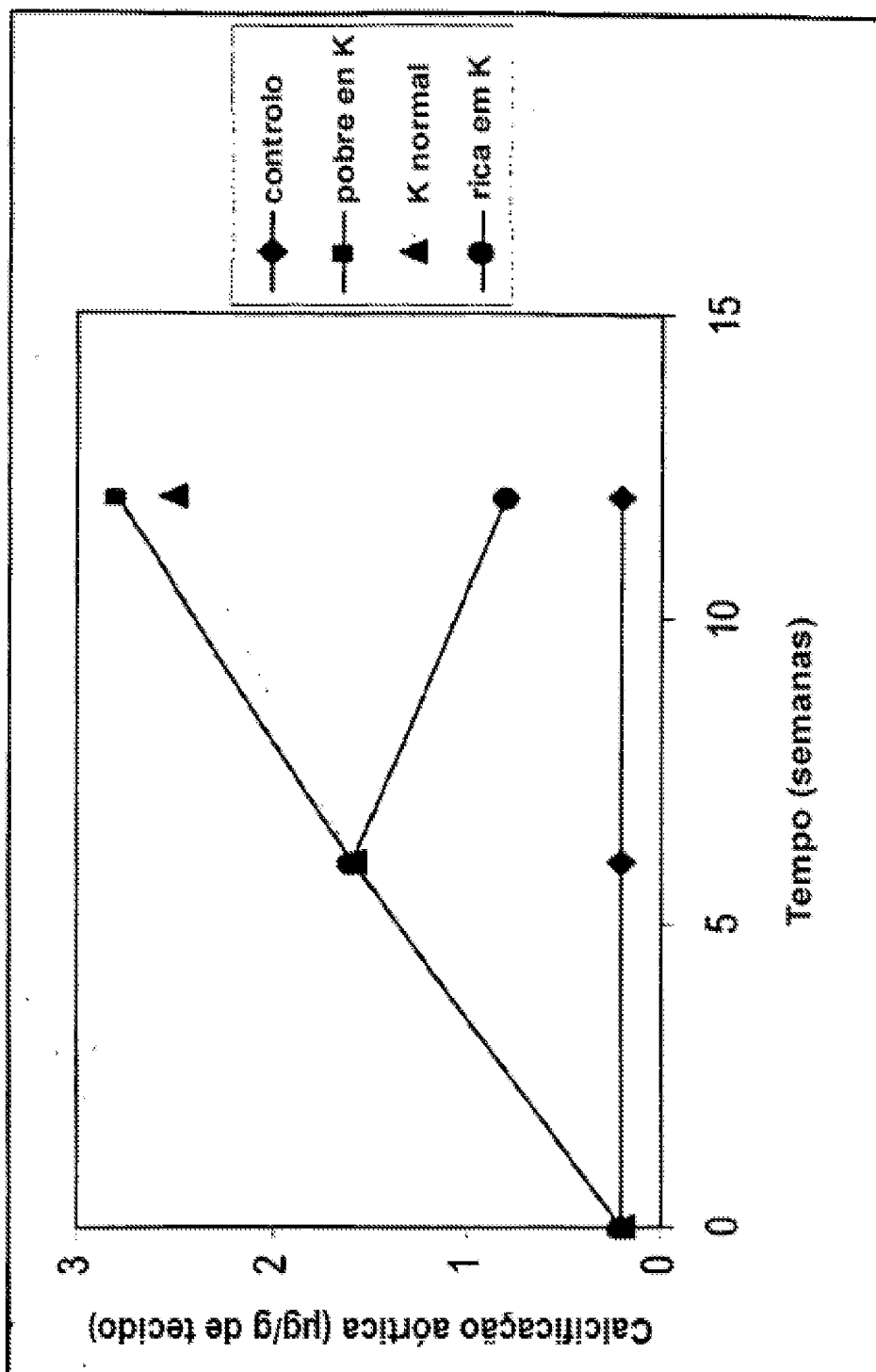


FIG. 6

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- EP 0879394 A
- EP 1153548 A
- WO 2004019823 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- *Jpn. J. Pharmacol.*, 1997, vol. 75, 135-143
- **HOEKS AP et al.** *Ultrasound Med Biol.* 1990, vol. 18, 121-8
- **KOCH MJF et al.** *Cardiovascular Research*, 1994, vol. 28, 610-614
- **H.M.H. SPRONK et al.** Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. *Journal of Vascular Research*, 2003, vol. 40, 534-537
- **ESSALIMI R; DAO HH; YAMAGUCHI N; MOREAU P.** A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens.* 2003, vol. 16, 103-10