

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 144**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/525** (2006.01)

**A61P 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08715988 .5**

96 Fecha de presentación: **22.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2139488**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.01.2010**

54 Título: **Uso de riboflavina en el tratamiento de la hipertensión**

30 Prioridad:

**23.02.2007 GB 0703514**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**18.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**18.12.2012**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF ULSTER (50.0%)**  
**Cromore Road Coleraine**  
**County Londonderry BT52 1SA, GB y**  
**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION**  
**SCHOLARS, & THEOTHER MEMBERS OF**  
**BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY&**  
**UNDIV. TRINITY OF QUEEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WARD, MARY;**  
**MCNULTY, HELENE;**  
**HORIGAN, GERALDINE;**  
**STRAIN, SEAN;**  
**SCOTT, JOHN y**  
**PURVIS, JOHN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 393 144 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de riboflavina en el tratamiento de la hipertensión.

La presente invención se refiere al uso de riboflavina en el tratamiento de la hipertensión en una población con genotipo específico.

5 La hipertensión, referida comúnmente como presión sanguínea alta, es una afección médica en la que la presión sanguínea está elevada, generalmente elevada de forma crónica. La hipertensión de cualquier etiología es uno de los factores de riesgo principales para enfermedad cardiovascular (CVD), que induce enfermedad cardíaca e ictus.

10 Se ha encontrado que hay un riesgo incrementado de CVD en individuos homocigotos para el polimorfismo frecuente C677T en el gen que codifica la enzima 5,10-metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR). MTHFR se requiere para la formación de 5-metiltetrahidrofolato que a su vez se requiere para convertir la homocisteína en metionina. Se considera que los individuos que son homocigotos para el polimorfismo de MTHFR C677T (genotipo TT) tienen un riesgo significativamente mayor de enfermedad cardíaca e ictus que aquellos con el gen de tipo salvaje (genotipo CC). Las personas que son heterocigotas para el polimorfismo (genotipo CT) también pueden tener un riesgo moderadamente mayor de enfermedad cardíaca e ictus. Varios fármacos anti-hipertensores (por ejemplo inhibidores de ACE, beta bloqueantes y diuréticos) están disponibles para disminuir la presión sanguínea en los que se considera clínicamente que tienen hipertensión. Sin embargo, estos fármacos pueden tener efectos secundarios indeseables y algunos sujetos pueden permanecer hipertensos a pesar de ser tratados con más de un tipo de fármaco anti-hipertensor.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden riboflavina se describen en US2007031394 y en WO0019817.

20 El efecto de la riboflavina en la disminución de los niveles de homocisteína en individuos homocigotos para el Polimorfismo de MTHFR 677C → T se describe en McNulty et al., 2006, Circulation American Heart Association, Dallas, Tejas, EEUU, vol. 113 (1): 74-80.

WO80/02799 describe análogos de riboflavina como agentes antihipertensores.

25 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la riboflavina (vitamina B2) tiene un efecto significativo de disminución de la presión sanguínea sistólica y diastólica, específicamente en pacientes con CVD homocigotos para el polimorfismo de MTHFR C677T.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de riboflavina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T.

30 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un producto farmacéutico para el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente anti-hipertensor y riboflavina, para administración simultánea, separada o secuencial.

35 Los agentes anti-hipertensores adecuados incluyen inhibidores de ACE tales como quinapril, captopril, lisinopril, benazepril, perindopril, maleato de enalapril, trandolapril, ramipril y cilazapril; beta bloqueantes tales como atenolol, tertatolol, tartrato de metoprolol, fumarato de bisoprolol, nebbivolol, celiprolol y pindolol; antagonistas de Ca<sup>++</sup> tales como nifedipina, diltiazem, amlodipina, verapamil y felopidina; alfa bloqueantes tales como metildopa, doxazosina, clonidina y prazosina; antagonistas de angiotensina II tales como irbesartán, candesartán cilexetil, olmesartán medoxomil, valsartán, losartán, telmisartán y mesilato de eprosartán; alfa/beta bloqueantes tales como carvedilol y labetalol; y diuréticos tales como bendroflumetiazida, piretanida, clortalidona e hidroclorotiazida (HCTZ).

40 Las ventajas de la invención incluyen las siguientes:

- La riboflavina puede usarse para reducir la presión sanguínea en ausencia de cualesquiera otros agentes antihipertensores.
- Cuando se administran otros agentes anti-hipertensores con riboflavina, bien simultáneamente, separadamente o secuencialmente, la cantidad de los demás agentes antihipertensores necesaria para tener el efecto requerido puede reducirse ventajosamente, ya que pueden requerirse cantidades menores de los agentes con el fin de llevar a cabo el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto, minimizando de esta manera cualesquiera efectos secundarios indeseables de los agentes anti-hipertensores convencionales.

50 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un producto que comprende riboflavina para uso en el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T.

El medicamento o producto de la invención está preferiblemente en una forma adecuada para administración oral o parenteral. Las formas de dosificación oral adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas (incluyendo cápsulas de liberación lenta), pastillas, polvos, gránulos y semejantes. La administración parenteral incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravesical (por ejemplo, en la vejiga), intradérmica, tópica o subcutánea. Las formas de dosificación parenteral adecuadas incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles inyectables y polvos estériles para la preparación de disoluciones o dispersiones estériles inyectables. La ruta preferida de administración es oral.

La riboflavina puede administrarse junto con un vehículo farmacéuticamente compatible o aceptable adecuado para administración oral o parenteral, seleccionado según el tipo particular de administración usado. Para administración oral, la riboflavina puede administrarse con uno o más ingredientes sólidos inactivos para la preparación de formas de dosificación oral adecuadas. Por ejemplo, la riboflavina puede administrarse con al menos un excipiente tal como materiales de relleno, aglutinantes, humectantes, agentes de disgregación, retardadores de la disolución, aceleradores de la absorción, agentes humectantes, agentes absorbentes o lubricantes. Para administración parenteral, la riboflavina puede administrarse con un vehículo o diluyente adecuado tal como agua, etanol, disolución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y disoluciones de azúcar relacionadas, glicerol o un glicol tal como propileno glicol o polietileno glicol.

En todos los casos, la dosis de riboflavina estará en los niveles de referencia de la dieta hasta e incluyendo el nivel máximo considerado seguro. Aunque, a diferencia de muchos otros nutrientes, no se ha establecido ningún nivel oficial límite tolerable para la riboflavina, generalmente se considera segura incluso a dosis muy altas mostrando la evidencia que los niveles hasta 500 mg/día se toleran sin efectos adversos. Esto es comparable con los niveles recomendados en la dieta de riboflavina para adultos que varían de 1,1 a 1,8 mg/día. El medicamento o producto se formula lo más preferiblemente para administración de riboflavina a un sujeto en una cantidad de aproximadamente 1,6 mg/día. Sin embargo, el medicamento o producto puede formularse para administración de riboflavina a un sujeto en cualquier otra dosis adecuada mayor o menor de 1,6 mg/día. Por ejemplo, una dosis adecuada puede ser de aproximadamente 0,5 mg/día a 50 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 0,75 mg/día a 20 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/día a 10 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 1,2 mg/día a 5 mg/día, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1,4 mg/día a aproximadamente 5 mg/día.

La invención tiene aplicación en el área de la nutrición personalizada. Existe un interés creciente en las interacciones gen-nutriente y con la mayor accesibilidad de la determinación del perfil genético, el mercado para la nutrición personalizada está surgiendo en los últimos años. Esta estrategia se basa en la visión de que los requerimientos de la dieta deben considerar no sólo factores generales tales como edad y sexo, sino también factores genéticos que son específicos del sujeto. Por ejemplo, un sujeto podría comprobar su genotipo de MTHFR y proceder a tomar riboflavina a bajas dosis, específicamente si se ha encontrado que tiene el genotipo TT o CT.

La invención también tiene aplicación en el diseño de ensayos clínicos de fármacos, por ejemplo, los que ensayan nuevos fármacos para medicación anti-hipertensora. Para el resultado exitoso y la correcta interpretación de dichos ensayos, será crítico que aquellos con el genotipo TT para el polimorfismo de MTHFR C677T en combinación con el estado bajo de riboflavina se estratifiquen y aleatoricen de igual manera en los diferentes grupos de tratamiento.

### **EJEMPLO 1: PACIENTES CON CVD**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **Reclutamiento de sujetos**

La aprobación ética fue concedida por el Research Ethical Committee de la Universidad del Ulster y el Altnagelvin Hospital Trust, Londonderry, Irlanda del Norte. Se reclutaron pacientes con CVD prematura, hombres con 55 años de edad y mujeres con 65 años de edad y menor en el momento del evento en el departamento cardiaco del hospital Altnagelvin. Los pacientes estaban indicados por un infarto de miocardio (MI) o angina previo diagnosticado por cambios en ECG. Los participantes potenciales (n= 404) se cribaron para genotipo de MTHFR tomando como base una muestra de frotis bucal. Se identificaron aquellos con el genotipo TT (n= 54); éstos se agruparon por edad y sexo con un número similar de pacientes con los genotipos CC o CT, lo que resultó en un total de 197 pacientes que fueron invitados a participar en el estudio de intervención presente (véase la Figura 1). Los criterios de exclusión para todos los sujetos fueron historial de enfermedad hepática o renal, consumidores de suplementos de vitamina B, aquellos que tomaban medicación que se sabe que interfiere con el metabolismo del folato, al menos 3 meses post MI antes de la toma de sangre. Todos los voluntarios proporcionaron un consentimiento informado escrito y completaron un cuestionario de salud y médico/estilo de vida que incluyó preguntas respecto al historial familiar de CVD y hábitos de tabaquismo.

##### **Diseño del estudio**

El estudio fue un ensayo de intervención de 16 semanas controlado con placebo. Los pacientes se estratificaron tomando como base su cribado inicial de homocisteína plasmática en cada grupo de genotipo y posteriormente se aleatorizaron en cada estrato para recibir bien riboflavina (1,6 mg/día) o placebo, como se indica en la Figura 1. En un intento de maximizar el seguimiento, se proporcionó a los pacientes riboflavina cada 4 semanas en pastilleros de

7 días y se les pidió que devolvieran las pastillas no usadas lo que se registró. Se recogieron muestras de sangre no en ayunas en el cribado y posteriormente a la intervención en el hospital Altnagelvin, en su lugar de trabajo o en sus propias casas.

#### Mediciones de presión sanguínea y antropométricas

5 Las mediciones de la presión sanguínea se registraron como la media de dos mediciones separadas tomadas con una diferencia de 15 minutos usando un monitor de presión sanguínea electrónico Omcron 705CP (Medisave, Dorset, Reino Unido). El peso (kg) y la altura en (m), se usaron para calcular el BMI (peso (kg)/altura<sup>2</sup> (m)). También se midió la circunferencia de la cintura (cm). Todas las mediciones se hicieron usando equipo Seca aprobado (Brosch Direct, Ltd, Peterborough, Reino Unido).

#### 10 Recogida de muestras

Se recogió una muestra de sangre de 30 ml de cada paciente, un tubo EDTA de 9 ml para el plasma y células rojas lavadas, un tubo EDTA de 4 ml para la preparación de los lisados de células sanguíneas rojas y la medición de hemoglobina (HB) y volumen celular empaquetado (PCV); un tubo de 8 ml de separación de suero para la extracción del suero, un tubo de 5 ml de separación de suero para el análisis del perfil lipídico y un tubo de citrato de sodio de 4 ml para el cribado de la coagulación. El de EDTA de 9 ml de envolvió inmediatamente en papel de aluminio y se puso en hielo. Las muestras se centrifugaron en las 2 horas del muestreo a 3.000 rpm durante 15 minutos. El plasma se extrajo y se almacenó a -80<sup>0</sup>C para análisis de homocisteína plasmática y PLP. La capa leuco-plaquetaria se extrajo para la confirmación de genotipado de MTHFR y se almacenó a -20<sup>0</sup>C. Las células sanguíneas rojas remanentes se lavaron tres veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) desechándose el sobrenadante y la capa leuco-plaquetaria remanente después de cada lavado. Las células rojas lavadas se extrajeron y se almacenaron a -80<sup>0</sup>C para análisis EGRac (un indicador funcional del estado de riboflavina). En suero se extrajo y se almacenó a -80<sup>0</sup>C para folato sérico.

#### Análisis bioquímicos

25 La homocisteína plasmática se midió por inmunoensayo usando el analizador 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). Las concentraciones de folato sérico y de folato en las células sanguíneas rojas se determinaron por ensayo microbiológico usando el método de placas de microtitulación crioconservadas (Molloy et al., 1997, "Microbiological assay for serum, plasma and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method". Methods Enzymol, 281, 43-53). El PLP plasmático se determinó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase inversa con detección de fluorescencia (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). La identificación del genotipo de MTHFR C677T se realizó usando amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguido de HinFI (Frosst et al., 1995, "A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase". Nat. Genetic, 10, 111-113). El estado de riboflavina se determinó tomando como base EGRac, un ensayo funcional mediante el que se mide la actividad de la glutatión reductasa con y sin FAD añadido. EGRac se calcula como una proporción de actividad enzimática estimulada por FAD respecto a la no estimulada (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) y los valores  $\geq 1,3$  se consideran generalmente que reflejan un estado sub-óptimo de riboflavina. El cribado de la coagulación de midió por ACI Instrumentation Laboratories. HB y PCV se midieron usando el analizador Sysmex XE-2100 (Sysmex, UK Ltd. Milton Keynes, Reino Unido) y los perfiles lipídicos se midieron usando el analizador Abbott Architect CI 8200 (Abbott Laboratories, EEUU). Para todos los ensayos, las muestras se analizaron en ciego, en duplicado y en 1 año después de la recogida. El control de calidad se proporcionó por análisis repetidos de lotes almacenados de células sanguíneas rojas lavadas combinadas (para EGRac), plasma para homocisteína y PLP y suero para folato abarcando un amplio rango de valores.

#### Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico SPSS para las ciencias sociales (versión 11.0, SPSS UK Ltd., Chersey, Reino Unido). Para propósitos de normalización, las variables se transformaron en log según fue apropiado antes del análisis estadístico. Se usó ANOVA de una vía con ensayo post hoc de Tukey para examinar las diferencias en las características en la línea base entre los grupos de genotipo. Los datos categóricos se evaluaron usando análisis de la chi cuadrado. El análisis de correlación se realizó usando los coeficientes de correlación de Pearson bivariable. El efecto de la intervención con riboflavina en cada grupo de genotipo se examinó usando ensayos t de datos apareados. Los valores  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

#### RESULTADOS

55 Descripción de las Figuras:

La Figura 1 muestra el diagrama de flujo del diseño del estudio.

La Figura 2(i) muestra la concentración de homocisteína ( $\mu\text{moles/l}$ ) por grupo de genotipo de MTHFR entre los controles sanos; la Figura 2(ii) muestra la presión sanguínea sistólica (mmHg) por grupo de genotipo de MTHFR entre los controles sanos; y la Figura 2(iii) muestra la presión sanguínea diastólica (mmHg) por grupo de genotipo de MTHFR entre los controles sanos. Los valores en las Figuras 2(i), 2(ii) y 2(iii) son la media (barras de error estándar), Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de genotipo de MTHFR, ANOVA con ensayo post hoc de Tukey,  $P < 0,05$  significativo. En las Figuras 2(i)-2(iii), la letra "a" indica valores que no se diferencian significativamente de otros valores "a"; y la letra "b" indica valores que no se diferencian significativamente de otros valores "b", pero que sí se diferencian de los valores indicados como "a".

La Figura 3(i) muestra la concentración de homocisteína ( $\mu\text{moles/l}$ ) por grupo de genotipo de MTHFR entre los pacientes con CVD prematura; la Figura 3(ii) muestra la presión sanguínea sistólica (mmHg) por grupo de genotipo de MTHFR entre los pacientes con CVD prematura; y la Figura 3(iii) muestra la presión sanguínea diastólica (mmHg) por grupo de genotipo de MTHFR entre los pacientes con CVD prematura. Los valores en las Figuras 3(i), 3(ii) y 3(iii) son la media (barras de error estándar). Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de genotipo de MTHFR, ANOVA con ensayo post hoc de Tukey,  $P < 0,05$  significativo. En las Figuras 3(i)-3(iii), la letra "a" indica valores que no se diferencian significativamente de otros valores "a"; y la letra "b" indica valores que no se diferencian significativamente de otros valores "b", pero que sí se diferencian de los valores indicados como "a". Las letras "ab" indican valores que no se diferencian significativamente de un valor indicado como "a" o "b".

#### Datos en la línea base en individuos sanos:

En referencia a la Figura 2, en relación con los niveles de homocisteína en sangre, el fenotipo observado para individuos sanos homocigotos para el polimorfismo de MTHFR C677T (es decir, genotipo TT) fue concentración elevada de homocisteína en sangre, comparado con aquellos con genotipos CT o CC. En relación con los niveles de presión sanguínea correspondientes, se encontró que en individuos sanos con el genotipo TT no había elevación en la presión sanguínea sistólica o diastólica comparado con los valores en los genotipos CT o CC, como se muestra en la Figura 2.

#### Datos en la línea base en pacientes con CVD prematura:

Los pacientes con CVD prematura se definen generalmente como sujetos que desarrollan CVD antes de la edad de 55 para los hombres, o antes de la edad de 65 para las mujeres. En referencia a la Figura 3, los pacientes con CVD prematura y con el genotipo TT tenían concentración elevada de homocisteína en sangre, comparado con los pacientes CC y CT. Debe indicarse que también se encontró que los pacientes TT tenían una presión sanguínea sistólica y diastólica significativamente incrementada, como se muestra en la Figura 3, comparado con los pacientes CC. Se encontró que los individuos CT tenían niveles intermedios de presión sanguínea diastólica, comparado con los pacientes CC y TT (como se muestra en la Figura 3). Estos resultados son inesperados, ya que los sujetos TT sanos no mostraron elevación de la presión sanguínea comparado con los otros grupos de genotipo. Todos los pacientes estaban tomando uno o más fármacos antihipertensores en el momento del muestreo, como se indica en la Tabla 1 a continuación, pero resulta claro de la Figura 3 que la medicación fue relativamente ineficaz en el grupo de genotipo TT.

**Tabla 1**

Medicaciones anti-hipertensoras tomadas por los pacientes (n= 161) en el momento del muestreo	
<b>Medicación anti-hipertensora</b>	<b>% de pacientes</b>
Beta bloqueantes	38
Inhibidores de Ace	18
Bloqueantes del canal de calcio	6
Diuréticos	3
Inhibidores de Ace + Betabloqueantes	18
Inhibidores de Ace + Diuréticos	4
Inhibidores de Ace + Bloqueantes del canal de calcio	1
Betabloqueantes + Bloqueantes del canal de calcio	2
Betabloqueantes + Diuréticos	6
Bloqueantes del canal de calcio + Diuréticos	0,6
Inhibidores de Ace + Bloqueantes del canal de calcio + Diuréticos	0,6
Betabloqueantes + Bloqueantes del canal de calcio + Diuréticos	0,6

5 Las características en la línea base de los pacientes con CVD prematura clasificados según su genotipo de MTHFR (TT, CT o CC) se muestran en la Tabla 2 a continuación. En referencia a la Tabla 2, se observó que los pacientes TT tenían una presión sanguínea sistólica y diastólica significativamente elevada, comparado con los pacientes CC. Se encontró que los pacientes CT tenían valores intermedios para la presión sanguínea diastólica. Debe indicarse que los niveles elevados de presión sanguínea encontrados en los pacientes TT estaban muy influenciados por el estado de riboflavina; se encontró inesperadamente que los pacientes con la combinación del genotipo TT y estado bajo de riboflavina tenían una presión sanguínea muy elevada.

**Tabla 2** Características en la línea base de los pacientes con enfermedad cardiovascular prematura divididos por genotipo de MTHFR 677C→T

	<i>Genotipo de MTHFR</i>				P
	Todos (n= 197)	CC (n= 67)	CT (n= 76)	TT (n= 54)	
<b>Características generales</b>					
Edad actual (a)	53,2 (5,8)	53,4 (6,1)	52,6 (5,0)	54,0 (6,4)	0,382
Edad en el momento del evento (a)	46,9 (6,1)	47,1 (5,6)	46,9 (5,4)	47,1 (7,5)	0,891
Hombres (%)	75,1	78,1	69,7	78,2	0,303
Historial familiar de CVD (%)	68,0	68,7	65,8	70,4	0,763
Historial familiar de CVD prematura (%)	41,6	40,3	50,0	31,5	0,127
Fumador actual (%)	32,0	31,3	27,6	38,9	0,209
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	29,1 (4,6)	29,3 (4,8)	28,7 (4,5)	29,3 (4,5)	0,724
Circunferencia de la cintura (cm)	95,1 (12,1)	96,3 (11,9)	94,2 (11,4)	95,0 (13,4)	0,625
Tiempo de protrombina (seg)	13,9 (3,1)	13,7 (2,8)	14,1 (3,4)	13,6 (2,3)	0,700
Concentración de fibrinógeno (g/l)	3,93 (0,92)	3,93 (0,84)	3,97 (1,05)	3,88 (0,83)	0,853
Colesterol total (mmoles/l)	4,5 (0,9)	4,4 (0,81)	4,5 (0,8)	4,5 (1,0)	0,849
<b>Estado de vitamina B</b>					
Homocisteína plasmática (μmoles/l)	10,9 (5,3)	9,8 (3,3) <sup>a</sup>	10,5 (3,9) <sup>ab</sup>	12,8 (8,0) <sup>b</sup>	0,007
EGRac	1,38 (0,20)	1,37 (0,17)	1,39 (0,22)	1,37 (0,19)	0,854
Folato de células rojas (nmoles/l)	959 (455)	1.030 (518) <sup>a</sup>	1.011 (400) <sup>a</sup>	796 (408) <sup>b</sup>	0,009
Piridoxal fosfato (nmoles/) (B-6)	61,0 (37,0)	68,0 (35,0) <sup>a</sup>	63,2 (40,4) <sup>ab</sup>	49,4 (32,0) <sup>b</sup>	0,017
<b>Presión sanguínea</b>					
Presión Sanguínea Sistólica (mmHg)	135,0 (19,6)	131,1 (18,0) <sup>a</sup>	133,0 (19,7) <sup>a</sup>	142,8 (19,5) <sup>b</sup>	0,002
<i>Por estado de riboflavina:</i>					
Estado de riboflavina bajo	137,1 (20,5)	131,2 (20,4) <sup>a</sup>	135,8 (19,0) <sup>a</sup>	147,4 (19,8) <sup>b</sup>	0,005

Estado de riboflavina alto	132,5 (18,5)	131,0 (14,8)	129,6 (20,4)	138,6 (19,2)	0,172
Presión Sanguínea Diastólica (mmHg)	83,0 (12,2)	80,3 (12,5) <sup>a</sup>	83,3 (11,5) <sup>ab</sup>	86,0 (12,3) <sup>b</sup>	0,038
<i>Por estado de riboflavina:</i>					
Estado de riboflavina bajo	84,1 (12,8)	80,8 (13,5)	84,6 (11,8)	88,1 (12,7)	0,076
Estado de riboflavina alto	81,7 (11,4)	79,6 (11,2)	81,9 (11,1)	84,1 (12,2)	0,381

Los valores se presentan como media (SD). Los valores entre los grupos de genotipo se compararon usando ANOVA de una vía con ensayos post hoc de Tukey

Abreviaturas: MTHFR, metilentetrahidrofolato reductasa; coeficiente de activación de la glutatión reductasa de eritrocitos (estado de riboflavina, un valor alto de EGRac indica un estado bajo de vitamina); El estado de riboflavina "alto" y "bajo" se determinó usando el valor EGRac medio en cada grupo de genotipo como un punto de corte.

#### Datos de intervención en pacientes con CVD prematura

5 En referencia a la Tabla 3 a continuación, en un estudio de intervención controlado por placebo en 181 pacientes con CVD prematura, se consiguió una disminución significativa de la presión sanguínea tanto sistólica como diastólica en pacientes con el genotipo TT después de 16 semanas de administración de riboflavina a dosis baja. La respuesta de la presión sanguínea mostrada tiene significancia tanto estadística como clínica. La magnitud de la disminución de la presión sanguínea (una disminución de 11 unidades en presión sanguínea sistólica y 8 en diastólica) observada en respuesta a riboflavina puede estimarse a partir de meta-análisis que disminuye el riesgo de enfermedad cardíaca un 29% e ictus un 46%. Los resultados muestran que se consiguió una reducción significativa y clínicamente importante de la presión sanguínea en respuesta a riboflavina, específicamente en los 10 pacientes con el genotipo TT. En referencia de nuevo a la Tabla 3, no se observó ninguna reducción significativa en la presión sanguínea (ya sea sistólica o diastólica) en pacientes CC después de la administración de riboflavina.

Tabla 3. Respuesta a la intervención con riboflavina durante 16 semanas en pacientes con CVD prematura.

	Genotipo MTHFR					
	CC Placebo (n= 32)			CC Riboflavina (n= 32)		
	Pre	Post	P	Pre	Post	P
Homocisteína (µmoles/l)	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
Folato sérico (µg/l)	12,1 (8,5)	14,0 (9,6)	0,052	10,5 (6,5)	12,0 (7,5)	0,094
Folato en células rojas (nmoles/l)	1.063 (589)	1.139 (561)	0,245	1.021 (557)	1.075 (526)	0,427
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	126,6 (20,4)	129,0 (22,1)	0,421	134,3 (14,9)	133,4 (15,3)	0,733
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	79,3 (14,9)	80,9 (15,5)	0,546	80,1 (8,9)	80,4 (12,0)	0,881

	CT Placebo (n= 33)			CT Riboflavina (n= 35)		
	Pre	Post	P	Pre	Post	P
Homocisteína (µmoles/l)	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
Folato sérico (µg/l)	7,83 (4,34)	8,12 (6,44)	0,744	10,41 (6,61)	11,80 (11,01)	0,342
Folato en células rojas (nmoles/l)	991 (388)	991 (434)	0,997	1.008 (400)	1.022 (460)	0,759
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	133,6 (21,5)	129,9 (21,5)	0,241	136,2 (16,9)	135,4 (15,4)	0,708
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	82,0 (12,1)	81,9 (14,2)	0,962	86,0 (10,8)	84,2 (9,2)	0,336
	TT Placebo (n= 24)			TT Riboflavina (n= 25)		
	Pre	Post	P	Pre	Post	P
Homocisteína (µmoles/l)	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
Folato sérico (µg/l)	7,7 (6,6)	8,9 (7,5)	0,157	8,1 (4,8)	9,6 (8,1)	0,244
Folato en células rojas (nmoles/l)	808 (488)	903 (580)	0,164	845 (303)	889 (306)	0,305
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	143,8 (18,1)	141,6 (22,5)	0,566	142,8 (22,1)	131,6 (20,9)	0,005
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	84,5 (10,7)	85,4 (12,7)	0,739	88,1 (14,2)	80,2 (14,2)	0,002

Los valores se presentan como media (SD). Los valores anteriores y posteriores a la intervención en cada grupo de tratamiento se compararon usando un ensayo t de datos apareados.

Abreviaturas: MTHFR, metilentetrahidrofolato reductasa; EGRac, coeficiente de activación de la glutatión reductasa de eritrocitos (estado de riboflavina, los valores altos indican estado bajo).

### **EJEMPLO 2: CONTROLES SANOS**

5 Se investigó la asociación entre riboflavina y presión sanguínea en individuos sanos según el genotipo de MTHFR C677T. Las mediciones se tomaron y registraron según los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 anterior. Los resultados obtenidos, concretamente las características en la línea base de sujetos sanos pre-cribados y agrupados por edad para genotipo de MTHFR (n= 124), se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Características generales	Genotipo de MTHFR			P
	CC (n= 46)	CT (n= 34)	TT (n= 44)	
Edad (a)	51,4 (4,0)	51,4 (3,0)	50,8 (5,1)	0,718
Hombres (%)	69,6	85,3	75	0,264
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,1 (4,8)	28,0 (4,2)	28,6 (4,6)	0,791
Circunferencia de la cintura (cm)	90,4 (11,9)	90,6 (12,3)	93,6 (13,5)	0,434
BP sistólica (mmHg)	132,9 (16,5)	134,8 (15,8)	137,4 (19,8)	0,473
BP diastólica (mmHg)	84,1 (13,2)	86,4 (8,7)	88,1 (13,9)	0,315
<b>Mediciones bioquímicas</b>				
Homocisteína plasmática (μmoles/l)	9,3 (1,9)a	8,9 (2,1)a	14,1 (8,0)b	<0,001
Estado de riboflavina (EGRac)	1,34 (0,17)	1,37 (0,15)	1,38 (0,16)	0,492
Folato de células rojas (nmoles/l)	874 (357)	955 (433)	748 (412)	0,071
Estado de vitamina B6 (PLP; nmoles/l)	79,1 (47,4)	79,7 (38,7)	68,3 (35,5)	0,370

Los valores son media (SD). Se usó ANOVA para comparar los valores entre los grupos de genotipo; un valor global  $P < 0,05$  indica una diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grupos de genotipo. Las letras muestran dónde están ocurriendo las diferencias: letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas entre dos genotipos cualquiera, mientras que la misma letra indica que los valores no fueron significativamente diferentes entre dos genotipos cualquiera (ensayos post hoc de Tukey). Así, la letra "a" indica valores que no se diferencian significativamente de otros valores "a"; y la letra "b" indica valores que no se diferencian significativamente de otros valores "b", pero que sí se diferencian de los valores indicados como "a".

5 Como se muestra por los resultados obtenidos en el Ejemplo 2 (Tabla 4), los individuos con el genotipo TT no mostraron una presión sanguínea sistólica o diastólica significativamente mayor, comparado con los grupos de genotipo CC o CT. Sin embargo, sí demostraron el fenotipo típico para este genotipo TT de homocisteína plasmática significativamente elevada y una tendencia hacia un estado de folato menor, aunque, como se muestra en la Tabla 4, la diferencia en el estado de folato no alcanzó significancia estadística (ya que el valor P no fue  $< 0,05$ ).

#### **Datos de intervención en individuos sanos**

10 Se realizó un estudio de intervención controlado por placebo en 81 individuos sanos. Se investigó la respuesta de la presión sanguínea a la intervención con riboflavina (1,6 mg/día durante 16 semanas) por genotipo de MTHFR en individuos sanos y los resultados se muestran en la Tabla 5.

15 En referencia a los valores P, los resultados de la Tabla 5 muestran que no hay un efecto de disminución significativo en la presión sanguínea sistólica o diastólica de la riboflavina en esta cohorte sana con el genotipo TT. Por lo tanto, la disminución de la presión sanguínea sistólica y diastólica por la riboflavina en pacientes con CVD que tienen el genotipo TT discutida anteriormente en el Ejemplo 1 fue inesperada y tiene una significancia estadística y clínica.

20 En referencia de nuevo a los valores P mostrados en a Tabla 5, el análisis estadístico muestra que no hay incrementos o disminuciones significativas en la presión sanguínea en respuesta a riboflavina o placebo en los genotipos, con una excepción, concretamente que la presión sanguínea diastólica mostró un incremento con el tratamiento con riboflavina en el grupo CC. Aunque esto es inesperado, este resultado puede atribuirse al azar y al

tamaño relativamente pequeño de la muestra. Incluso teniendo en cuenta esta respuesta a riboflavina en el grupo CC, se indica que se encontró que la riboflavina incrementa la presión sanguínea diastólica en los individuos CC sanos, con el resultado de que la disminución de la presión sanguínea sistólica y diastólica por la riboflavina en pacientes con CVD que tienen genotipo TT discutido anteriormente en el Ejemplo 1 es particularmente inesperado.

5 **Tabla 5. Respuesta de la presión sanguínea a la intervención con riboflavina (1,6 mg/d, 16 semanas) por genotipo de MTHFR en sujetos sanos (n= 81)**

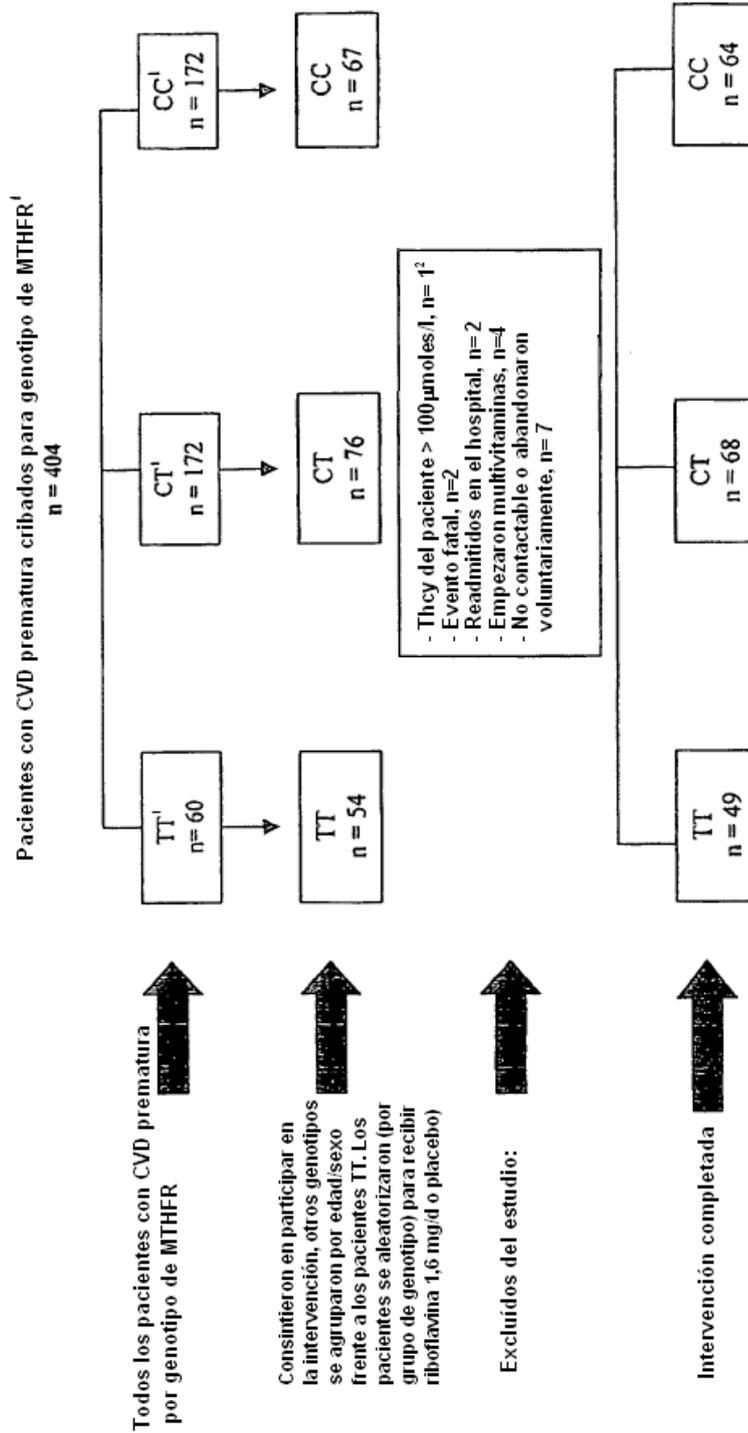
		Genotipo de MTHFR 677C→T								
		CC (n=25)			CT (n= 30)			TT (n= 26)		
		Antes	Después	valor p	Antes	Después	valor p	Antes	Después	valor p
<b>Presión sanguínea sistólica (mmHg)</b>										
Placebo	mediana	136,0	129,0	0,663	147,0	142,0	0,981	146,0	150,0	0,395
		(124,7, 140,2)	(120,3, 141,0)		(136,5, 151,5)	(132,1, 156,1)		(135,5, 157,8)	(141,1, 157,8)	
Tratamiento con riboflavina	mediana	137,0	143,5	0,797	150,0	150,0	0,797	139,5	145,0	0,970
		(121,9, 148,4)	(129,8, 156,2)		(135,5, 153,3)	(137,2, 153,3)		(129,9, 142,5)	(133,3, 151,1)	
<b>Presión sanguínea sistólica (mmHg)</b>										
Placebo	mediana	83,0	83,0	0,286	87,0	88,0	0,970	90,0	86,0	0,698
		(77,2, 93,0)	(76,6, 85,74)		(83,7, 92,8)	(81,3, 95,0)		(82,8, 94,1)	(83,6, 95,5)	
Tratamiento con riboflavina	mediana	80,5	86,5	0,033	87,0	89,0	0,767	88,5	88,5	0,172
		(73,7, 88,3)	(78,7, 91,9)		(82,7, 94,2)	(83,3, 94,7)		(81,1, 91,6)	(82,8, 95,1)	

Los valores son mediana (intervalo de confianza del 95%).

Las presiones sanguíneas Antes y Después de la intervención se compararon usando un ensayo t de datos apareados. Un valor P < 0,05 indica una diferencia estadísticamente significativa antes frente a después de la intervención.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de riboflavina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto homocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T.
2. Uso de riboflavina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto heterocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T.
- 5 3. Uso de riboflavina según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el medicamento está en una forma adecuada para administración oral o parenteral.
4. Uso de riboflavina según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la riboflavina se administra con un vehículo farmacéuticamente compatible o aceptable.
- 10 5. Un producto farmacéutico para uso en el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto homocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente anti-hipertensor y riboflavina, siendo el agente anti-hipertensor y la riboflavina para administración simultánea, separada o secuencial.
- 15 6. Un producto farmacéutico para uso en el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto heterocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T, que comprende riboflavina y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente anti-hipertensor, siendo la riboflavina y el agente anti-hipertensor para administración simultánea, separada o secuencial.
7. Un producto farmacéutico para uso según la reivindicación 5 o reivindicación 6, en el que el agente antihipertensor se selecciona de inhibidores de ACE, beta bloqueantes, antagonistas de Ca<sup>++</sup>, alfa bloqueantes, antagonistas de angiotensina II, alfa/beta bloqueantes y diuréticos.
- 20 8. Un producto farmacéutico según la reivindicación 7, en el que los inhibidores de ACE se seleccionan de quinapril, captopril, lisinopril, benazepril, perindopril, maleato de enalapril, trandolapril, ramipril y cilazapril; los beta bloqueantes se seleccionan de atenolol, tertatolol, tartrato de metoprolol, fumarato de bisoprolol, nebbivolol, celiprolol y pindolol; los antagonistas de Ca<sup>++</sup> se seleccionan de nifedipina, diltiazem, amlodipina, verapamil y felopidina; los alfa bloqueantes se seleccionan de metildopa, doxazosina, clonidina y prazosina; los antagonistas de angiotensina II se seleccionan de irbesartán, candesartán cilexetil, olmesartán medoxomil, valsartán, losartán, telmisartán y mesilato de eprosartán; los alfa/beta bloqueantes se seleccionan de carvedilol y labetalol; y los diuréticos se seleccionan de bendroflumetiazida, piretanida, clortalidona e hidroclorotiazida (HCTZ).
- 25 9. Un producto farmacéutico según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que el producto farmacéutico está en una forma adecuada para administración oral o parenteral.
- 30 10. Producto que comprende riboflavina para uso en el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto homocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T.
11. Producto que comprende riboflavina para uso en el tratamiento o profilaxis de la presión sanguínea elevada en un sujeto heterocigoto para el polimorfismo de MTHFR C677T.
- 35 12. Producto que comprende riboflavina para uso según la reivindicación 10 u 11, comprendiendo el producto un producto de nutrición.
13. Producto que comprende riboflavina para uso según la reivindicación 10 u 11, comprendiendo el producto un producto para nutrición personalizada.



**Figura 1: Diagrama de flujo del diseño del estudio.** Genotipos<sup>1</sup> CC (Tipo salvaje), CT (Heterocigoto) y TT (Homocigoto) para el polimorfismo de MTHFR 677 C→T.<sup>2</sup> Un paciente tenía un valor de homocisteína muy elevado en la línea base (130,4 µmoles/l) lo que sugiere un trastorno metabólico; el médico del paciente fue notificado y el paciente se apartó de la presente investigación.

Concentración de homocisteína (µmoles/L)

P= 0,014

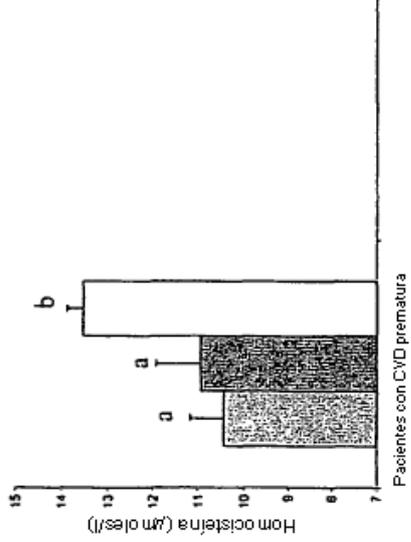


Figura 3 (i)

(n=161)

Presión sanguínea sistólica (mmHg)

P<0,001

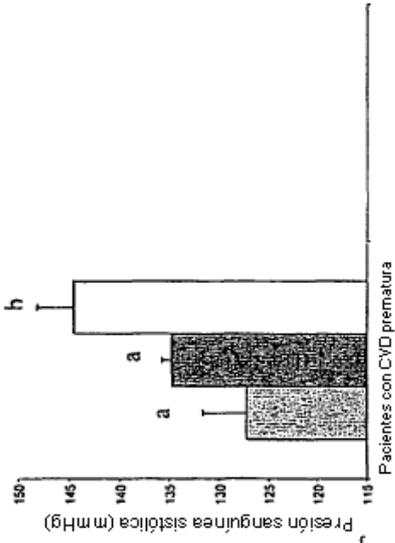


Figura 3(ii)

(n=161)

Presión sanguínea diastólica (mmHg)

P= 0,006

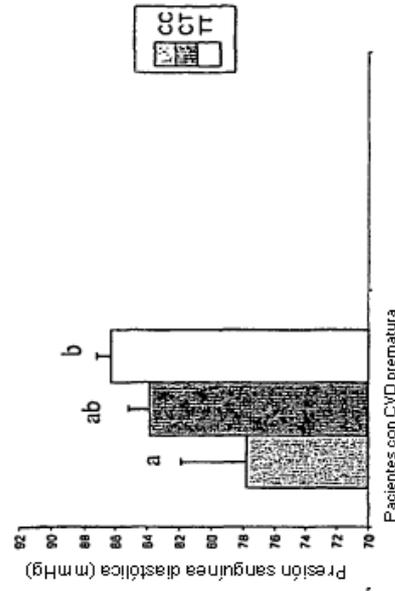


Figura 3 (iii)

(n=161)

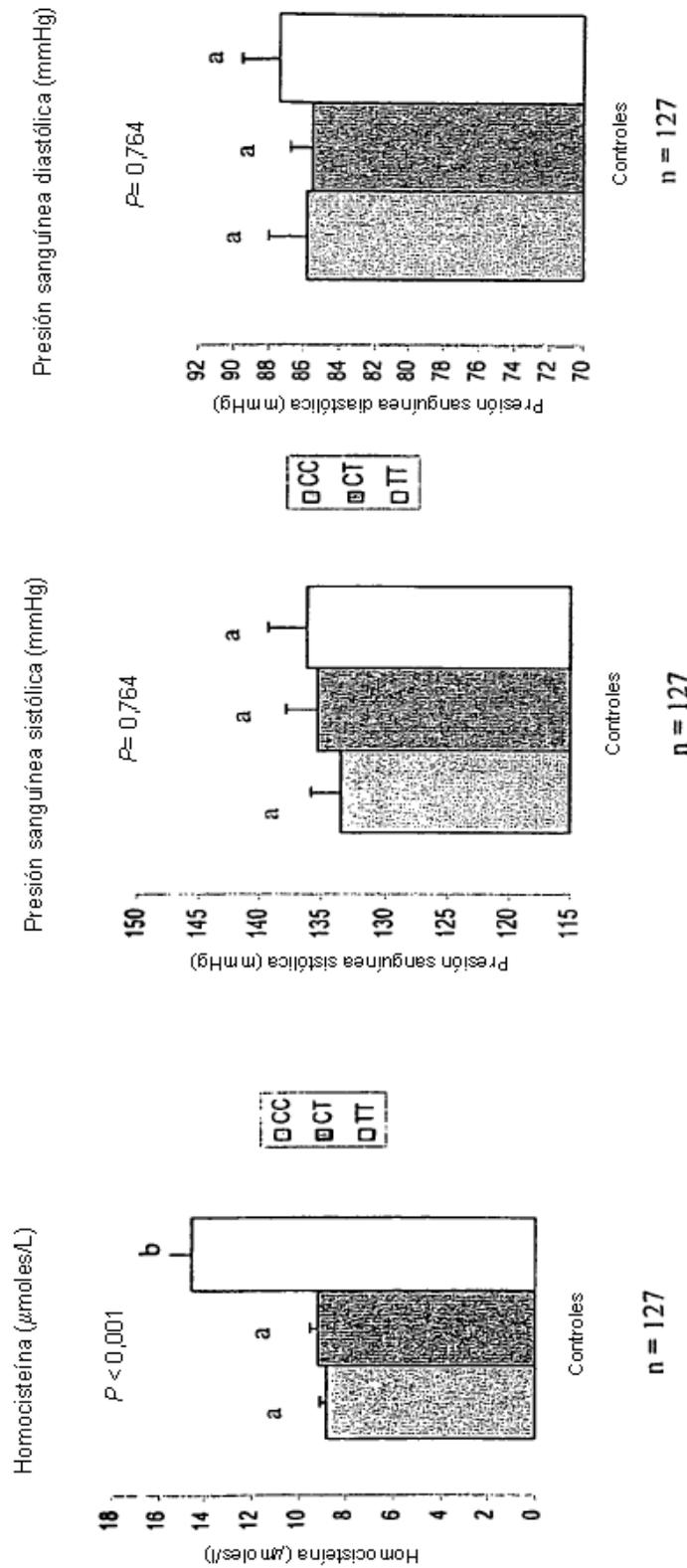


Figura 2 (iii)

Figura 2 (ii)

Figura 2 (i)