

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 019281

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.02.28

(51) Int. Cl. **A61K 31/525 (2006.01)**
A61P 9/12 (2006.01)

(21) Номер заявки
200901145

(22) Дата подачи заявки
2008.02.22

(54) ПРИМЕНЕНИЕ РИБОФЛАВИНА В ЛЕЧЕНИИ ГИПЕРТЕНЗИИ

(31) 0703514.0

(32) 2007.02.23

(33) GB

(43) 2010.02.26

(86) PCT/EP2008/001437

(87) WO 2008/101724 2008.08.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ОЛЬСТЕР;
УЭСТЕРН ХЕЛС ЭНД СОШИАЛ
КЕА ТРАСТ (GB); ДЗЕ ПРОВОСТ,
ФЕЛЛОУС ЭНД СКОЛАРС ОФ ДЗЕ
КОЛЛИДЖ ОФ ДЗЕ ХОУЛИ ЭНД
АНДИВАЙДЕД ТРИНИТИ ОФ КВИН
ЭЛИЗАБЕТ НИЭР ДУБЛИН (IE)

(72) Изобретатель:
Уорд Мэри, Макналти Хелен, Хориган
Джералдин, Стрейн Шон (GB), Скотт
Джон (IE), Первис Джон (GB)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Пивницкая Н.Н.,
Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б.,
Каксис Р.А., Комарова О.М., Белоусов
Ю.В. (RU)

(56) MCNULTY HELENE ET AL.: "Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for the MTHFR 677C→T polymorphism", CIRCULATION, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS, TX, US, vol. 113, no. 1, 3 January 2006 (2006-01-03), pages 74-80, XP009098142, ISSN: 0009-7322, the whole document

MUDA PIIBI ET AL.: "Homocysteine and red blood cell glutathione as indices for middle-aged untreated essential hypertension patients", JOURNAL OF HYPERTENSION, vol. 21, no. 12, December 2003 (2003-12), pages 2329-2333, XP009098148, ISSN: 0263-6352, the whole document

HUSTAD STEINAR ET AL.: "Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: Effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 46, no. 8, Part 1, August 2000 (2000-08), pages 1065-1071, XP002475249, ISSN: 0009-9147, the whole document

UELAND P.M. ET AL.: "Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism", TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARD, GB, vol. 22, no. 4, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 195-201, XP004231954, ISSN: 0165-6147, the whole document

WO-A-8002799

FROSST P. ET AL.: "A CANDIDATE GENETIC RISK FACTOR FOR VASCULAR DISEASE: A COMMON MUTATION IN METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE", NATURE GENETICS, NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 1, May 1995 (1995-05), pages 111-113, XP000198175, ISSN: 1061-4036, cited in the application, the whole document

(57) Изобретение предлагает применение рибофлавина в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гомозиготного или гетерозиготного на MTHFR C677T полиморфизм. Изобретение также предлагает фармацевтический продукт для лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гомозиготного или гетерозиготного на MTHFR C677T полиморфизм, включающий фармацевтически эффективное количество антигипертензивного агента и рибофлавина, и изобретение дополнительно предлагает способ лечения такого пациента, включающий введение рибофлавина.

B1

019281

019281
B1

Настоящее изобретение касается применения рибофлавина в лечении гипертензии в генотипспецифичной популяции.

Гипертензия, обычно обозначаемая как высокое артериальное давление, является медицинским состоянием, при котором артериальное давление повышено, как правило, хронически повышенено. Гипертензия любой этиологии - один из главных факторов риска для развития сердечно-сосудистой болезни (CVD), которая включает заболевание сердца и инсульт.

Было обнаружено, что существует повышенный риск развития CVD у особ, гомозиготных на часто встречающийся полиморфизм C677T в генном кодировании для фермента 5, 10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR). MTHFR требуется для формирования 5-метилентетрагидрофолата, который в свою очередь необходим для преобразования гомоцистеина в метионин. У людей, которые являются гомозиготными на MTHFR C677T полиморфизм (генотип TT), как полагают, существует значительно более высокий риск развития заболевания сердца и инсульта, чем у людей с геном дикого типа (генотип CC). У людей, которые являются гетерозиготными на полиморфизм (генотип CT), может также существовать умеренно более высокий риск развития заболевания сердца и инсульта. Существуют различные антигипертензивные препараты (например, ингибиторы АПФ, бета-блокаторы и мочегонные средства) для снижения артериального давления у пациентов, которые по клиническим показаниям имеют гипертензию. Однако у этих препаратов могут быть нежелательные побочные эффекты и у некоторых пациентов может сохраняться гипертензия, несмотря на попытки применять больше чем один тип антигипертензивного препарата.

Было обнаружено, что рибофлавин (витамин B2) обладает существенным понижающим систолическое и диастолическое артериальное давление эффектом, в особенности у пациентов CVD, гомозиготных на MTHFR C677T полиморфизм.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предлагается применение рибофлавина в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гомозиготного или гетерозиготного на MTHFR C677T полиморфизм.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предлагается фармацевтический продукт для лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента - гомозиготного или гетерозиготного на MTHFR C677T полиморфизм, включая фармацевтически эффективное количество антигипертензивного агента и рибофлавина, для одновременного, отдельного или последовательного введения.

Подходящие антигипертензивные агенты включают ингибиторы АПФ, такие как хинаприл, каптоприл, лизиноприл, беназеприл, периндоприл, еналаприла малеат, трандолаприл, рамиприл и цилазаприл; бета-блокаторы, такие как атенолол, тертатолол, метопролола тартрат, бисопролола фумарат, небиволол, целипролол и пиндолол; антагонисты Ca^{++} , такие как нифедипин, дилтиазем, амлодипин, верапамил и фелодипин; альфа-блокаторы, такие как метилдопа, доксазозин, клонидин и празозин; антагонисты ангиотензина II, такие как ирбесартан, кандесартана цилекстил, олмесартана медоксомил, валсартан, лосартан, телмисартан и епросартана мезилат; альфа/бета-блокаторы, такие как карведилол и лабеталол; и мочегонные средства, такие как бендрофлуметиазид, пиретанид, хлорталидон и гидрохлоротиазид (HCTZ).

Преимущества изобретения включают следующие:

рибофлавин может применяться для уменьшения артериального давления в отсутствие любых других антигипертензивных агентов;

при применении других антигипертензивных веществ с рибофлавином одновременно, отдельно или последовательно количество других антигипертензивных агентов, необходимое для оказания необходимого эффекта, может быть выгодно уменьшено, то есть меньшее количество агентов может требоваться для осуществления лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, таким образом минимизируя любые нежелательные побочные эффекты стандартных антигипертензивных агентов.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предлагается способ лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гомозиготного или гетерозиготного на MTHFR C677T полиморфизм, способ, включающий введение рибофлавина пациенту.

Лекарственное средство или продукт изобретения предпочтительно находятся в форме, подходящей для перорального или парентерального введения. Подходящие пероральные формы дозирования включают таблетки, капсулы (включая капсулы замедленного высвобождения), пилюли, порошки, гранулы и т.п. Парентеральное введение включает, например, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, интраназальное, интравезикальное (то есть в мочевой пузырь), интрафермальное, наружное или под кожное введение. Подходящие парентеральные формы дозировки включают стерильные инъекционные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для подготовки стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Предпочтительный путь введения - пероральный.

Рибофлавин можно вводить вместе с фармацевтически совместимым или приемлемым носителем, подходящим для перорального или парентерального введения, выбранным согласно конкретно используемому типу введения. Для перорального введения рибофлавин можно вводить с одним или нескольки-

ми твердыми неактивными компонентами для подготовки подходящих пероральных форм дозировки. Например, рибофлавин можно вводить по крайней мере с одним вспомогательным веществом, таким как наполнители, связывающие вещества, гигроскопические вещества, агенты для распадаемости, замедлители растворения, акселераторы всасывания, смачивающие агенты, абсорбенты или лубриканты. Для парентерального введения рибофлавин можно вводить с подходящим носителем или разжижителем, таким как вода, этанол, соляной раствор, водная декстроза (глюкоза) и подобные растворы сахаров, глицерин или гликоль, такой как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Во всех случаях доза рибофлавина будет в пределах диетических референтных уровней до максимального уровня включительно, который, как полагают, является безопасным. Хотя в отличие от многих других питательных веществ никакой официальный верхний переносимый уровень не был установлен для рибофлавина, он, как вообще полагают, является безопасным даже в очень высоких дозах с доказательством, показывающим, что уровни до 500 мг/сутки переносятся без неблагоприятных воздействий. Это сравнивается с рекомендуемыми диетическими уровнями рибофлавина для взрослых, которые колеблются от 1,1 до 1,8 мг/сутки. Лекарственное средство или продукт наиболее предпочтительно формулируется для введения рибофлавина пациенту в количестве, составляющем приблизительно 1,6 мг/сутки. Однако лекарственное средство или продукт могут быть сформулированы для введения рибофлавина пациенту в любой другой подходящей дозе, больше или меньше 1,6 мг/сутки. Например, подходящая доза может составлять приблизительно от 0,5 до 50 мг/сутки, предпочтительно приблизительно от 0,75 до 20 мг/сутки, более предпочтительно приблизительно от 1 до 10 мг/сутки, более предпочтительно приблизительно от 1,2 до 5 мг/сутки, еще более предпочтительно приблизительно от 1,4 приблизительно до 5 мг/сутки.

У изобретения есть применение в области индивидуализированного питания. Возрастает интерес к ген-нутриционным взаимодействиям и с большей доступностью генетического профилирования, в последние годы появляется рынок для индивидуализированного питания.

Этот подход основан на представлении, что диетические требования должны учитывать не только общие факторы, такие как возраст и пол, но также и генетические факторы, которые являются специфичными для пациента. Например, пациент мог бы проверить свой генотип MTHFR и затем продолжить принимать низкодозированный рибофлавин, особенно, если у него, как обнаружено, генотип CT или TT.

У изобретения также есть применение в дизайне клинических исследований препарата, например, тестирующих новые антигипертензивные препараты. Для благоприятного исхода и правильной интерпретации таких исследований будет важно, чтобы пациенты с генотипом TT для MTHFR C677T полиморфизма в комбинации с низким статусом рибофлавина были стратифицированы и рандомизированы одинаковым образом в разные группы лечения.

Пример 1. Пациенты с CDV.

Материалы и методы.

Набор пациентов.

Этическое одобрение было получено у Этического Комитета по исследованиям Университета Ольстера и больницы Altnagelvin Hospital Trust, Лондондерри, Северная Ирландия. Пациенты с преждевременной CVD, мужчины в возрасте 55 лет и женщины в возрасте 65 лет и во время явления были набраны из отделения сердца больницы Altnagelvin. Пациенты имели предыдущий инфаркт миокарда (ИМ) или стенокардию, диагностированную изменениями на ЭКГ. Потенциальным участникам ($n=404$) провели скрининг на генотип MTHFR на основании образца мазка со щеки. Были идентифицированы пациенты с генотипом TT ($n=54$); их возраст и пол были подобраны по подобному количеству пациентов с генотипами CC или CT, что привело к получению в общей сложности 197 пациентов, которых пригласили принять участие в текущем интервенционном исследовании (см. фиг. 1). Критерии исключения для всех пациентов включали наличие в анамнезе заболевания печени или почек, потребителей В-витаминных добавок, пациентов, которые принимают препарат, который, как известно, препятствует метаболизму фолата, по крайней мере 3 месяца после ИМ до отбора пробы крови. Все добровольцы предоставили письменное информированное согласие и заполнили анкету о состоянии здоровья и медицинском состоянии/образе жизни, которая включала вопросы относительно семейного анамнеза CVD и привычки курить.

Дизайн исследования.

Исследование представляло собой 16-недельное плацебо-контролированное интервенционное исследование. Пациенты были стратифицированы на основании своего начального скрининга на плазменный гомоцистеин в пределах каждой группы генотипа и впоследствии рандомизированы в пределах каждой страты для получения или рибофлавина (1,6 мг/сутки) или плацебо, как обозначено на фиг. 1. В попытке максимизировать соблюдение режима пациентам предоставляли рибофлавин каждые 4 недели в 7-дневных упаковках для пилюль и просили возвращать любые неиспользованные пилюли, которые были зарегистрированы. Образцы крови были собраны не натощак при скрининге и после интервенции или в больнице Altnagelvin, на рабочем месте или в собственном доме пациентов.

Артериальное давление и антропометрические измерения.

Измерения артериального давления регистрировались как среднее из двух отдельных измерений, сделанных с интервалом в 15 мин при помощи электронного аппарата для измерения артериального дав-

ления Omron 705CP (Medisave, Дорсет, Великобритания). Вес (кг) и рост в (м) использовались для вычисления BMI (вес (кг)/рост² (м)). Окружность талии (см) также была измерена. Все измерения были сделаны с помощью одобренного оборудования Seca (Brosch Direct, Ltd., Питерборо, Великобритания).

Сбор образцов.

Один образец крови, составляющий 30 мл, был взят у каждого пациента, одна пробирка EDTA на 9 мл для плазмы и промытые эритроциты, одна пробирка EDTA на 4 мл для подготовки лизатов эритроцитов и измерения гемоглобина (HB) и упакованный объем клеток (PCV); одна пробирка разделения сыворотки на 8 мл для экстракции сыворотки, одна пробирка разделения сыворотки на 5 мл для анализа липидного профиля и одна пробирка с цитратом натрия на 4 мл для скрининга коагуляции. 9 мл EDTA немедленно обернули в оловянную фольгу и поместили на лед. Образцы центрифугировали в течение 2 ч после отбора при 3000 об/мин в течение 15 мин. Плазма была отобрана и хранилась при -80°C для анализа гомоцистеина в плазме и PLP. Лейкоцитный слой отобрали для подтверждения генотипирования MTHFR и хранили при -20°C. Остающиеся эритроциты были трижды промыты раствором фосфатного буфера (PBS), супернатант и остающийся лейкоцитный слой отбрасывали после каждой промывки. Промытые эритроциты были отобраны и хранились при -80°C для анализа EGRac (функциональный индикатор статуса рибофлавина). Сыворотка была отобрана и хранилась при -80°C для определения сывороточного фолата.

Биохимический анализ.

Плазменный гомоцистеин измерялся иммунохимическим определением с использованием анализатора Abbott Imx (Leino A., 1999, "Fully automated measurement of total homocysteine in plasma and serum on the Abbott IMx analyzer", Clin. Chem, 45, 569-71). Концентрации сывороточного фолата и эритроцитарного фолата были определены микробиологическим определением с помощью криозамороженного метода микротитровального планшета (Molloy et al., 1997, "Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method", Methods Enzymol, 281, 43-53). Плазменный PLP определялся обратнофазной высокоеффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с обнаружением флюoresценции (Bates et al., 1999, "Plasma pyridoxal phosphate and pyridoxic acid and their relationship to plasma homocysteine in a representative sample of British men and women aged 65 years and over", British Journal of Nutrition, 1, 191-201). Идентификация генотипа MTHFR C677T была выполнена с использованием амплификации полимеразной цепной реакцией (ПЦР), сопровождаемой HinF1 (Frosst et al., 1995, "A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase", Nat. Genet, 10, 111-113). Статус рибофлавина был определен на основе EGRac, функционального исследования, посредством которого была измерена активность глутатонредуктазы с добавлением FAD и без него. EGRac был затем вычислен как соотношение стимулируемой FAD к нестимулируемой активности фермента (Powers et al., 1983, "The relative effectiveness of iron and iron with riboflavin in correcting a microcytic anaemia in men and children in rural Gambia", Hum Nutr. Clin. Nutr, 37, 413-425), и значения >1,3, в общем, рассматривались как отражающие подоптимальный статус рибофлавина. Скрининг коагуляции был измерен ACI Instrumentation Laboratories. HB и PCV были измерены с использованием анализатора Sysmex XE-2100 (Sysmex, UK Ltd. Milton Keynes Великобритания) и липидные профили были определены с использованием анализатора Abbott Architect CI 8200 (Abbott Laboratories, США). Для всего исследования образцы были проанализированы слепым способом, в двойном повторении и в течение 1 года после сбора. Контроль качества был обеспечен повторным анализом хранящихся партий объединенных промытых эритроцитов (для EGRac), плазмы для гомоцистеина и PLP и сыворотки для фолата, охватывающая широкий диапазон значений.

Статистический анализ.

Весь статистический анализ был выполнен с использованием статистического пакета SPSS для социальных наук (версия 11,0, SPSS UK Ltd., Chersey, Великобритания). Для нормализации переменные были преобразованы в логарифм соответствующим образом до статистического анализа. Односторонний тест ANOVA с post-hoc тестом Тьюки использовался для изучения различий в исходных характеристиках среди групп генотипов. Категорические данные были оценены с использованием анализа по критерию хи-квадрат. Анализ корреляции был выполнен с использованием двумерных коэффициентов корреляции Пирсона. Эффект интервенции рибофлавина в пределах каждой генотипной группы был исследован с использованием спаренных t-тестов. Р величины <0,05 считались значимыми.

Результаты Описание чертежей

Фиг. 1 показывает блок-схему дизайна исследования;

фиг. 2(i) показывает концентрацию гомоцистеина (мкмоль/л) по группе генотипа MTHFR среди здоровых добровольцев; фиг. 2(ii) показываетsistолическое артериальное давление (mmHg) по группе генотипа MTHFR среди здоровых добровольцев и фиг. 2(iii) показываетдиастолическое артериальное давление (mmHg) по группе генотипа MTHFR среди здоровых добровольцев. Значения на фиг. 2(i), 2(ii) и 2(iii) средние (стандартные планки погрешностей). Различные буквы обозначают статистически значимые различия между группами генотипов MTHFR, тест ANOVA с post-hoc тестом Тьюки, P <0,05 значимо. На фиг. 2 (i)-2 (iii) буква "a" обозначает значения, которые значительно не отличаются от других зна-

чений "а", и буква "б" обозначает значения, которые значительно не отличаются от других значений "б", но которые действительно отличаются от значений, обозначенных как "а";

фиг. 3(i) показывает концентрацию гомоцистеина (мкмоль/л) по группе генотипа MTHFR среди пациентов с преждевременной CVD; фиг. 3(ii) показывает систолическое артериальное давление (mmHg) по группам генотипов MTHFR среди пациентов с преждевременной CVD и фиг. 3(iii) показывает диастолическое артериальное давление (mmHg) по группам генотипов MTHFR среди пациентов с преждевременной CVD. Значения на фиг. 3(i)-3(iii) средние (стандартные планки погрешностей). Различные буквы обозначают статистически значимые различия между группами генотипов MTHFR, тест ANOVA с post-hoc тестом Тьюки, $P < 0,05$ значимо. На фиг. 3 (i)-3 (iii) буква "а" обозначает значения, которые значительно не отличаются от другого значения "а", и буква "б" обозначает значения, которые значительно не отличаются от других значений "б", но которые действительно отличаются от значений, обозначенных как "а". Буквы "аб" обозначают значения, которые значительно не отличаются от значения, обозначенного как "а" или "б".

Исходные данные у здоровых людей.

Что касается фиг. 2, относительно уровней гомоцистеина в крови, у фенотипа, наблюдаемого для здоровых людей, гомозиготных на полиморфизм MTHFR C677T (то есть генотип TT), была повышена концентрация гомоцистеина в крови по сравнению с генотипами CT или CC. Относительно соответствующих уровней артериального давления было обнаружено, что у здоровых людей с генотипом TT не отмечалось никакого повышения систолического или диастолического артериального давления по сравнению со значениями у генотипов CT или CC, как показано на фиг. 2.

Исходные данные у пациентов с преждевременной CVD.

Пациенты с преждевременной CVD, в общем, определяются как пациенты, у которых развивается CVD до достижения возраста 55 для мужчин или до достижения возраста 65 для женщин. Что касается фиг. 3, пациенты с преждевременной CVD и с генотипом TT имели повышенную концентрацию гомоцистеина в крови по сравнению с CC и с CT пациентами. Следует отметить, пациенты TT, как также обнаружено, имели значительно повышенное систолическое и диастолическое артериальное давление, как показано на фиг. 3, по сравнению с пациентами CC. У людей CT, как обнаружено, были промежуточные уровни диастолического артериального давления по сравнению с пациентами CC и TT (как показано на фиг. 3). Эти результаты неожиданны, поскольку здоровые пациенты TT не демонстрировали повышения артериального давления по сравнению с другими генотипными группами. Все пациенты принимали один или несколько антигипертензивных препаратов во время выборки, как обозначено в табл. 1 ниже, но из фиг. 3 очевидно, что препарат был относительно неэффективен в группе генотипа TT.

Таблица 1

Антигипертензивные препараты, принимаемые пациентами ($n=161$) во время отбора

Антигипертензивный препарат	% пациентов
Бетаблокаторы	38
Ингибиторы АПФ	18
Блокаторы кальциевых каналов	6
Мочегонные средства	3
Ингибиторы АПФ + Бетаблокаторы	18
Ингибиторы АПФ + Мочегонные средства	4
Ингибиторы АПФ + блокаторы кальциевых каналов	1
Бетаблокаторы + блокаторы кальциевых каналов	2
Бетаблокаторы + Мочегонные средства	6
Блокаторы кальциевых каналов + Мочегонные средства	0,6
Ингибиторы АПФ + Блокаторы кальциевых каналов+ Мочегонные средства	0,6
Бетаблокаторы + Блокаторы кальциевых каналов+ Мочегонные средства	0,6

Исходные характеристики пациентов с преждевременной CVD, сортированные в соответствии с их генотипом MTHFR (TT, CT или CC), показаны в табл. 2 ниже. Что касается табл. 2, наблюдалось, что пациенты TT имели значительно повышенное систолическое и диастолическое артериальное давление по сравнению с пациентами CC. У пациентов CT, как обнаружено, отмечались промежуточные значения диастолического артериального давления. Следует отметить, на повышенные уровни артериального давления, обнаруженные у пациентов TT, оказывал значительное влияние статус рибофлавина; пациенты с комбинацией генотипа TT и низкого статуса рибофлавина, как неожиданно обнаружено, имели выражено повышенное артериальное давление.

Таблица 2

Исходные характеристики пациентов с преждевременной сердечно-сосудистой болезнью, разделенные по генотипу MTHFR 677C→T

	Генотип MTHFR				
	Все (n=197)	CC (n = 67)	CT (n = 76)	TT (n = 54)	P
Общие характеристики					
Возраст на данный момент (г)	53,2 (5,8)	53,4 (6,1)	52,6 (5,0)	54,0 (6,4)	0,382
Возраст во время явления (г)	46,9 (6,1)	47,1 (5,6)	46,9 (5,4)	47,1 (7,5)	0,891
Мужчина (%)	75,1	78,1	69,7	78,2	0,303
Семейный анамнез CVD (%)	68,0	68,7	65,8	70,4	0,763
Семейный анамнез преждевременной CVD (%)	41,6	40,3	50,0	31,5	0,127
Курильщик на данный момент (%)	32,0	31,3	27,6	38,9	0,209
Индекс массы тела (kg/m ²)	29,1 (4,6)	29,3 (4,8)	28,7 (4,5)	29,3 (4,5)	0,724
Окружность талии (см)	95,1 (12,1)	96,3 (11,9)	94,2 (11,4)	95,0 (13,4)	0,625
Протромбиновое время (сек)	13,9 (3,1)	13,7 (2,8)	14,1 (3,4)	13,6 (2,3)	0,700
Концентрация фибриногена (г/л)	3,93 (0,92)	3,93 (0,84)	3,97 (1,05)	3,88 (0,83)	0,853
Общий холестерин (ммоль/л)	4,5 (0,9)	4,4 (0,81)	4,5 (0,8)	4,5 (1,0)	0,849
Статус витамина В					
Плазменный гомоцистеин (нмоль/л)	10,9 (5,3)	9,8 (3,3) ^a	10,5 (3,9) ^{ab}	12,8 (8,0) ^b	0,007
EGRac	1,38 (0,20)	1,37 (0,17)	1,39 (0,22)	1,37 (0,19)	0,854
Эритроцитарный фолат (нмоль/л)	959 (455)	1030 (518) ^a	1011 (400) ^a	796 (408) ^b	0,009
Пиридоксальфосфат (нмоль/л) (B-6)	61,0 (37,0)	68,0 (35,0) ^a	63,2 (40,4) ^{ab}	49,4 (32,0) ^b	0,017
	Все	CC	CT	TT	P
Артериальное давление					
Систолическое артериальное давление (mmHg)	135,0 (19,6)	131,1 (18,0) ^a	133,0 (19,7) ^a	142,8 (19,5) ^b	0,002
По статусу рибофлавина:					
Более низкий статус рибофлавина	137,1 (20,5)	131,2 (20,4) ^a	135,8 (19,0) ^a	147,4 (19,8) ^b	0,005
Более высокий статус рибофлавина	132,5 (18,5)	131,0 (14,8)	129,6 (20,4)	138,6 (19,2)	0,172
Диастолическое артериальное давление (mmHg)	83,0 (12,2)	80,3 (12,5) ^a	83,3 (11,5) ^{ab}	86,0 (12,3) ^b	0,038
По статусу рибофлавина:					
Более низкий статус рибофлавина	84,1 (12,8)	80,8 (13,5)	84,6 (11,8)	88,1 (12,7)	0,076
Более высокий статус рибофлавина	81,7 (11,4)	79,6 (11,2)	81,9 (11,1)	84,1 (12,2)	0,381

Значения представлены как средние (SD). Значения среди групп генотипов сравнивались, используя односторонний тест ANOVA с post-hoc тестом Тьюки. Сокращения: MTHFR, метилентетрагидрофолат-редуктаза; коэффициент активации эритроцитарной глутатионредуктазы (статус рибофлавина, более высокое значение EGRac указывает на более низкий статус витамина); "Более высокий" и "более низкий" статус рибофлавина был определен с использованием медианного значения EGRac в пределах каждой группы генотипа как сокращение.

Интервенционные данные у пациентов с преждевременной CVD.

Обращаясь к табл. 3 ниже, в плацебо-контролированном интервенционном исследовании при участии 181 пациента с преждевременной CVD существенное снижение и систолического, и диастолического артериального давления у пациентов с генотипом TT было достигнуто после 16 недель введения низкодозированного рибофлавина. Показанный ответ артериального давления имеет и статистическое, и клиническое значение. Величина снижения артериального давления (уменьшение на 11 единиц систолического и 8 диастолического артериального давления), наблюдаемая в ответ на рибофлавин, может оцениваться на основании мета-анализа как снижающая риск болезни сердца на 29% и инсульта - на 46%. Результаты показывают, что значимое и клинически важное снижение артериального давления было достигнуто в ответ на рибофлавин специфично у пациентов с генотипом TT. Обращаясь снова к табл. 3, никакого существенного снижения артериального давления (ни систолического, ни диастолического) не наблюдалось у пациентов CC после введения рибофлавина.

Таблица 3

Ответ на интервенцию рибофлавина в течение 16 недель у пациентов с преждевременной CVD

	MTHFR Генотип					
	Плацебо СС (n = 32)			Рибофлавин СС (n = 32)		
	Перед	После	P	Перед	После	P
Гомоцистеин (мкмоль/л)	9,5 (2,8)	9,3 (2,9)	0,474	10,1 (3,9)	9,8 (3,6)	0,271
EGRac	1,40 (0,19)	1,42 (0,20)	0,520	1,34 (0,16)	1,24 (0,07)	<0,001
Сывороточный фолат (мкг/л)	12,1 (8,5)	14,0 (9,6)	0,052	10,5 (6,5)	12,0 (7,5)	0,094
Эритроцитарный фолат (нмоль/л)	1063 (589)	1139 (561)	0,245	1021 (557)	1075 (526)	0,427
Систолическое артериальное давление (ммHg)	126,6 (20,4)	129,0 (22,1)	0,421	134,3 (14,9)	133,4 (15,3)	0,733
Диастолическое артериальное давление (ммHg)	79,3 (14,9)	80,9 (15,5)	0,546	80,1 (8,9)	80,4 (12,0)	0,881
	Плацебо СТ (n = 33)			Рибофлавин СТ (n = 35)		
	Перед	После	P	Перед	После	P
Гомоцистеин (мкмоль/л)	11,2 (4,1)	10,8 (4,6)	0,327	10,5 (3,8)	10,6 (6,3)	0,881
EGRac	1,41 (0,22)	1,44 (0,29)	0,209	1,38 (0,24)	1,25 (0,13)	<0,001
Сывороточный фолат (мкг/л)	7,83 (4,34)	8,12 (6,44)	0,744	10,41 (6,61)	11,80 (11,01)	0,342
Эритроцитарный фолат (нмоль/л)	991 (388)	991 (434)	0,997	1008 (400)	1022 (460)	0,759
Систолическое артериальное давление (ммHg)	133,6 (21,5)	129,9 (21,5)	0,241	136,2 (16,9)	135,4 (15,4)	0,708
Диастолическое артериальное давление (ммHg)	82,0 (12,1)	81,9 (14,2)	0,962	86,0 (10,8)	84,2 (9,2)	0,336
	Плацебо ТТ (n = 24)			Рибофлавин ТТ (n = 35)		
	Перед	После	P	Перед	После	P
Гомоцистеин (мкмоль/л)	11,8 (6,7)	11,8 (7,8)	0,915	11,3 (4,4)	10,0 (3,1)	0,014
EGRac	1,32 (0,12)	1,34 (0,11)	0,298	1,41 (0,20)	1,27 (0,09)	<0,001
Сывороточный фолат (мкг/л)	7,7 (6,6)	8,9 (7,5)	0,157	8,1 (4,8)	9,6 (8,1)	0,244
Эритроцитарный фолат (нмоль/л)	808 (488)	903 (580)	0,164	845 (303)	889 (306)	0,305
Систолическое артериальное давление (ммHg)	143,8 (18,1)	141,6 (22,5)	0,566	142,8 (22,1)	131,6 (20,9)	0,005
Диастолическое артериальное давление (ммHg)	84,5 (10,7)	85,4 (12,7)	0,739	88,1 (14,2)	80,2 (14,2)	0,002

Значения представлены как средние (SD). Перед и постинтервенционные значения в пределах каждой группы лечения были сравнены с использованием спаренного t-теста. Сокращения: MTHFR, метилентетрагидрофолатредуктаза; EGRac коэффициент активации эритроцитарной глутатионредуктазы (статус рибофлавина, более высокие значения указывают на более низкий статус).

Пример 2. Здоровые добровольцы.

Была исследована взаимосвязь между рибофлавином и артериальным давлением у здоровых людей согласно генотипу MTHFR C677T. Измерения были проведены и зарегистрированы согласно процедурой, описанным в примере 1 выше. Полученные результаты, а именно исходные характеристики здоровых пациентов, предварительно прошедших скрининг и подобранных по возрасту для генотипа MTHFR (n=124), показаны в табл. 4.

Таблица 4

Общие характеристики	MTHFR C677T Генотип			P
	CC (n = 46)	CT (n ≈ 34)	TT (n = 44)	
Возраст (г)	51,4 (4,0)	51,4 (3,0)	50,8 (5,1)	0,718
Мужчина (%)	69,6	85,3	75	0,264
BMI (кг/м ²)	28,1 (4,8)	28,0 (4,2)	28,6 (4,6)	0,791
Окружность талии (см)	90,4 (11,9)	90,6 (12,3)	93,6 (13,5)	0,434
Систолическое АД (ммHg)	132,9 (16,5)	134,8 (15,8)	137,4 (19,8)	0,473
Диастолическое АД (ммHg)	84,1 (13,2)	86,4 (8,7)	88,1 (13,9)	0,315
Биохимические измерения				
Плазменный гомоцистеин (мкмоль/л)	9,3 (1,9) a	8,9 (2,1) a	14,1 (8,0) b	<0,001
Статус рибофлавина (EGRac)	1,34 (0,17)	1,37 (0,15)	1,38 (0,16)	0,492
Эритроцитарный фолат (нмоль/л)	874 (357)	955 (433)	748 (412)	0,071
Статус витамина B6 (PLP; нмоль/л)	79,1 (47,4)	79,7 (38,7)	68,3 (35,5)	0,370

Значения средние (SD). ANOVA использовался, чтобы сравнить значения среди групп генотипов; общая величина P <0,05 указывает на статистически значимую разницу среди 3 групп генотипов. Буквы показывают, где имеют место различия: различные буквы (a, b) указывают на существенные различия между любыми двумя генотипами, тогда как та же самая буква указывает, что значения не были значительно различны между любыми двумя генотипами (post-hoc тесты Тьюки). Таким образом, буква "a" обозначает значения, которые значительно не отличаются от других значений "a"; а буква "b" обозначает значения, которые значительно не отличаются от других значений "b", но которые действительно отли-

чаются от значений, обозначенных как "а".

Как показано результатами, полученными в примере 2 (табл. 4), люди с генотипом ТТ не показывали значительно более высокого систолического или диастолического артериального давления по сравнению с группами генотипа СС или СТ. Однако они действительно демонстрировали типичный фенотип для этого генотипа ТТ значительно повышенного уровня гомоцистеина плазмы и склонность к более низкому статусу фолата, тем не менее, как показано в табл. 4, различие в статусе фолата не достигало статистического значения (так как величина Р не была <0,05).

Интервенционные данные у здоровых людей.

Было проведено плацебо-контролированное интервенционное исследование при участии 81 здорового человека. Исследовался ответ артериального давления на интервенцию рибофлавина (1,6 мг/сутки в течение 16 недель) по генотипу MTHFR у здоровых людей и результаты показаны в табл. 5.

Что касается значений Р, результаты табл. 5 показывают, что не было никакого существенного снижающего систолическое или диастолическое артериальное давление эффекта рибофлавина в этой здоровой когорте с генотипом ТТ. Поэтому снижение систолического и диастолического артериального давления рибофлавином у пациентов с CVD, имеющих генотип ТТ, что обсуждается выше в примере 1, было неожиданным и имело статистическое и клиническое значение.

Что снова касается значений Р, показанных в табл. 5, статистический анализ показывает, что не было существенных повышений или снижений артериального давления в ответ на рибофлавин или плацебо в генотипах с одним исключением, а именно диастолическое артериальное давление действительно повышалось при лечении рибофлавином в группе СС. Так как это является неожиданным, этот результат может быть отнесен к случайности и относительно маленькому размеру выборки. Даже принимая во внимание этот ответ на рибофлавин в группе СС, отмечено, что рибофлавин, как обнаружено, повышает диастолическое артериальное давление у здоровых людей СС, так что в итоге снижение систолического и диастолического артериального давления рибофлавином у пациентов с CVD, имеющих генотип ТТ, что обсуждается выше в примере 1, является особенно неожиданным.

Таблица 5

Ответ артериального давления на интервенцию рибофлавина (1,6 мг/сутки, 16 недель)
по генотипу MTHFR у здоровых пациентов (n=81)

MTHFR 677C→T Генотип										
		CC (n=25)			CT (n=30)			TT (n=26)		
		Перед	После	P- величина	Перед	После	P- величина	Перед	После	P- величина
Систолическое артериальное давление (mmHg)										
Плацебо		136,0 (124,7 140,2)	129,0 (120,3 141,0)	0,663	147,0 (136,5 151,5)	142,0 (132,1 156,1)	0,981	146,0 (135,5 157,8)	150,0 (141,6 157,8)	0,395
Лечение рибофлавином		137,0 (121,9 148,4)	143,5 (129,8 156,2)	0,077	150,0 (135,5 153,3)	150,0 (137,2 153,4)	0,797	139,5 (129,9 142,5)	145,0 (133,3 151,1)	0,970
Диастолическое артериальное давление (mmHg)										
Плацебо		83,0 (77,2 93,0)	83,0 (76,6 85,74)	0,286	87,0 (83,7 92,8)	88,0 (81,3 95,0)	0,970	90,0 (82,8 94,1)	86,0 (83,6 95,5)	0,698
CC (n=25)										
Лечение рибофлавином		80,5 (73,7 88,3)	86,5 (78,7 91,9)	0,033	87,0 (82,7 94,2)	89,0 (83,3 94,7)	0,767	88,5 (81,1 91,6)	88,5 (82,8 95,1)	0,172
CT (n=30)										
TT (n=26)										

Значения являются медианными (95%-ный доверительный интервал).

Перед- и послеинтервенционные артериальные давления сравнивались с использованием спаренного t-теста. Величина Р <0,05 указывает на статистически значимое различие перед интервенцией по сравнению с после нее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Применение рибофлавина в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гомозиготного по MTHFR C677T полиморфизму.
- Применение рибофлавина в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гетерозиготного по MTHFR C677T полиморфизму.
- Применение рибофлавина по п.1 или 2, где лекарственное средство находится в форме, подходящей для перорального или парентерального введения.
- Фармацевтический продукт для лечения или профилактики повышенного артериального давле-

ния у пациента, гомозиготного по MTHFR C677T полиморфизму, включающий фармацевтически эффективное количество антигипертензивного агента и рибофлавина, используемых для одновременного, отдельного или последовательного введения.

5. Фармацевтический продукт для лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гетерозиготного по MTHFR C677T полиморфизму, включающий фармацевтически эффективное количество антигипертензивного агента и рибофлавина, используемых для одновременного, отдельного или последовательного введения.

6. Фармацевтический продукт по п.4 или 5, в котором антигипертензивные агенты выбраны из ингибиторов АПФ, бета-блокаторов, antagonистов Ca^{++} , альфа-блокаторов, antagonистов ангиотензина II, альфа/бета-блокаторов и мочегонных средств.

7. Фармацевтический продукт по п.6, в котором ингибиторы АПФ выбраны из хинаприла, каптоприла, лизиноприла, беназеприла, периндоприла, эналаприла малеата, трандолаприла, рамиприла и цилаzapрила; бета-блокаторы выбраны из атеналола, тертатолола, метопролола тартрата, бисопролола фумарат, неббиволола, целипролола и пиндолола; antagonисты Ca^{++} выбраны из нифедипина, дилтиазема, амлодипина, верапамила и фелодипина; альфа-блокаторы выбраны из метилдопы, доксазозина, клонидина и празозина; antagonисты ангиотензина II выбраны из ирбесартана, кандесартана цилекстила, олмесартана медоксимила, валсартана, лосартана, телмисартана и эпросартана мезилата; альфа/бета-блокаторы выбраны из карведилола и лабеталола и мочегонные средства выбраны из бендрофлуметиазида, пиретанида, хлорталидона и гидрохлоротиазида.

8. Фармацевтический продукт по любому из пп.4-7, который находится в форме, подходящей для перорального или парентерального введения.

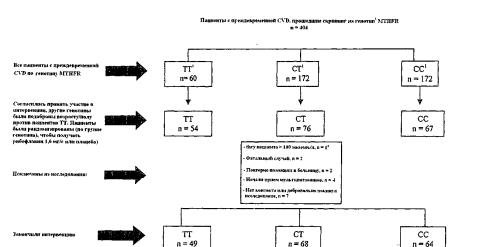
9. Способ лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гомозиготного по MTHFR C677T полиморфизму, который включает введение рибофлавина пациенту.

10. Способ лечения или профилактики повышенного артериального давления у пациента, гетерозиготного по MTHFR C677T полиморфизму, который включает введение рибофлавина пациенту.

11. Применение пищевого продукта, включающего рибофлавин для лечения или профилактики повышенного артериального давления у субъекта, гомозиготного по MTHFR C677T полиморфизму.

12. Применение пищевого продукта, включающего рибофлавин для лечения или профилактики повышенного артериального давления у субъекта, гетерозиготного по MTHFR C677T полиморфизму.

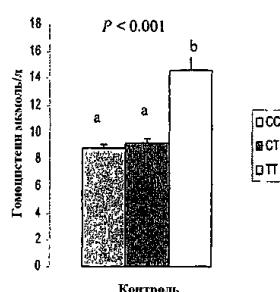
13. Применение пищевого продукта по п.11 или 12, где продукт представляет собой продукт для персонального питания.



Ключевые слова гомоцистин, ²Одни пациенты либо параллельно принимали гомоцистин или исследование (120,4 мкмоль/л), что свидетельствовало о метаболическом расстройстве, при котором был указан, что пациент был исключен из текущего исследования.

Фиг. 1

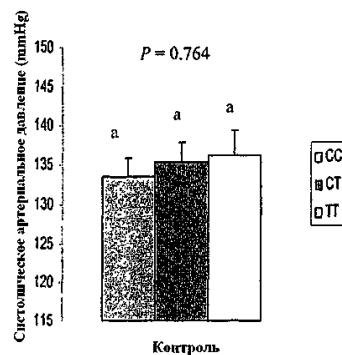
Гомоцистин мкмоль/л



n = 127

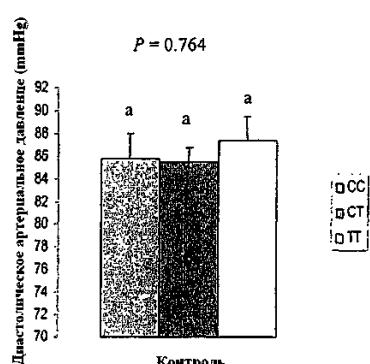
Фиг. 2(i)

Систолическое артериальное давление (ммHg)

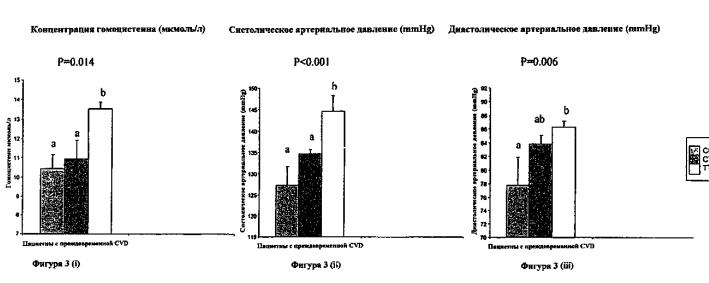


Фиг. 2(ii)

Диастолическое артериальное давление (ммHg)



Фиг. 2(iii)



Фиг. 3(i)-(iii)



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2