

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 529**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61P 25/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08759217 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **03.03.2010 EP 2158331**

54 Título: **Nuevos polimorfismos en ABCB1 asociados con una falta de respuesta clínica a medicamentos**

30 Prioridad:

**12.06.2007 US 943335 P**

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

**01.02.2013**

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.  
(100.0%)  
Hofgartenstrasse 8  
80539 München, DE**

72 Inventor/es:

**UHR, MANFRED;  
HOLSBOER, FLORIAN y  
MÜLLER-MYHSOK, BERTRAM**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 394 529 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

Nuevos polimorfismos en ABCB1 asociados con una falta de respuesta clínica a medicamentos

La presente invención se define mediante las reivindicaciones anejas. Se refiere a métodos, composiciones, kits y reactivos para determinar el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento que actúa en el sistema nervioso central (SNC) y que es un sustrato de la proteína ABCB1. Además, la invención se refiere a una combinación de medicamentos para el tratamiento de pacientes humanos que tienen polimorfismos específicos en el gen ABCB1.

La depresión mayor constituye una de las cargas patológicas más grandes a nivel mundial, y se anticipa que será la segunda carga patológica global principal hacia el año 2020, sólo después de la enfermedad cardiovascular (Murray y López, 1996). Los antidepresivos son el tratamiento de primera línea de la depresión mayor, pero su eficacia clínica global es insatisfactoria, puesto que la remisión, es decir, la resolución total de los síntomas depresivos, sólo se produce en alrededor de la mitad de los pacientes después de un ensayo con un único fármaco dosificado adecuadamente. Las tasas de remisión caen incluso después de fracasos sucesivos de tratamiento (Trivedi et al., 2006).

Una de las posibles razones para la mala respuesta antidepresiva es su inadecuada penetración en el sistema nervioso central, que depende de la capacidad del fármaco para pasar la barrera hematoencefálica (BBB). Esta barrera incluye transportadores activos que son expresados en la membrana luminal de las células endoteliales que forran los pequeños capilares sanguíneos que forman la barrera hematoencefálica. Estas moléculas transportan activamente sus sustratos, frente a un gradiente de concentración, fuera de las células, nuevamente a la circulación sanguínea, manteniendo así potencialmente bajas las concentraciones de fármaco en el cerebro. Una de las moléculas transportadoras mejor estudiadas es la glucoproteína P (P-gp) (Cordon-Cardo et al., 1989; Thiebaut et al., 1987). P-gp es un miembro de la superfamilia altamente conservada de proteínas transportadoras con casete de unión a ATP (ABC) (Ambudkar et al., 1999). En seres humanos, esta glucoproteína de 170 kDa es codificada en el cromosoma 7 por el gen *ABCB1*, también conocido como el gen multirresistente 1 (MDR1) (Callen et al., 1987; Chin et al., 1989). P-gp actúa como una bomba de eflujo activa para un amplio intervalo de compuestos, incluyendo un número de fármacos y hormonas esteroideas (Schinkel et al., 1996; Uhr et al., 2000, 2002, 2004, 2005). P-gp en la BBB regula así las concentraciones intracerebrales, y, por extensión, puede afectar a la respuesta clínica de fármacos dirigidos al SNC que son sustratos de este transportador.

Se teoriza que las diferencias entre individuos en la actividad del gen ABCB1 pueden dar cuenta en parte de la gran variación en la respuesta clínica a antidepresivos en pacientes psiquiátricos, incluso a niveles plasmáticos comparables (Uhr y Grauner, 2003). Un estudio posterior mostró una mejora diferente de la penetración de los antidepresivos doxepina, venlafaxina y paroxetina en el cerebro de ratones con una mutación de supresión de ABCB1ab (Uhr, Grauer y Holsboer, 2003).

Numerosos documentos describen polimorfismos en ABCB1 (Kioka et al., 1989; Stein et al., 1994; Mickley et al., 1998; Hoffmeyer et al., 2000; Kim et al., 2001; Ito et al., 2001; Cascorbi et al., 2001; Tanabe et al., 2001; Eichelbaum et al., 2004), y en las bases de datos públicas de SNP se enumeran una multitud de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs).

Soranzo et al. (Genome Research, vol. 14, pp. 1333-1344, 2004) describen la identificación de variantes etiológicas candidatas responsables de la actividad alterada del gen multirresistente de ABCB1. En una lista de 53 sitios polimórficos identificados mediante secuenciación, se mencionan el polimorfismo rs10248420 y rs4148740, pero no se investiga más.

El documento WO 01/09183 describe polimorfismos en el gen ABCB1 humano para uso en ensayos de diagnóstico para mejorar la terapia de fármacos consolidados y ayudar a correlacionar genotipos con la actividad farmacéutica y efecto secundario.

El documento WO 2005/108605 se refiere a polimorfismos en el gen ABCB1 que están asociados con una respuesta clínica insuficiente a un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1. Se describen siete polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en el gen ABCB1, que están asociados con respuesta clínica a fármacos antidepresivos. Sin embargo, no existen pruebas en este documento de que, además de los polimorfismos específicos descritos, puedan estar asociados otros polimorfismos en el gen ABCB1 con una respuesta clínica a medicamentos activos en el SNC.

De este modo, todavía existe la necesidad de identificar polimorfismos en el gen ABCB1 implicados en regular las concentraciones intracerebrales de medicamentos activos en el SNC. El objeto de la presente invención fue determinar nuevos polimorfismos de un solo nucleótido en el gen ABCB1 que sirven de pronóstico para el progreso y resultado del tratamiento de medicamentos activos en el SNC, que son sustratos transportadores de ABCB1.

En los estudios en los que se basa la presente solicitud, sorprendentemente fue posible identificar varios nuevos polimorfismos en el gen ABCB1, que tienen una asociación clara y estadísticamente relevante con una respuesta clínica insuficiente a medicamentos activos en el SNC. Se tuvo éxito a la hora de identificar los SNPs rs4148740,

rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y rs12720067, como particularmente responsables de esta asociación. La presencia de estos SNPs particulares demostró ser altamente predictiva del progreso y resultado del tratamiento de medicamentos activos en el SNC.

5 Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para determinar el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo sobre el sistema nervioso central (SNC) que es un sustrato de la proteína ABCB1, en el que se determina la presencia de al menos un polimorfismo en el gen ABCB1 de ese paciente que está asociada con una respuesta clínica retrasada, parcial, subóptima, o inexistente a dicho medicamento, en el que se determina al menos un primer polimorfismo rs4148740.

10 En una realización preferida, se determina al menos un polimorfismo adicional en el gen ABCB1, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs12720067 y/o sus combinaciones.

15 También se describe aquí un método para determinar el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el sistema nervioso central (SNC) que es un sustrato de la proteína ABCB1, en el que se determina la presencia de al menos un primer polimorfismo en el gen ABCB1 de dicho paciente, en el que dicho primer polimorfismo se selecciona del grupo que consiste en rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y rs12720067, y sus combinaciones.

20 Se describe además una composición de diagnóstico o kit para el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el sistema nervioso central que es un sustrato de la proteína ABCB1, que comprende al menos un cebador o sonda para determinar al menos un primer polimorfismo en el gen ABCB1 en dicho paciente, en el que dicho primer polimorfismo se selecciona del grupo que consiste en rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs12720067 y sus combinaciones.

25 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de una composición de diagnóstico o kit en el método según la invención, comprendiendo la composición o kit al menos un cebador o sonda para determinar al menos un polimorfismo en el gen ABCB1 en dicho paciente que está asociado con una respuesta clínica retrasada, parcial, subóptima o inexistente a dicho medicamento, en el que dicha sonda o cebador es para determinar el polimorfismo de rs4148740, en el que la composición o kit comprende además al menos un cebador o sonda adicional para determinar al menos un polimorfismo adicional en el gen ABCB1, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y/o rs12720067.

30 Se describe además una micromatriz para el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1, que comprende un soporte que tiene, inmovilizada en él, al menos una sonda para determinar al menos un primer polimorfismo en el gen ABCB1 en dicho paciente, en la que dicho primer polimorfismo se selecciona del grupo que consiste en rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs12720067 y sus combinaciones.

35 Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de una micromatriz en el método según la invención, comprendiendo la micromatriz un soporte que tiene, inmovilizada en él, al menos una sonda para determinar al menos un polimorfismo en el gen ABCB1 en dicho paciente que está asociado con una respuesta clínica retrasada, parcial, subóptima o inexistente a dicho medicamento, en el que dicha sonda es para determinar el polimorfismo rs4148740, y en el que al menos una sonda adicional está inmovilizada sobre dicho soporte, para determinar al menos un polimorfismo adicional en el gen ABCB1, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y/o rs12720067.

40 Se describe además un cebador o sonda para el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1, que comprende un soporte que tiene, inmovilizada en él, al menos una sonda para determinar al menos un primer polimorfismo en el gen ABCB1 en dicho paciente, en el que dicho primer polimorfismo se selecciona del grupo que consiste en rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y/o rs12720067, y sus combinaciones.

45 Finalmente, un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición terapéutica o kit que comprende:

(a) un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1;

(b) un medicamento adicional que es un inhibidor de la proteína ABCB1, para tratar un paciente humano que tiene al menos un polimorfismo en el gen ABCB1, en el que dicho polimorfismo es rs4148740.

50 Los polimorfismos en el gen ABCB1 humano descritos en la presente solicitud tienen una asociación estadísticamente significativa con una respuesta clínica retrasada, parcial, subóptima o inexistente a medicamentos que actúan en el sistema nervioso central y que son sustratos de la proteína ABCB1. Una asociación estadísticamente significativa es preferiblemente  $p < 0,05$ , más preferiblemente  $p < 0,01$  y lo más preferible  $p < 0,001$ . La determinación de la significancia se puede llevar a cabo mediante un análisis de polimorfismos/haplotipos de un número suficiente, por ejemplo de al menos 40, preferiblemente de al menos 80, más preferiblemente de al menos 100 casos normales. Más preferiblemente, la determinación de la significancia se puede llevar a cabo como se describe en la sección de Ejemplos.

Los polimorfismos de la invención son polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Los SNPs preferidos se seleccionan del grupo que consiste en rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y rs12720067. Sorprendentemente, se encontró que los polimorfismos muy asociados con la respuesta a medicamentos activos en el SNC están situados en el bloque de haplotipos individuales (Fig. 4). Los SNPs rs2235067, rs4188740, rs2032583, rs4148739, rs11983225, rs2235040, rs12720067, así como los SNPs rs7787082 y rs10248420, mostraron una  $r^2$  de  $> 0,8$  entre sí. Todos los SNPs muy asociados están situados en intrones y con una  $D'$  de más de 90% en el desequilibrio de ligamiento (LD) con los SNPs de exones mejor examinados rs1045642 (C3435T), rs2032582 (G2677T) y rs1128503 (C1236T).

La secuencia del gen ABCB1 humano, incluyendo los intrones, se describe en la secuencia de referencia humana del National Center for Biotechnology Information (NCBI). La secuencia es accesible en las bases de datos de genes, tales como NCBI, o Genomics Browser (UCSC), usando el reg. sep # = ONM.000927 o el ID génico ABCB1. Con respecto a la nomenclatura de los polimorfismos, se refiere a ABCB1 en el casete de unión a ATP chr7:8670884-87180500-(NM\_000927), subfamilia B (MDR/TAP), NM # = Número de Secuencia de Referencia, Localisation on genome according to the May 2004 human reference sequence (UCSC version hg17) basado en NCBI Build 33. Todos los polimorfismos se han seleccionado de la base de datos de SNP pública de SNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)). La localización de los SNPs en ABCB es según la May 2004 human reference sequence (UCSC version mg 17; [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)).

Los medicamentos activos en el SNC se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en antidepresivos, ansiolíticos, hipnóticos, potenciadores cognitivos, antiscóticos, agentes neuroprotectores, antieméticos, antiepilépticos, antibióticos, agentes contra el cáncer, antimicóticos, agentes contra el parkinson, agentes antivirales, glucocorticoides, inmunosupresores, estatinas, neurolépticos, y opioides. Una clase preferida de medicamentos son los antidepresivos. Los ejemplos de medicamentos activos en el SNC se describen en Schatzberg y Nemeroff, "The American Psychiatric Publishing Textbook of Psychopharmacology", Amer Psychiatric Pr, 2004.

Una clase preferida de medicamentos son antidepresivos. Los ejemplos de antidepresivos son imipramina, amitriptilina, amitriptilinoxida, bupropión, citalopram, clomipramina, doxepina, desipramina, fesinoxan, fluoxetina, flevoxamina, maprotilina, mirtacepina, mianserina, moclobemida, nefazodona, nortriptilina, paroxetina, selegilina, sertralina, tranilcipromina, trazodon, trimipramina y venlafaxina. Los ejemplos preferidos de antidepresivos que son sustrato de la proteína ABCB1 son amitriptilina, citalopram, doxepina, fesinoxan, nortriptilina, paroxetina, trimipramina, y venlafaxina. Los ejemplos especialmente preferidos de antidepresivos son citalopram, venlafaxina, amitriptilina o paroxetina.

Otros medicamentos preferidos del SNC son ansiolíticos, hipnóticos, potenciadores cognitivos y antiscóticos. Los ejemplos de ansiolíticos incluyen, pero no se limitan a, alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, lorazepam, halazepam, clordiazepóxido, buspirona, azapirona, pagoclon, prazosin, biperiden y kava kava. Los ejemplos de hipnóticos son secobarbital, pentobarbital, metacualona, etclorvinol, hidrato de cloral, meprobamato. Los ejemplos de potenciadores cognitivos son acetil L-carnitina (ALCAR), adrafinilo, aniracetam, deprenilo, galantamina, hidergina, idebenona, modafinilo, picamilon, piracetam, piritinol, vasopresina y vinpocetina. Los ejemplos de antiscóticos son aripiprazol, risperidona, olanzapina, quetiapina y ziprasidona, clorpromazina, flufenazina, trifluoperazina, perfenazina, tioridazina, haloperidol, tiotixeno, molindona, loxapina, clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, sertindol, ziprasidona, amisulpida, aripiprazol, benperidol, clorpromazina, clorprotixeno, flupentixol, fluspirileno, levomepromazina, benperidol, melperon, perazina, perfenazina, pimozid, pipamperon, sulpirida, triflupromazina, zotepina, zuclopentixol.

Ejemplos adicionales preferidos de sustratos de la proteína ABCB1 son antieméticos tales como domperidona y ondasetrón, antiepilépticos tales como carbamazepina, felbamato, lamotrigina, fenobarbital y fenitoína, agentes contra el parkinson tales como budipina o L-Dopa, neurolépticos tales como olanzapina, quetiapina, risperidona y sulpirida, u opioides tales como fentanilo o morfina.

Los pacientes a ensayar son pacientes humanos que sufren un trastorno que se puede tratar con un medicamento activo en el SNC, por ejemplo un trastorno psiquiátrico. Particularmente, los pacientes tienen un trastorno depresivo, distimia y/o un trastorno bipolar.

La presente invención se refiere a la determinación del pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano. La expresión "una respuesta clínica", en la presente solicitud con respecto a antidepresivos, se refiere a un estado de remisión después de cuatro a seis semanas de tratamiento. Los métodos para evaluar un estado de remisión son bien conocidos en la técnica. La remisión se puede evaluar según la Escala de Puntuación de la Depresión de Hamilton (HAM-D; Hamilton, Br. J. Soc. Clin. Psychol. 6 (1967) 278-296). Una puntuación HAM-D de 10 o inferior se considera como remisión de los síntomas depresivos. La remisión también se puede evaluar según una normalización del eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA). El desarrollo y progreso de la depresión está relacionado causalmente con alteraciones en la regulación central del eje HPA. Las anomalías en el eje HPA se pueden medir usando un ensayo de supresión de dexametasona (DST) o el ensayo combinado de dexametasona/hormona liberadora de corticotropina (Dex/CRH). Los cambios en las medidas de cortisol y/u hormona adrenocorticotrópica (ACTH) durante el ensayo DST o Dex/CRH son indicativos de una disfunción de HPA, mientras que la normalización de cortisol y/o ATCH es indicativa de remisión (Heuser et al, J. Psychiat. Res. 28

(1994) 341-356; Rybakowski y Twardowska, J. Psychiat. Res. 33 (1999) 363-370; Zobel et al, J. Psychiat. Res. 35 (2001) 83-94; Konzel et al, Neuropsychopharmacology 28 (2003) 2169-2178). Los métodos y condiciones para llevar a cabo el ensayo de DST y el Dex/CRH son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Heuser et al, J. Psychiat. Res. 28 (1994) 341-356; Kunzel et al, Neuropsychopharmacology 28 (2003) 2169-2178. De forma breve, los individuos se pueden tratar previamente a las 23:00 con una administración oral de 1,5 mg de dexametasona. Para el ensayo de DST, se puede extraer una muestra de sangre a las 8:00 antes de la administración de dexametasona (es decir, pre-dexametasona) y a las 8:00 la mañana siguiente tras la administración de dexametasona (es decir, post-dexametasona). Para el ensayo de Dex/CRH, se puede insertar un catéter venoso a las 14:30 el día después de la administración de dexametasona, y se puede recoger sangre a las 15:00, 15:30, 15:45, 16:00, y 16:15 en tubos que contienen EDTA y trasylol (Bayer Inc., Alemania). A las 15:02, se pueden administrar intravenosamente 100 mg de CRH humana (Ferring Inc., Alemania). La medida de las concentraciones plasmáticas de cortisol se pueden hacer según métodos conocidos, por ejemplo usando un kit de radioinmunoensayo comercial (ICN Biomedicals, USA). Las concentraciones plasmáticas de ACTH también se pueden medir según métodos conocidos, por ejemplo usando un ensayo inmunométrico comercial (Nichols Institute, USA). Con respecto a otras clases de medicamentos, la expresión "respuesta clínica" se puede definir como una reducción de la gravedad de los síntomas en alrededor de 50% de la gravedad de los síntomas al comienzo del tratamiento.

La presencia de un polimorfismo asociado con una respuesta clínica retrasada, parcial, subóptima o inexistente a un medicamento se determina preferiblemente mediante un análisis de genotipado del paciente humano. Según la invención, (a) se determina al menos un polimorfismo rs4148740. En una realización preferida de la invención, se determina al menos un polimorfismo adicional, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y rs12720067. En una realización preferida adicional de la invención, se determina al menos un polimorfismo adicional (b) que está en desequilibrio de ligamiento con al menos uno de los polimorfismos de (a). Los polimorfismos de (b) que están en desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos de (a) se seleccionan preferiblemente en el grupo que consiste en rs2235067, rs2032583, rs2235040, y rs2235015.

El análisis de genotipado comprende frecuentemente el uso de cebadores y/o sondas específicos de polimorfismos capaces de hibridarse con el gen ABCB1 humano y que permiten una discriminación entre polimorfismos, particularmente SNPs en una posición predeterminada. Por ejemplo, el análisis de genotipado puede comprender una reacción de alargamiento de cebador usando cebadores específicos de polimorfismos como se describe en los ejemplos. La determinación de polimorfismos individuales se puede llevar a cabo mediante análisis espectrométrico de masas como se describe en los ejemplos. Una realización preferida adicional comprende un análisis de micromatriz que es particularmente adecuado para la determinación paralela de varios polimorfismos. Los dispositivos de micromatrices adecuados están comercialmente disponibles.

Según una realización adicional de la invención, el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1 también se puede determinar detectando un cambio en la función del gen ABCB1. La determinación de la actividad transportadora del producto del gen ABCB1 en la barrera hematoencefálica se puede usar como un indicador para la respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el SNC. Un ensayo para detectar un cambio en la función del gen ABCB1 puede comprender técnicas de formación de imágenes, como la tomografía de emisión positrónica (PET) y la espectroscopía de masas.

Según una realización particularmente preferida de la invención, el ensayo de la actividad transportadora se logra además de la determinación del al menos un polimorfismo específico de la invención descrito anteriormente.

Basándose en los resultados de la determinación de polimorfismos, se puede realizar un pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1. De este modo, por un lado, si el paciente a ensayar no tiene un polimorfismo que está asociado con una respuesta clínica insuficiente al medicamento, se puede dar un pronóstico favorable para una respuesta clínica, y el medicamento para obtener la respuesta clínica se puede fabricar, prescribir y administrar en una dosis estándar, con lo que se puede esperar con probabilidad elevada una respuesta clínica suficiente. Por otro lado, el paciente a ensayar puede tener uno o una pluralidad de polimorfismos que están asociados con un pronóstico desfavorable para una respuesta clínica del medicamento. Si se da tal pronóstico desfavorable para una respuesta clínica, se puede usar un régimen terapéutico modificado para el paciente. Por ejemplo, el medicamento se puede administrar en una dosis que es mayor que la dosis estándar, por ejemplo incrementando la concentración de la dosis y/o el número de dosis a administrar por intervalo de tiempo. Además, se puede fabricar y administrar la formulación del medicamento que muestra una permeación incrementada a través de la barrera hematoencefálica, por ejemplo incluyendo un auxiliar de la permeación de la barrera hematoencefálica, tal como los indicados en la Tabla 1.

Además, la fabricación y administración del medicamento se pueden combinar con la fabricación y administración de un medicamento adicional que es un inhibidor de la proteína ABCB1. Los inhibidores adecuados de la proteína ABCB1 son conocidos y se describen, por ejemplo, en el documento US 2003/0073713 A1. Además, en Marzolini C, et al (2004), Clin Pharmacol Ther. 2004 Jan; 75(1):13-33, se describen inhibidores de ABCB1.

Como se perfila anteriormente, la presente invención también se refiere a composiciones de diagnóstico y a kits para el pronóstico de una respuesta clínica en un paciente humano a un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1. Una composición de diagnóstico o kit como se usa en la presente invención comprende preferiblemente (a) al menos un cebador y/o sonda para determinar al menos un polimorfismo rs4148740, en el que la composición o kit comprende además al menos un polimorfismo adicional en el gen ABCB1, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y rs12720067. En una realización preferida, la composición de diagnóstico o kit, como se usa en la presente invención, comprende además al menos un cebador y/o sonda adicional para determinar al menos un polimorfismo (b) que está en desequilibrio de ligamiento con dicho polimorfismo de (a). El cebador y/o sonda adicional es preferiblemente para determinar al menos un polimorfismo seleccionado del grupo que consiste en rs2235067, rs2032583, rs2235040, y rs2235015. Los cebadores y/o sondas pueden ser moléculas de ácido nucleico tales como un ADN, un ARN o análogos de ácidos nucleicos tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o un ácido nucleico bloqueado (LNA). El cebador y/o las sondas se seleccionan de manera que puedan discriminar entre polimorfismos en la posición a analizar. Habitualmente, los cebadores y sondas tienen una longitud de al menos 10, preferiblemente al menos 15 hasta 50, preferiblemente hasta 30 bloques de construcción de ácidos nucleicos, por ejemplo nucleótidos. En una realización preferida, la composición o kit como se usa en la presente invención comprende al menos un cebador que se hibrida al gen ABCB1 humano en condiciones predeterminadas, por ejemplo de temperatura, tampón, fuerza y/o concentración de disolvente orgánico, y que permite una determinación específica del polimorfismo a ensayar.

La composición o kit como se usa en la presente invención comprende además preferiblemente una enzima para el alargamiento de cebador tal como una ADN polimerasa, nucleótidos, por ejemplo nucleótidos de alargamiento de cadena tales como desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs), o nucleótidos de terminación de la cadena, tales como didesoxinucleósido trifosfatos (ddNTPs), y/o grupos marcadores, por ejemplo grupos marcadores fluorescentes o cromógenos.

Una micromatriz para el pronóstico de una respuesta clínica a un medicamento activo en el SNC como se usa en la presente invención comprende un soporte, por ejemplo un soporte plano o un dispositivo de microcanales, que tiene inmovilizada a él al menos una sonda que permite una determinación de un polimorfismo a ensayar. Preferiblemente, el soporte de la micromatriz tiene inmovilizadas en él una pluralidad de diferentes sondas situadas en áreas diferentes sobre el soporte, que se diseñan de manera que se pueden unir a moléculas de ácido nucleico, por ejemplo moléculas de ARN o moléculas de ADN, productos de amplificación, productos de alargamiento de cebador, etc., que contienen la secuencia en la que está situada el polimorfismo a ensayar. De este modo, se puede lograr una identificación del polimorfismo a analizar mediante detección de un suceso de unión específico del sitio de la molécula de muestra de ácido nucleico a la sonda inmovilizada sobre el soporte.

Finalmente, la presente invención se refiere a una composición terapéutica o kit que comprende un medicamento activo en el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1 en una dosis terapéuticamente eficaz, y un medicamento adicional que es un inhibidor de la proteína ABCB1 en una dosis terapéuticamente eficaz, para tratar un paciente humano que tiene al menos un polimorfismo en el gen ABCB1 asociado con una falta de respuesta clínica a dicho medicamento activo en el SNC. Según la invención, el polimorfismo es rs4148740. Se describen además los polimorfismos rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y rs12720067, opcionalmente en combinación con al menos un polimorfismo adicional que está en desequilibrio de ligamiento con dicho polimorfismo. El polimorfismo adicional se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en rs2235067, rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs2032583, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs2235040, rs12720067 y rs2235015. Los medicamentos pueden estar presentes como una única formulación o como formulaciones separadas, si se desea. Se pueden incluir vehículos, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La composición o kit se puede administrar mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante administración oral o parenteral, o cualquier otro medio adecuado.

El calendario de administración y dosis de un medicamento activo en el SNC, tal como, por ejemplo, un fármaco antidepresivo, pueden variar entre pacientes, y son bien conocidos en la técnica médica; véanse, por ejemplo, Benkert e Hippus, "Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie", Springer Verlag Publishing, 2000; Albers, "Handbook of Psychiatric Drugs: 2001-2002 Edition", Current Clinical Strategies Publishing, 2000. Para antidepresivos, hay tres posibilidades terapéuticas para individuos que se han genotipado con SNPs en el gen ABCB1.

1. La dosis de un antidepresivo que es un sustrato de ABCB1 se incrementaría. Los ejemplos de tales antidepresivos son entre 10 mg y 100 mg por día, preferiblemente 40 mg, de citalopram; entre 10 mg y 80 mg por día, preferiblemente 20 mg, de paroxetina; entre 50 mg y 500 mg por día, preferiblemente 150 mg, de venlafaxina; entre 25 mg y 300 mg por día, preferiblemente 75 mg, de amitriptilina; entre 25 mg y 400 mg por día, preferiblemente 75 mg, de nortriptilina; entre 50 mg y 400 mg por día, preferiblemente 200 mg, de fluvoxamina; entre 2 mg y 15 mg por día, preferiblemente 10 mg, de reboxetina.

2. Se administraría un antidepresivo alternativo que no es un sustrato de ABCB1. Los ejemplos preferidos incluyen entre 15 mg y 100 mg por día, preferiblemente 30 mg, de mirtazapina; entre 5 mg y 80 mg por día, preferiblemente 20 mg de fluoxetina.

3. Un antidepresivo que es un sustrato de ABCB1 se combinaría con un inhibidor o modulador de ABCB1. Los ejemplos de inhibidores o moduladores de ABCB1 se describen en la Tabla 1, y la dosificación se determinaría según las recomendaciones del fabricante.

Además, la presente invención se explicará mediante las siguientes Tablas y Figuras, así como con los Ejemplos.

5 Figuras:

Figura 1 Función de la barrera hemato-orgánica para fármacos antidepresivos

10 Relaciones órgano/plasma de concentración de fármaco en ratones *abcb1ab(-/-)* en comparación con controles de tipo salvaje tras la administración subcutánea de citalopram (A), mirtazapina (B) o venlafaxina (C y D) durante 11 días vía bombas osmóticas. Las relaciones órgano/plasma para citalopram (A), mirtazapina (B), venlafaxina (C) y desmetil venlafaxina (D) se muestran como % del control. Un asterisco indica una diferencia significativa entre los mutantes carentes del gen y los ratones del control (ensayos F univariados en MANOVA, valores  $p < 0,05$ ). Se investigaron el cerebro (cer), bazo (spl), riñón (kid), hígado (liv), testículos (tes) y pulmón (lun). Los valores se muestran como medias  $\pm$  SEM.

Figura 2 Distribución de genotipos rs2032583

15 Porcentajes de genotipos rs2032583 en los grupos “no remitentes” y “remitentes” para pacientes tratados con sustratos de P-gp (A) (amitriptilina, citalopram, paroxetina o venlafaxina), y aquellos tratados con sustratos no de P-gp (B) (mirtazapina).

Figura 3 Análisis de regresión de Cox para rs2032583 y rs2235015

20 Se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox para determinar la remisión para los SNPs rs2032583 (A, B, C) y rs2235015 (D, E, F), dependiendo del rasgo genético “portador de C” (rs2032583) o “portador de T” (rs2235015). Esta Figura muestra el transcurso del tiempo de pacientes no remitentes, es decir, deprimidos. Representa el examen de todos los pacientes (A, D) y los dos subgrupos de pacientes que reciben sustratos de P-gp (B, E) y aquellos que reciben sustratos no de P-gp (C, F).

Figura 4 Cartografiado del desequilibrio de ligamiento

25 Representación del desequilibrio de ligamiento (LD) y estructura de bloque en *ABCB1* usando  $D'$  como una medida para la fortaleza de LD por medio de HAPLOVIEW.

## 1. Métodos

### 1.1. Experimentos usando animales transgénicos

#### Materiales.

30 Venlafaxina y O-desmetil venlafaxina (d-venlafaxina) se obtuvieron de Wyeth-Pharma GmbH (Munster, Alemania). La mirtazapina se obtuvo de Thiemann Arzneimittel GmbH (Waltrop, Alemania), y el citalopram de Lundbeck (Copenhague, Dinamarca). La protriptilina se adquirió de Research Biochemical International, Natick, MA (USA). Todos los otros compuestos químicos se obtuvieron en el grado más puro disponible de Merck (Darmstadt, Alemania).

#### 35 Animales.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Gobierno de Baviera, Alemania.

40 Se enjaularon individualmente ratones macho *abcb1ab(-/-)* y ratones de tipo salvaje FVB/N, y se mantuvieron en un ciclo de 12:12 h de luz/oscuridad (las luces se encienden a las 07:00), con alimento y agua a voluntad. Los ratones doblemente carentes de *abcb1ab*, originalmente creados por A. Schinkel mediante selección génica secuencial en células madre embrionarias 129/Ola E14 (Schinkel et al., 1997) y retrocruzados siete veces (N7) con FVB/N a partir de la quimera C57BU6 x 129, y los ratones de tipo salvaje FVB/N se obtuvieron de Taconic (Germantown, NY, USA; FVB/Tac-[KO]Pgy2 N7). Una colonia homocigota se mantuvo en el Max Planck Institute of Psychiatry en el trasfondo N7 FVB/N mediante entrecruzamiento de ratones homocigotos. En la Tabla 9 se muestran la edad, peso y tamaño del grupo de los ratones.

#### Procedimientos experimentales y de extracción

50 Los procedimientos experimentales y de extracción se llevaron a cabo como se describe anteriormente (Uhr et al., 2003; Uhr y Grauer, 2003). Se administraron subcutáneamente, citalopram, mirtazapina, y venlafaxina, disueltos en cloruro de sodio al 0,9 por ciento y etanol al 0,5 por ciento, en la nuca del cuello a través de bombas de infusión osmótica quirúrgicamente implantadas (bomba microosmótica Alzet® Alza Corporation, Palo Alto, CA, USA), que

5 suministraron continuamente los fármacos a las concentraciones programadas (citalopram y mirtazapina 60 µg/d; venlafaxina 300 µg/d). Después de 11 días, los ratones se anestesiaron y se sacrificaron. Los órganos diseccionados se homogeneizaron y se llevó a cabo un procedimiento de extracción líquido-líquido con n-hexano/alcohol isoamílico en la etapa 1 (véase la Tabla 9) y ácido fosfórico en la etapa 2. Las recuperaciones de la extracción fueron mayores de 90 por ciento para citalopram, mirtazapina y venlafaxina, y 36 por ciento para d-venlafaxina.

10 Se llevaron a cabo medidas de cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC) como se describe anteriormente (van de Vrie et al., 1998; Uhr et al., 2003). Para el análisis de HPLC, se usó una bomba de gradiente Beckman, un autoinyector, un detector de UV y un detector de fluorescencia de Merck. Las separaciones se realizaron en una columna de fase inversa Luna 5 µ C18(2) 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) a 60°C, con un caudal de fase móvil de 1 ml/min. Para el análisis cromatográfico, se usó un gradiente de fase móvil con acetonitrilo (véase la Tabla 9). Las sustancias se determinaron mediante absorción de UV y fluorescencia.

#### Estadística

15 Se llevó a cabo un análisis estadístico usando el software de paquete estadístico SPSS Release 14.0 para Windows (Chicago, IL, USA). La significancia se ensayó mediante análisis de varianza multivariado de un factor (MANOVAs). Los ensayos de F univariados sirvieron para identificar las variables, cuyas diferencias entre los dos grupos contribuyeron significativamente al efecto de grupo global. Como nivel nominal de significancia, se aceptó  $\alpha = 0,05$  y se corrigió (reducido según el procedimiento de Bonferroni) para todos los ensayos a posteriori (ensayos F univariados), para mantener el error de tipo I menor o igual a 0,05.

#### 20 1.2. Estudios genéticos humanos

##### Descripción de los pacientes

25 El estudio incluyó 443 pacientes ingresados con trastorno depresivo que fueron tratados en el Max Planck Institute of Psychiatry (MPI), Munich/Alemania. Los pacientes se incluyeron en este estudio en 1-3 días de admisión, y fueron diagnosticados por psiquiatras expertos según los criterios de Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) IV. Los pacientes con trastorno depresivo debido a una condición médica o neurológica fueron excluidos. La etnia se registró usando una hoja rellena por el propio paciente para la nacionalidad, lengua nativa y etnia del sujeto y de los 4 abuelos. El estudio fue aprobado por el comité de ética local, y se obtuvo la autorización escrita de todos los sujetos.

30 El estudio se diseñó como un estudio de farmacogenética naturalista (Proyecto Munich Antidepressant Response Signature (MARS)) (Kunzel et al., 2003; Binder et al. 2004) diseñado para descubrir biomarcadores y genotipos predictivos del resultado clínico; todos los pacientes se trataron según la elección del médico de fármacos antidepresivos en unos pocos días tras la admisión. La concentración plasmática de antidepresivo se monitorizó para asegurar niveles farmacéuticos clínicamente eficientes.

35 El grupo total de pacientes se dividió en dos subgrupos que difirieron entre sí por el hecho de que los pacientes de ambos subgrupos recibieron fármacos que fueron sustratos o no de glucoproteína P en el modelo de animal. En el grupo de pacientes que toman antidepresivos que son sustratos de P-gp, los pacientes tomaron amitriptilina, paroxetina, venlafaxina o citalopram durante al menos 4 semanas en las primeras 5 semanas de tratamiento. Además, no se les dejó tomar ningún otro antidepresivo durante más de 3 semanas (con la excepción de trimipramina, que se permitió en una dosis diaria de hasta 100 mg con fines de promoción del sueño). En el grupo de  
40 pacientes que toman antidepresivos que no son sustratos de P-gp en el modelo de animal, los pacientes tuvieron que tomar mirtazapina durante al menos 4 semanas en las primeras 5 semanas de tratamiento, y no se les permitió tomar ningún otro antidepresivo. Si un paciente se descartó antes de la semana 5, tuvo que tomar los fármacos respectivos durante 3 semanas cuando se hospitalizó durante 4 semanas, y durante 2 semanas en el caso de una hospitalización de 3 semanas. Las características de los grupos, el número de pacientes (% de mujeres), edad, Escala de Puntuación de la Depresión de Hamilton (HAM-D) en la inclusión, edad en el comienzo, duración de la enfermedad en años, número de episodios previos, número de hospitalizaciones anteriores, duración del episodio  
45 actual, etnia, co-medicación y diagnóstico se muestran en la Tabla 6 y en la Tabla 8 para los SNPs representativos rs2032583 y rs2235015, dependiendo del genotipo.

50 No todos los pacientes acabaron las puntuaciones psicopatológicas semanales hasta la semana 4 después de ser incluidos en el estudio. Después de las semanas 4, 5 y 6, estuvieron disponibles para evaluación los datos de solo 366 (83%), 324 (73%) y 297 (67%) pacientes. Este desgaste fue debido a la rápida recuperación de los pacientes, al abandono contra el consejo de su médico, y a la relocalización o rechazo de una participación posterior.

##### Psicopatología y definición de respuesta a tratamiento con fármacos antidepresivos.

55 Evaluadores entrenados que usan la Escala de Puntuación de Depresión de Hamilton (HAM-D) de 21 apartados evaluaron la gravedad de la psicopatología en la admisión. Los pacientes que cumplieron los criterios para al menos un episodio depresivo moderado (HAM-D $\geq$ 14) entraron en el análisis. Las puntuaciones se llevaron a cabo en 3 días de admisión, y después semanalmente hasta su abandono.



Se definió respuesta como una reducción de al menos 50% en las puntuaciones de HAM-D en la admisión. La remisión se definió como el logro de una puntuación de HAM-D total menor que 10. Se escogió el período de tiempo de 4 a 6 semanas debido a que se considera que esta duración de tratamiento es necesaria para que un fármaco antidepressivo presente su eficacia clínica.

5 Preparación de ADN, selección de SNP y genotipado.

En el momento del enrolamiento en el estudio, se extrajeron 40 ml de sangre en EDTA a partir de cada paciente, y se extrajo ADN de sangre reciente usando un kit de extracción de ADN de sangre completa Puregene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). Se genotiparon noventa y cinco SNPs *ABCB1* (NM\_000927). Los SNPs se seleccionaron de la dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/>), o parte de Illumina Sentrix Human-1 100 k BeadChips.

10 El genotipado se llevó a cabo en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (sistema MassArray®) que emplea el software Spectrodesigner (Sequenom®; San Diego, CA, USA) para la selección y multiplexación del cebador, y el proceso de extensión de masa homogénea (hMe) para producir productos de extensión de cebadores. Los productos de extensión limpios se analizaron por medio de un espectrómetro de masas (Bruker Daltronik), y los picos se identificaron usando el software SpectroTYPER (Sequenom). Sólo si la tasa de determinación inequívoca de las placas ensayadas fue más de 90%, los resultados se usaron para evaluación.

15 Los SNPs que no se pudieron examinar por medio de la tecnología Sequenom se ensayaron mediante pirosecuenciación (Biotage, Uppsala, Suecia). rs7779562, rs4148738, rs2235033, rs10264856, rs10267099, rs7796247 y rs10275625 se estudiaron en Sentrix Human-1 Genotyping BeadChips (Illumina Inc., San Diego, USA) según los protocolos estándar del fabricante. Los SNPs rs2235048, rs1045642, rs2032583, rs2235046, rs1202169, rs2235015 y rs1202172 se estudiaron usando tanto la tecnología de Sequenom como de Illumina. Los resultados de la medición fueron congruentes en más de 99%.

El SNP tetraalélico rs2032582 se midió en el ciclador de luz usando sondas de hibridación específicas de alelos. Todas las secuencias de cebadores están disponibles a petición.

25 Desequilibrio de ligamiento en *ABCS1*.

Para el desequilibrio de ligamiento (LD), se usaron medidas de examen de la estructura  $D'$  y  $r^2$  (Hill y Robertson, 1968). Se llevó a cabo el análisis de las medidas usando HAPLOVIEW Version 3.32 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>). Los bloques se definieron usando el método de intervalo de confianza descrito por Gabriel et al. (2002).

30 Estadísticas.

Los ensayos exactos para detectar desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) (Wigginton et al., 2005) se llevaron a cabo para todos los SNPs (Tabla 2).

35 Para calcular si existe una asociación significativa entre variables fenotípicas y variabilidad genética en el gen *ABCB1*, se empleó el método del producto de Fisher (FPM) multivariado. Las variables fenotípicas se corrigieron para los efectos de edad y género calculando los restos de regresión lineal con un software de paquete estadístico SPSS Release 14.0.0 (Chicago, IL, USA). Las asociaciones bivariadas entre los datos de genotipado de SNP y los fenotipos se ensayaron en un análisis ANOVA (Análisis de Varianza). Los valores de  $p$  empíricos se calcularon aplicando  $10^6$  permutaciones (fenotipos redistribuidos al azar a lo largo de los genotipos). El método del producto de Fisher (FPM) (Fisher, 1932) incluye los restos de las variables fenotípicas remisión después de 4 semanas, remisión después de 5 semanas, remisión después de 6 semanas, y las variables genotípicas de todos los SNPs polimórficos. La corrección del valor de  $p$  para múltiples comparaciones se realizó mediante remuestreo ( $10^6$  permutaciones).

40 Para corregir el ensayo múltiple, se aplicó el método de permutación de Westfall y Young (1993) para aprovechar la estructura de dependencia entre los SNPs y los fenotipos. Se llevó a cabo todo el barrido de análisis  $10^6$  veces usando fenotipos redistribuidos al azar a lo largo de los genotipos. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de supervivencia de regresión de Cox con el software de paquete estadístico SPSS Release 14.0.0 (Chicago, IL, USA), examinando la incidencia de remisión (HAM-D <10) durante las primeras 6 semanas de tratamiento, con el sexo y la edad como covariables.

Resultados

50 Experimentos usando ratones carentes doblemente de los genes *abcb1a* y *abcb1b*

Puesto que la función de P-gp es sólo crítica para fármacos que son sustratos de P-gp en seres humanos, se desarrolló un ensayo in vivo que usa mutantes de ratón que carecen de los homólogos del gen *ABCB1* humano, es decir, ratones sin el gen *abcb1ab*. Después del tratamiento durante 11 días con bombas de infusión osmóticas implantadas subcutáneamente, se observó que las concentraciones intracerebrales de los antidepressivos citalopram

( $F_{7,8} = 35,4$ ;  $p < 0,001$ ), venlafaxina ( $F_{7,8} = 30,7$ ;  $p < 0,001$ ) y su metabolito activo d-venlafaxina ( $F_{7,8} = 4,5$ ;  $p = 0,022$ ) están reguladas por P-gp. Las concentraciones cerebrales de citalopram, venlafaxina y d-venlafaxina fueron 3,0, 1,7 y 4,1 veces mayores en los ratones mutantes en comparación con sus parejas de camada de tipo salvaje (Tabla 2). Este no fue el caso para mirtazapina, otro antidepresivo usado frecuentemente ( $F_{8,9} = 3,0$ ;  $p = 0,58$ ). No se encontraron diferencias en los niveles plasmáticos entre mutantes *abcb1ab* (-/-) y sus parejas de camada de tipo salvaje para ninguno de los fármacos y metabolitos investigados (Tabla 2).

En la Figura 1 se representa la función de la barrera hematoencefálica como una relación de concentración órgano/plasma. Los animales que carecen de P-gp, la penetración en el cerebro de citalopram, venlafaxina y d-venlafaxina es 3,7, 1,8 y 3,6 veces mayor que la encontrada en los animales de control. Además de las diferencias en las relaciones cerebro/plasma, se encontraron diferencias más pequeñas pero todavía significativas para venlafaxina y d-venlafaxina, pero no mirtazapina, en los testículos, otro órgano con una barrera hematoencefálica.

Estudio de asociación de SNP humanos.

Si un paciente es tratado con un sustrato de P-gp, las variantes genéticas funcionalmente relevantes en el transportador *ABCB1* podrían influir en las concentraciones farmacéuticas intracerebrales, y de ese modo en la respuesta clínica. Para ensayar esta hipótesis, se analizó en pacientes con trastorno depresivo la asociación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *ABCB1* con el tiempo hasta la remisión bajo tratamiento antidepresivo.

Para ese objetivo, se investigaron 95 SNPs en *ABCB1*, 74 de los cuales fueron polimórficos. En la Tabla 7 se presenta la información sobre la posición cromosómica, la función HWE, frecuencias alélicas minoritarias (MAF) y el número de pacientes genotipados. La distancia media entre marcadores de los SNPs informativos fue 3,5 kb a lo largo de la región *ABCB1* de 262 kb de longitud en el cromosoma 7, incluyendo todos los SNPs etiquetadores del proyecto HapMap.

Puesto que P-g no influye en la penetración cerebral de todos los antidepresivos, los pacientes se dividieron en dos subgrupos, incluyendo un grupo los pacientes tratados con sustratos de P-gp (citalopram, paroxetina, amitriptilina y venlafaxina), incluyendo el otro los pacientes tratados con no sustratos (mirtazapina) (Uhr et al., 2000, 2003, 2007; Uhr y Grauer, 2003; Grauer y Uhr, 2004).

Todos los SNPs polimórficos se ensayaron para determinar la asociación genotípica con la remisión de fenotipos tras 4 semanas, la remisión tras 5 semanas o la remisión tras 6 semanas.

La Tabla 3 muestra los valores de p empíricos del análisis ANOVA determinado aplicando  $10^6$  permutaciones y corregido para la edad y sexo tanto para todo el grupo como para los dos subgrupos.

Se encontró una asociación con valores de p de  $< 0,001$  solamente en el subgrupo que incluye pacientes que recibieron fármacos que fueron sustratos de P-gp. Los SNPs implicados fueron rs2235067, rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs2032583, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs2235040, rs12720067 y rs2235015.

Este análisis de asociación para todos los SNPs polimórficos y los fenotipos se llevó a cabo según el método del producto de Fisher (FPM) (Fisher, 1932) para los modelos genotípico y alélico. La corrección para un ensayo múltiple se llevó a cabo usando el método de P mínimo de Westfall y Young (1993). La Tabla 4 muestra los valores de p de FMP con respecto a todos los SNPs, clasificados mediante fenotipos y modelos, así como con respecto a todos los SNPs y todos los fenotipos, clasificados mediante modelo y los valores de p corregidos mediante Westfall-Young. En el grupo de pacientes que toman sustratos de P-gp existen asociaciones muy significativas entre la variabilidad genética de los SNPs ensayados y tanto la remisión de los síntomas depresivos en las semanas 4, 5 y 6 como la combinación de estas variables de remisión. En este grupo de pacientes, los valores de p corregidos mediante Westfall y Young a lo largo de todos los SNPs y fenotipos fueron 0,00040 y 0,00016 para el análisis genotípico y alélico. En el grupo de pacientes que toman fármacos que no son sustratos de P-gp, no hubo ninguna asociación significativa.

Esto se ilustra en la Figura 2, que presenta la distribución genotípica del SNP rs2032583 para pacientes que remitieron después de 4 semanas, y aquellos que no lo hicieron. En el grupo de pacientes que reciben antidepresivos que son sustratos de P-gp, hubo claras diferencias en la distribución genotípica entre remitentes y no remitentes (Fig. 2A). Mientras que en el grupo de pacientes no remitentes que poseen el alelo C constituyeron el 9,5%, este porcentaje en el grupo de pacientes remitentes fue 45%. El ensayo de Cochran-Armitage de tabla 2 x 3 produjo una chi-cuadrado de 15,8,  $p = 0,00007$  para pacientes que recibieron los sustratos de P-gp, y una chi-cuadrado de 0,004,  $p = 0,945$  para pacientes que recibieron un sustrato no de P-gp. Si los portadores de C se tratan con fármacos que son sustratos de P-gp, tienen un riesgo aproximado relativo claramente mayor para la remisión después de 4 semanas. La razón de momios (riesgo relativo aproximado) fue 7,72 (límites de intervalo de confianza de 95% 2,80 y 21,32) con  $p = 0,000065$  en el ensayo exacto de Fisher de tabla 2 x 2. Para cualquier resultado del ensayo negativo particular (no portador), la probabilidad de que fuese falso negativo (sin remisión) fue 81,5%.

Para pacientes que reciben sustratos no de P-gp no hubo diferencias en la distribución genotípica entre remitentes y no remitentes (Fig. 2B). La razón de momios fue 1,12 (límites de intervalo de confianza de 95% 0,38 y 3,37) con  $p = 1$  en el ensayo exacto de Fisher.

5 Para una presentación mejor del desarrollo de la remisión hasta la semana 6, se llevó a cabo un análisis de supervivencia (regresión de Cox). La Fig. 3 muestra la disminución en los no remitentes, es decir, pacientes que todavía están enfermos, para todos los pacientes y los dos subgrupos durante las primeras 6 semanas dependiendo de su genotipo. Para rs2032583, se hizo una distinción entre portadores de C y no portadores; para 2235015 se distinguió entre portadores de T y no portadores. El grupo de pacientes tratados con un sustrato de P-gp muestra 10 claras diferencias dependiendo del genotipo. Por ejemplo, tras 6 semanas, el 62% de los pacientes que no son portadores de C del SNP rs2032583 no habían remitido, mientras que éste fue el caso en sólo 25% de los portadores de C.

15 Para todos los SNPs que muestran una asociación muy significativa entre genotipo y remisión en el FMP, se llevó a cabo una regresión de Cox; los valores de la estadística de Wald y los valores de  $p$  se muestran en la Tabla 5. En el grupo de pacientes que recibió fármacos que son sustratos de P-gp, hubo una diferencia significativa para todos los SNPs ensayados (valores de  $p < 0,0025$ ). El subgrupo de pacientes que toman un antidepresivo en el que sus concentraciones cerebrales no están influidas por P-gp no mostraron ninguna diferencia.

#### Desequilibrio de ligamiento en *ABCB1*

20 En un intento para estrechar la región de *ABCB1* que contiene la variante etiológica, se analizó la estructura del desequilibrio de ligamiento (LD) de *ABCB1* usando HAPLOVIEW (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>). Este análisis incluyó todos los pacientes. Aplicando el método de Gabriel et al. (2002) para la delineación de los bloques haplotípicos, se identificó un total de 7 bloques (Fig. 4).

25 Los 11 SNPs que mostraron una asociación muy significativa entre genotipo y remisión en el FMP están marcados con una flecha. Los SNPs enlazados rs2235067, rs4148740, rs2032583, rs4148739, rs11983225, rs2235040, rs12720067, así como los SNPs rs7787082 y rs10248420, mostraron una  $r^2$  de  $> 0,8$ . Los SNPs rs10280101 y rs2235015 no se incluyeron en ningún etiquetado con una  $r^2$  de  $> 0,8$ .

#### Genotipo, niveles plasmáticos de antidepresivo y dosificación

30 Para excluir la posibilidad de que el efecto observado se base únicamente en diferencias en la dosis de fármaco administrada o en la captación intestinal, y para apoyar la hipótesis de que las diferencias relacionadas con el genotipo en la respuesta del tratamiento están ligadas a diferencias en las concentraciones intracerebrales de fármaco, se examinó si hubo diferencias significativas en las dosis y niveles plasmáticos de amitriptilina, citalopram, paroxetina, venlafaxina y mirtazapina entre los genotipos de SNPs significativos.

35 Para este fin, se crearon dos residuos de regresión lineal con la variable dependiente dosis de fármaco o concentración plasmática, y las variables independientes edad y género. Estos residuos y los datos de genotipado de SNP se ensayaron en un análisis de ANOVA en busca de diferencias estadísticas entre los genotipos. Los valores de  $p$  empíricos se calcularon aplicando  $10^6$  permutaciones (residuos redistribuidos al azar a lo largo de los genotipos). El método de producto de Fisher (FMP) incluye los restos de las variables de dosis o concentración plasmática y las variables genotípicas de los SNPs rs2235067, rs4148740, rs2032583, rs4148739, rs11983225, rs2235040, rs12720067, rs7787082, rs10248420, rs10280101 y rs2235015.

40 No se encontraron diferencias significativas en las dosis de amitriptilina, citalopram, paroxetina, venlafaxina y mirtazapina entre los genotipos de SNP estudiados, ni se encontraron diferencias dependientes del genotipo en los niveles plasmáticos de pacientes que recibieron amitriptilina, paroxetina, venlafaxina o mirtazapina. Sin embargo, se pudo detectar una pequeña diferencia significativa para niveles plasmáticos de citalopram. Aunque el producto de Fisher en todos los SNPs y fenotipos fue  $p = 0,023$  para los genotipos, los niveles plasmáticos de pacientes que muestran menos éxito del tratamiento fueron mayores.

#### 45 Asociación de caso-control

50 Se genotipó un grupo de control de 362 sujetos para rs2032583 y rs2235015, los SNPs representativos en los bloques haplotípicos en el mapa de LD (Fig. 4). Los sujetos se seleccionaron al azar de una muestra de comunidad en Munich, y fueron negativos para trastornos psiquiátricos eje I de tiempo de vida (M-CIDI) y enfermedades somáticas graves. Los controles no difirieron de la muestra de pacientes con respecto a la distribución de género ( $p = 0,603$ ), edad ( $p = 0,322$ ) o etnia (100% caucásicos en ambas muestras,  $p = 1$ ). Se llevaron a cabo ensayos genotípicos usando el ensayo exacto de Fisher en una tabla  $2 \times 3$ . No se observó ninguna asociación significativa de casos-contróles para rs2032583 y rs2235015 (ensayo exacto de Fisher,  $p = 0,669$  y  $0,351$ ).

#### Discusión

55 Los presentes resultados proporcionan por primera vez pruebas de que las variantes genéticas en el gen *ABCB1* dan cuenta de las diferencias en la eficacia clínica de antidepresivos muy probablemente mediante la influencia en

su acceso al cerebro. Aquí se da a conocer que la remisión de los síntomas depresivos inducida por antidepresivos se predice mediante SNPs en el gen *ABCB1* entre aquellos pacientes depresivos que fueron tratados con fármacos que son sustratos de la glucoproteína P codificada por *ABCB1*. Para identificar si los antidepresivos administrados a los pacientes son sustratos o no de la glucoproteína P, se estudiaron mutantes de ratón que carecen de los homólogos de ratón del gen *ABCB1*. Mientras que P-gp es codificada por un único gen en seres humanos (*ABCB1*), hay dos homólogos en ratones, los genes *abcb1a* y *abcb1b* (Devault y Gros, 1990). Aunque *abcb1a* y *abcb1b* no siempre son expresados en los mismos órganos, la distribución global de estos genes en el tejido de ratón coincide con la del gen único *ABCB1* en seres humanos, indicando que *abcb1a* y *abcb1b* funcionan juntos de la misma manera en ratones que *ABCB1* humano (Meijer et al., 1998; van de Vrie et al., 1998). Todavía no ha sido posible predecir la afinidad de un sustrato por la glucoproteína P a partir de su estructura química, hidrofobia, lipofilia o carga. Usando este modelo de ratón, ya se pudo demostrar en estudios previos que citalopram, venlafaxina, paroxetina y amitriptilina, después de una única administración, fueron sustratos de P-gp en la barrera hematoencefálica, mientras que mirtazapina y fluoxetina no lo son (Uhr et al., 2000, 2003, 2007; Uhr y Grauer, 2003; Grauer y Uhr, 2004).

En este estudio, los fármacos se administraron durante un período de tiempo prolongado para investigar la interacción dependiente del tiempo del fármaco y P-gp. Se demuestra que dos antidepresivos estructuralmente diferentes citalopram (un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina) y venlafaxina (un inhibidor combinado de la recaptación de serotonina y norepinefrina) fueron ambos sustratos de P-gp en la BBB, puesto que aumentó la concentración cerebral de fármaco en los mutantes que no poseen los genes para codificar P-gp (Tabla 2, Fig. 1). Por el contrario, la penetración de mirtazapina (que selecciona como dianas a receptores de serotonina 2C y alfa2A-adrenérgicos) en el cerebro no está influida por P-gp. El papel importante de P-gp estuvo apoyado además por el hecho de que las concentraciones de fármacos y de metabolitos en los órganos y las relaciones órgano/plasma de todos los antidepresivos investigados no difirió entre parejas de camada mutantes y de tipo salvaje en aquellos órganos que carecen completamente de P-gp o en los que P-gp no es expresada en células endoteliales, tales como el bazo, riñón, hígado y pulmón. Estos resultados muestran que algunos pero no todos los antidepresivos son sustratos de P-gp en ratones. En este estudio, los antidepresivos se administraron durante 11 días, y se encontró que la especificidad del sustrato es similar a la observada tras la administración aguda (Uhr et al., 2000, 2003; Uhr y Grauer, 2003), indicando que la especificidad o actividad del sustrato de P-gp no cambia con el tiempo.

Para responder la cuestión de si las diferencias en el acceso de antidepresivos en el cerebro pueden influir en el transcurso del tratamiento y en el resultado, se llevó a cabo un estudio clínico en el que se investigó la variabilidad genética del gen *ABCB1* de 443 pacientes hospitalizados con trastorno depresivo que reciben antidepresivos. Los pacientes se dividieron en dos grupos, aquellos que reciben fármacos que han demostrado ser sustratos de P-gp en la BBB (amitriptilina, citalopram, paroxetina y venlafaxina) y aquellos que recibieron mirtazapina, que no es un sustrato.

Numerosos documentos describen polimorfismos en *ABCB1* (Kioka et al., 1989; Stein et al., 1994; Mickley et al., 1998; Hoffmeyer et al., 2000; Kim et al., 2001; Ito et al., 2001; Cascorbi et al., 2001; Tanabe et al., 2001; Eichelbaum et al., 2004), y en las bases de datos públicas de SNP se numera una multitud de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

Se investigaron 95 SNPs, 74 de los cuales fueron polimórficos (distancia media entre marcadores: 3,5 kb), y de este modo se incluyeron en la evaluación estadística. La variabilidad genética de todos los SNPs polimórficos y la recuperación de los síntomas depresivos se examinó en un modelo de resumen usando el método de producto de Fisher. Tras la corrección para el ensayo múltiple, se encontró una asociación muy significativa entre los genotipos o frecuencias alélicas del gen *ABCB1* y la remisión en las semanas 4, 5 y 6 solamente en pacientes que reciben sustratos de P-gp (Tabla 3). Para una mejor presentación del progreso clínico e implicación de todo el período hasta la semana 6, incluyendo todos los pacientes enrolados en el estudio, se llevó a cabo un análisis de supervivencia de regresión de Cox. Como se demostró en la Fig. 3 y en la Tabla 4, sólo los pacientes que recibieron sustratos de P-gp mostraron diferencias de parámetros diana muy significativas, dependientes de los genotipos, durante el progreso clínico, logrando una remisión con una puntuación de <10 en el HAM-D (Fig. 3, Tabla 4).

Principalmente responsables de esta asociación fueron los SNPs rs2235067, rs4148740, rs10280101, rs7787082, rs2032583, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs2235040, rs12720067 y rs2235015, que muestran valores de p de < 0,001 en el análisis de ANOVA (Tabla 3). En un intento por estrechar la región de *ABCB1* que provoca posiblemente la respuesta diferencial, se analizó la estructura de desequilibrio de ligamiento (LD) de *ABCB1* usando HAPLOVIEW. Con la excepción de rs2235015, todos los SNPs muy asociados estuvieron localizados en un único bloque haplotípico (Fig. 4), y los SNPs rs2235067, rs4148740, rs2032583, rs4148739, rs11983225, rs2235040, rs12720067, así como los SNPs rs7787082 y rs10248420, mostraron un  $r^2$  de > 0,8 entre sí. Todos los SNP muy asociados están situados en intrones y con un D' de más de 90% en el desequilibrio de ligamiento (LD) con los SNPs exónicos mejor examinados rs1045642 (C3435T), rs2032582 (G2677T) y rs1128503 (C1236T). Tanto en los SNPs sinónimos rs2032582 (exón 21) y rs1128503 (exón 12) como el SNP no sinónimo rs1045642 (exón 26), las variabilidades genéticas conocidas dan como resultado diferentes funciones de P-gp (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Sin embargo, los valores de  $r^2$  son comparativamente bajos (en el intervalo de 15%), y no hay asociación significativa entre estos SNPs en los exones y la remisión.

Como se ejemplifica en la Fig. 2 para el SNP rs2232583, la distribución genotípica difiere entre el grupo de pacientes con remisión frente al grupo sin remisión entre pacientes tratados durante 4 semanas con un sustrato de P-gp (ensayo de Cochran-Armitage,  $p = 0,00007$ ). La probabilidad de una remisión de la depresión tras 4 semanas aumenta para portadores de C tratados con sustratos de P-gp (razón de momios: 7,72,  $p = 0,000065$ ). Por el contrario, fue predecible que los pacientes que poseen el genotipo TT no remitirán después de un período de tratamiento de 4 semanas. En el grupo de pacientes que reciben el no sustrato mirtazapina no hubo diferencia encontrada entre los genotipos de remitentes y no remitentes. Las características de los grupos para el SNP representativo rs2032583, dependiendo del genotipo, no difirieron entre los dos subgrupos “pacientes tratados con sustratos de P-gp” y “pacientes tratados con sustratos no de P-gp” (Tabla 6).

El análisis de regresión de Cox no reveló diferencias significativas para la remisión ( $HAM-R < 10$ ) en las primeras 6 semanas (valor de Wald = 0,125; sig = 0,72) entre el subgrupo de pacientes que reciben fármacos que son sustratos de P-gp y el subgrupo de pacientes que reciben fármacos que no son sustratos de P-gp, permitiendo rechazar la posibilidad de que las diferencias en la eficacia farmacéutica dan cuenta de nuestros hallazgos diferentes. De hecho, los fármacos usados aquí demostraron ser especialmente eficaces según estudios comparativos grandes, requeridos para la aprobación. Es solamente la consideración combinada tanto del genotipo *ABCB1* del paciente como el estado de la medicación de sustrato de P-gp lo que identifica un grupo de pacientes que muestra una tasa de remisión claramente mejor que las poblaciones de pacientes ensambladas en base al genotipo del paciente o al estado de medicación de sustrato de P-gp solo.

Se ha dado a conocer que los SNPs en *ABCB1* influyen la captación intestinal y de este modo los niveles plasmáticos de fármacos (Hoffmeyer et al., 2000; Brinkmann, 2002; Sakaeda et al., 2003). Sin embargo, las diversas tasas de remisión dependientes de genotipos encontradas en este estudio no fueron debidas a dosis o niveles plasmáticos de fármaco diferentes, lo que subraya que la monitorización de niveles plasmáticos de antidepresivos no es fiable para predecir la idoneidad del tratamiento.

Recientemente, McMahon et al. (2006) dieron a conocer que los afroamericanos respondieron menos adecuadamente a un antidepresivo consolidado que los caucásicos. Atribuyeron esta diferencia a la mayor frecuencia global del alelo A en un SNP específico en el gen del receptor de serotonina 2 A. En este contexto, es notable que también en el gen *ABCB1* y particularmente en los SNPs se dio a conocer que, en la predicción del resultado del tratamiento, se produce una considerable variabilidad étnica (Kim, 2002; Tang et al., 2002, 2004; Kroetz et al., 2003). De este modo, el actual hallazgo indica que los genotipos *ABCB1* variantes contribuyen a diferencias en el resultado del tratamiento a lo largo de grupos étnicos, y alienta adicionalmente estudios para elucidar las implicaciones clínicas de estas diferencias a lo largo de grupos étnicos.

La conclusión general a extraer es que cualquier fármaco administrado para tratar enfermedades del SNC debería ser analizado para determinar su estatus de sustrato de P-gp, que se puede determinar usando ratones carentes del gen *abcb1ab*. Desde el punto de vista clínico, los hallazgos garantizan que los pacientes que reciben un fármaco que es un sustrato de P-gp para el tratamiento de enfermedades mentales son genotipados para excluir la posibilidad de que un paciente recibe un fármaco que no entra en el SNC en un grado requerido para su eficacia. La combinación de la monitorización farmacéutica terapéutica (TDM) que implica la captación entérica de fármaco y el metabolismo farmacéutico del citocromo P450, y el genotipado de P-gp para detectar la biodisponibilidad del fármaco en el cerebro, puede predecir la respuesta de un paciente individual a cierto fármaco. Finalmente, la interdependencia de la capacidad del sustrato de P-gp y el genotipo *ABCB1* necesita ser considerada en el desarrollo futuro de SNC, debido a que los fármacos que difieren en su capacidad como sustrato de P-gp necesitan ser evaluados en ensayos clínicos en los que las poblaciones de estudio se estratifican según el genotipo *ABCB1*.

Tablas:

Tabla 1: Inhibidores y moduladores de *ABCB1*

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Antiácidos			
Cimetidina	x		
Lansoprazol	x	x	
Omeprazol		x	
Pantoprazol		x	
Ranitidina	x		
Antiarrítmicos			
Amilorida	x	x	

Tabla 1: Inhibidores y moduladores de ABCB1

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Amiodarona		x	
Bamidipina		x	
Benidipina		x	
Bepidilo		x	
Digitoxina	x		
Digoxin	x		
Efonidipina		x	
Manidipina			
Niguldipina		x	
Nilvadipina		x	
Propafenona		x	
Propranolol		x	
Quinidina	x	x	
Verapamilo	x	x	
Antibióticos			
Amoxicilina	x		
Ceftriaxona		x	
Ciprofloxacina	x		
Claritromicina		x	
Enoxacina	x		
Eritromicina	x	x	
Fucidina		x	
Josamicina		x	
Levofloxacina	x		
Ofloxacina	(x)	x	
Rifampina	x		x
Sparfloxacina	x		
Tetraciclina	x		
Agentes contra el cáncer			
Actinomicina D	x		
Adriamicina	x		
Agentes contra el cáncer			
Azidopina	x	x	
Daunorrubicina	x		

Tabla 1: Inhibidores y moduladores de ABCB1

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Docetaxel	x		
Doxorrubicina	x		x
Epirubicina	x		
Etopósido	x		
Gramicidina		x	
Imatinib	x		
Irinotecán	x		
Mitomicina C	x	(x)	
Mitoxantrona	x		
Paclitaxel	x	x	
Quercetina		x	
Tenipósido	x		
Topotecán	x		
Valinomicina		x	
Vinblastina	x		
Vincristina	x		
Vindesina	x		
Vinorelbina	x		
Antidepresivos			
Amitriptilina	x		
Citalopram	x	x	
Desipramina		x	
Doxepina	x		
Flesinoxan	x		
Fluoxetina		x	
Fluvoxamina		x	
Imipramina		x	
Maprotilina		x	
Nefazodona		x	(x)
Nortriptilina	x		
Paroxetina		x	
Reboxetina		x	
Sertralina		x	
Hipérico			x

Tabla 1: Inhibidores y moduladores de ABCB1

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Trazodona			(x)
Trimipramina	x	x	
Venlafaxina	x	x	
Antiémticos			
Domperidona	x		
Ondansetrón	x		
Antiepilépticos			
Carbamazepina	x		
Felbamato	x		
Lamotrigina	x		
Fenobarbital	x		
Fenitoína	x		
Agentes antihipertensivos			
Carvedilol		x	
Celiprolol	x		
Diltiazem	x		
Doxazosina		x	
Felodipina		x	
Losartán	x		
Mibefradilo	x	x	
Nifedipina		x	
Nicardipina		x	
Nitrendipina		x	
Prazosina			x
Reserpina		x	
Talinolol	x		
Antimicóticos			
Fluconazol			
Itraconazol	x	x	
Ketoconazol		x	
Antiparkinsonianos			
Amantadina			
Budipin	x		
L-Dopa	x		



Tabla 1: Inhibidores y moduladores de ABCB1

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Agentes antivirales			
Amprenavir	x		x
Indinavir	x	x	x
Lopinavir		x	x
Nelfinavir	x	x	x
Ritonavir	x	x	x
Saquinavir	x	x	x
Glucocorticoides			
Aldosterona	x		
Cortisol	x		
Dexametasona	x		x
Hidrocortisona	x		
Metilprednisolona	x		
Inmunosupresores			
Ciclosporina	x	x	
FK 506		x	
Metotrexato			
Rapamicina	x	x	
Sirolimus	x	x	
Tacrolimus	x	x	
Tamoxifeno		x	
Valspodar (PSC833)	x	x	
Inmunosupresores			
Vinblastina		x	
Estatinas			
Atorvastatina	x	x	
Lovastatina		x	
Simvastatina		x	
Neurolépticos			
Clorpromazina		x	
Clozapina			
Droperidol		x	
Flupentixol		x	
Flufenazina		x	

Tabla 1: Inhibidores y moduladores de ABCB1

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Haloperidol		(x)	
Melperon			
Olanzapina	(x)		
Fenotiazina		x	x
Pimozida		x	
Proclorpemazina		x	
Prometazina		x	
Quetiapina	x		
Risperidona	x		
Sulpirida	x		
Tioridazina		x	
Trifluoperazina		x	
Triflupromazina		x	
Opioides			
Alfentanilo		x	
Fentanilo	x	x	
Metadona		x	
Morfina	x		x
Pentazocina		x	
Sufentanilo		x	
Tensioactivos			
Cremophor EL		x	
Triton X-100		x	
Tween 80		x	
Otros			
Albendazol			
Anticuerpo anti-CD19		x	
Azelastina		x	
Bilirrubina	x		
Bisantreno	x		
Bromocriptina		x	
Bunitrolol	x		
Celiprolol	x		
Cloroquina		(x)	

Tabla 1: Inhibidores y moduladores de ABCB1

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Otros			
Clorfeniramina			
Colesterol	x	x	
Colchicina	x		
Cortexolona			
Ciproheptadina		x	
Debrisoquina	x		
Dihidrotestosterona	x		
Dipiridamol		x	
DM27			
DM40			
E6		x	
Emetina		x	
EP 51389		x	
Estradiol	x		
Fexofenadina	x		
Flavinoideos		x	
Flunitrazepam			
Ajo		x	
GF120918		x	
Ginsenoide		x	
Uva		x	(x)
Té verde		x	x
H2O2			x
Ivermectina	x		
Lidocaína		x	
Lonafamib (SCH66336)		x	
Loperamida	x		
Loratadina	(x)	(x)	
Mefloquina	x	x	
Midazolam	x	(x)	
Nobilitina		x	
Zumo de naranja de Sevilla		x	
Piperina		x	

Tabla 1: Inhibidores y moduladores de ABCB1

Sustancia	Sustrato	Inhibidor	Inductor
Probenecida		x	
Progesterona		x	
Quinacrina		x	
Quinina		x	
Ácido retinoico			x
Rodamina 123	x		
RU 486		x	
Espironolactona		x	
Sumatriptán			
Terfenadina	x	x	
1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina	x		
Tetrandrina		x	
Hormonas tiroideas	x	x	
TNF alfa		x	
Bilirrubina no conjugada	x		x
Vandato		x	
Otros			
Vecuronium	x		
Vitamina A			x
XR9576		x	
Yohimbina		x	
Zosuquidar.3HCl		x	
Elacridar (GF120918)		x	
LY335979		x	
Tariquidar (XR9576)		x	

Tabla 2: Concentraciones en órganos de fármacos antidepresivos y sus metabolitos tras 11 días de administración subcutánea vía bombas osmóticas.

Citalopram [ng/g o ml]						
	<i>abcb1ab</i> (-/-)	SEM	control	SEM	relación (-/-)/ (+/+)	Significancia
plasma	89,37	8,65	106,71	7,60	0,8	ns
Cerebro	480,93	27,39	158,27	15,84	3,0	*
Bazo	468,29	42,16	446,96	46,93	1,0	ns
Riñón	795,74	50,39	962,29	87,92	0,8	ns

ES 2 394 529 T3

Hígado	240,33	16,40	238,02	18,46	1,0	ns
Pulmón	1238,47	124,86	1238,71	105,37	1,0	ns
Testículos	687,92	28,30	428,19	35,05	1,6	*
Efecto de grupo: F(7,8)=35,4; significancia de F<0,001						
Venlafaxina [ng/g o ml]						
	<i>abcb1ab</i> (-/-)	SEM	control	SEM	relación (-/-)/ (+/+)	significancia
plasma	70,57	4,22	71,37	3,34	1,0	ns
Cerebro	456,32	19,76	261,14	9,54	1,7	*
Bazo	564,20	23,00	581,95	11,31	1,0	ns
Riñón	1054,88	37,58	1035,27	23,67	1,0	ns
Hígado	323,22	17,09	314,59	22,03	1,0	ns
Pulmón	672,59	36,14	747,38	36,16	0,9	ns
Testículos	842,61	9,88	715,92	21,29	1,2	*
Efecto de grupo: F(7,8)=30,7; significancia de F<0,001						
D-Venlafaxina [ng/g o ml]						
	<i>abcb1ab</i> (-/-)	SEM	control	SEM	relación (-/-)/ (+/+)	significancia
plasma	5,98	0,70	5,50	1,12	1,1	ns
Cerebro	36,99	4,86	8,97	2,57	4,1	*
bazo	33,80	3,42	29,42	3,76	1,1	ns
Riñón	127,32	22,51	107,88	12,72	1,2	ns
Hígado	88,22	10,60	83,15	8,15	1,1	ns
Pulmón	44,91	3,85	50,63	7,09	0,9	ns
Testículos	39,19	2,64	30,18	4,01	1,3	ns
Efecto de grupo: F(7,8)=4,8; significancia de F=0,022						
Mirtazapina [ng/g o ml]						
	<i>abcb1ab</i> (-/-)	SEM	control	SEM	relación (-/-)/ (+/+)	significancia
plasma	11,17	1,19	7,66	1,59	1,5	ns
Cerebro	51,31	4,84	34,90	6,20	1,5	ns
bazo	86,19	10,75	67,54	14,27	1,3	ns
Riñón	91,22	9,75	70,93	13,29	1,3	ns
Hígado	20,59	2,14	12,39	2,43	1,7	ns
Pulmón	105,36	9,64	61,47	11,75	1,7	ns
Testículos	110,29	12,14	61,22	11,59	1,8	ns

ES 2 394 529 T3

intestino	24,58	2,61	19,96	3,33	1,2	ns
Efecto de grupo: F(8,9)=3,0; significancia de F=0,58						
* =diferencia significativa; ns= no significativa						

Tabla 3: Análisis de ANOVA de la asociación entre remisión y valores de p empíricos de SNPs del análisis de ANOVA determinado aplicando  $10^6$  permutaciones y corregido para edad y sexo tanto para todo el grupo (todos los pacientes) como para los dos subgrupos de pacientes que recibieron amitriptilina, citalopram, paroxetina o venlafaxina (sustratos de P-gp) o mirtazapina (sustrato no de P-gp)

5

dbSNP ID	Todos los pacientes, Remisión (HRS < 10)				Remisión para sustratos de P-gp (HRS < 10)				Remisión para sustratos no de P-gp (HRS < 10)			
	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6
rs4148809	267	0,199	0,466	0,313	93	0,477	0,344	0,803	70	0,582	0,156	0,574
rs2888611	268	0,980	0,907	0,826	94	0,671	0,114	0,179	70	0,777	0,926	0,658
rs6979325	268	0,282	0,134	0,355	94	0,020	0,045	0,037	70	1,000	1,000	1,000
rs2178658	268	0,760	0,687	0,870	94	0,754	0,856	0,938	70	0,498	0,091	0,662
rs7789645	269	0,919	0,864	0,755	94	0,779	0,156	0,242	70	0,777	0,926	0,658
rs7793196	268	0,929	0,872	0,827	94	0,779	0,156	0,242	70	0,779	0,924	0,944
rs1055302	270	0,181	0,374	0,400	96	0,531	0,513	0,529	70	0,658	0,445	0,568
rs17064	215	0,362	0,901	0,377	79	0,132	0,516	0,227	59	0,837	0,310	0,423
rs2235048	353	0,427	0,010	0,482	112	0,280	0,108	0,164	85	0,861	0,477	0,331
rs1045642	351	0,316	0,044	0,483	112	0,240	0,204	0,119	85	0,860	0,473	0,268
rs6949448	268	0,593	0,046	0,594	94	0,239	0,188	0,224	70	0,196	0,048	0,728
rs7779562	344	0,423	0,406	0,277	110	0,434	0,866	0,482	84	0,325	1,000	1,000
rs2235067	272	0,047	0,0085	0,978	97	0,000075	0,0033	0,030	70	0,902	0,0024	0,927
rs4148744	229	0,465	0,577	0,967	84	0,368	0,879	0,485	62	0,475	1,000	1,000
rs4148743	228	0,351	0,046	0,500	84	0,387	0,437	0,174	61	0,770	0,362	0,510
rs4148740	267	0,123	0,030	0,756	93	0,000031	0,0048	0,011	70	0,442	0,017	0,759
rs10280101	264	0,217	0,052	0,770	92	0,000056	0,013	0,0053	69	0,444	0,018	0,732
rs7787082	265	0,035	0,011	0,497	91	0,000048	0,00011	0,0052	70	0,526	0,069	0,807
rs2032583	355	0,049	0,0038	0,221	114	0,000034	0,0035	0,016	86	0,658	0,003	0,931
rs2032582	268	0,294	0,171	0,956	94	0,251	0,450	0,276	68	0,538	0,197	0,837
rs4148739	268	0,118	0,028	0,756	93	0,000031	0,0048	0,011	71	0,460	0,016	0,759
rs11983225	265	0,111	0,031	0,742	91	0,000036	0,0061	0,012	70	0,442	0,017	0,844
rs4148738	344	0,287	0,023	0,890	110	0,212	0,059	0,125	84	0,095	0,109	0,771
rs10248420	264	0,039	0,010	0,566	91	0,00010	0,00021	0,010	69	0,596	0,046	0,807
rs2235040	266	0,019	0,038	0,846	93	0,0000070	0,0016	0,012	67	0,983	0,012	0,934
rs12720067	211	0,124	0,029	0,719	92	0,000021	0,0059	0,0023	71	0,460	0,016	0,759
rs1922242	228	0,487	0,844	0,821	82	0,252	0,725	0,859	61	0,052	0,741	0,708
rs2235046	355	0,132	0,041	0,941	113	0,137	0,063	0,072	86	0,177	0,124	0,816

ES 2 394 529 T3

dbSNP ID	Todos los pacientes, Remisión (HDRS < 10)				Remisión para sustratos de P-gp (HDRS < 10)				Remisión para sustratos no de P-gp (HORS < 10)			
	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6
rs2235013	268	0,381	0,023	0,400	93	0,057	0,147	0,280	71	0,566	0,056	0,324
rs2235035	249	0,877	0,672	0,252	87	0,564	0,602	0,399	64	0,446	0,433	0,355
rs2235033	344	0,135	0,043	0,830	110	0,087	0,104	0,312	84	0,209	0,042	0,374
rs2032588	227	0,562	0,654	0,046	82	0,352	0,854	0,356	60	0,351	0,290	0,135
rs1128503	270	0,252	0,033	0,446	94	0,144	0,129	0,140	71	0,263	0,045	0,605
rs2229109	262	0,545	0,277	0,084	93	0,560	0,468	1,000	63			
rs10276036	269	0,246	0,031	0,426	94	0,144	0,129	0,140	71	0,263	0,045	0,605
rs 1922240	269	0,939	0,203	0,163	94	0,645	0,262	0,323	71	0,259	0,856	0,190
rs2235023	269	0,399	0,798	0,470	94	0,763	0,452	0,273	68	0,818	0,768	0,503
rs1202169	355	0,170	0,062	0,816	113	0,185	0,090	0,109	86	0,411	0,088	0,692
rs1202168	270	0,383	0,100	0,799	94	0,200	0,163	0,177	68	0,565	0,170	0,831
rs1202167	227	0,557	0,030	0,502	83	0,264	0,191	0,179	62	0,860	0,278	0,882
rs2235019	228	0,496	0,406	0,067	84				62			
rs2235017	229	0,685	0,596	0,448	84				62			
rs2235015	350	0,155	0,0043	0,029	113	0,0015	0,0013	0,00026	85	0,810	0,051	0,520
rs6950976	267	0,728	0,902	0,141	93	0,354	0,956	0,492	70	0,566	0,499	0,417
rs10256836	268	0,815	0,892	0,126	94	0,475	0,942	0,460	70	0,556	0,540	0,359
rs10264990	265	0,758	0,881	0,112	91	0,676	0,646	0,224	70	0,685	0,341	0,988
rs1202179	272	0,393	0,085	0,250	97	0,115	0,214	0,039	70	0,362	0,030	0,083
rs1989831	228	0,413	0,049	0,057	83	0,096	0,249	0,028	62	0,507	0,062	0,160
rs1202172	355	0,555	0,127	0,285	114	0,074	0,033	0,0071	86	0,192	0,040	0,083
rs1202171	271	0,412	0,092	0,266	96	0,125	0,240	0,046	70	0,362	0,029	0,083
rs17327442	267	0,921	0,442	0,227	93	0,805	0,449	0,451	70	0,414	0,727	0,201
rs4148733	227	0,786	0,468	0,103	82	0,610	0,376	0,548	62	0,396	0,724	0,223
rs1202186	225	0,420	0,061	0,076	82	0,209	0,152	0,014	62	0,507	0,062	0,160
rs1202185	228	0,413	0,049	0,057	83	0,096	0,249	0,028	62	0,507	0,062	0,160
rs1202182	228	0,413	0,050	0,057	83	0,096	0,249	0,028	62	0,499	0,061	0,158
rs1202181	200	0,722	0,031	0,080	77	0,087	0,085	0,0049	51	0,358	0,045	0,686
rs2188525	269	0,854	0,955	0,509	94	0,903	0,405	0,584	71	1,000	1,000	1,000
rs2235074	226	0,551	0,553	0,991	81	0,337	0,677	0,524	60	1,000	1,000	1,000
rs2214102	202	0,226	0,237	0,247	75	0,151	0,263	0,261	54	0,447	0,366	1,000
rs4728709	237	0,261	0,742	0,661	91	0,475	0,637	0,862	70	0,777	0,343	0,462
rs4148731	227	0,136	0,560	0,782	83				61			
rs4148730	226	0,132	0,698	0,700	80				62			
rs13233308	267	0,146	0,968	0,453	93	0,308	0,604	0,585	70	0,256	0,173	0,138

dbSNP ID	Todos los pacientes, Remisión (HRS < 10)				Remisión para sustratos de P-gp (HRS < 10)				Remisión para sustratos no de P-gp (HRS < 10)			
	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6	N	Semana 4	Semana 5	Semana 6
z54148729	229	0,133	0,560	0,782	84				62			
rs10264856	339	0,097	0,595	0,672	110	0,265	0,380	0,853	83	0,754	1,000	1,000
rs2157926	228	0,369	0,633	0,772	81	0,171	0,535	0,836	63	0,782	1,000	1,000
rs10246878	269	0,761	0,237	0,583	94	0,520	0,975	0,869	71	0,744	0,019	0,047
rs10267099	344	0,813	0,483	0,922	110	0,365	0,647	0,791	84	0,634	0,109	0,314
rs7796247	344	0,068	0,487	0,954	110				84			
rs2188529	221	0,160	0,794	0,548	81				59			
rs4148727	220	0,133	0,560	0,782	80				62			
rs10275625	333	0,068	0,487	0,954	110				84			

Tabla 4: Producto de Fisher y análisis de Westfall/Young

Se llevó a cabo un análisis de todos los SNPs polimórficos y fenotipos según el método del producto de Fisher (FPM) para los modelos genotípico y alélico. Para FPM, puesto que se formó una única estadística, no es necesario ninguna corrección adicional para el ensayo múltiple. También se da el resultado para la P mínima de Westfall y Young, que es un método más convencional para controlar la tasa de error en forma de familia.

Producto de Fisher y corrección de Westfall/Young en todos los SNPs							
	Todos los pacientes		Sustratos de P-gp		Sustratos no de P-gp		
Remisión	Producto de Fisher	Westfall/Young	Producto de Fisher	Westfall/Young	Producto de Fisher	Westfall/Young	
4 semanas Genotípico	0,191	0,466	0,00034	0,00011	0,775	0,712	
4 semanas Alélico	0,136	0,678	0,00039	0,000048	0,565	0,829	
5 semanas Alélico	0,015	0,132	0,0084	0,0042	0,014	0,056	
5 semanas Genotípico	0,005	0,039	0,0019	0,0021	0,160	0,137	
6 semanas	0,513	0,615	0,0071	0,013	0,644	0,621	
6 semanas Alélico	0,327	0,233	0,0012	0,00049	0,904	0,856	
Producto de Fisher y corrección de Westfall/Young en todos los SNPs y en todos los fenotipos							
Genotípico	0,068	0,309	0,00036	0,00040	0,160	0,136	
Alélico	0,024	0,099	0,000094	0,00016	0,557	0,340	

Tabla 5: Análisis de regresión de Cox de la remisión dependiente del genotipo

Para todos los SNPs que muestran una asociación muy significativa entre genotipo y remisión en el FPM, se llevó a cabo una regresión de Cox y se muestran los valores de Wald y de p que evalúan portadores del alelo más raro frente a no portadores.

	Todos los pacientes		Sustratos de P-gp		Sustratos no de P-gp	
SNP	Wald	Valor de p	Wald	Valor de p	Wald	Valor de p
rs2235067	1,902	0,168	10,586	0,0011	0,214	0,644



rs4148740	1,938	0,164	14,424	0,00015	0,157	0,692
rs10280101	1,493	0,222	13,119	0,00029	0,115	0,734
rs7787082	3,126	0,077	9,115	0,0025	0,454	0,500
rs2032583	3,218	0,073	13,277	0,00027	0,758	0,384
rs4148739	1,991	0,158	14,424	0,00015	0,175	0,675
rs11983225	2,486	0,115	13,636	0,00022	0,440	0,507
rs1024842 0	3,374	0,066	9,115	0,0025	0,566	0,452
rs2235040	2,285	0,131	10,109	0,0015	0,353	0,552
rs12720067	2,624	0,105	15,289	0,000092	0,175	0,675
rs2235015	2,970	0,085	9,197	0,0024	0,008	0,931

Tabla 6: Características de grupo dependiente de genotipo para rs2032583

Las características de los grupos, el número de pacientes (% de mujeres), edad, HDRS en la inclusión, edad en el comienzo, duración de la enfermedad en años, episodios previos, número de hospitalizaciones anteriores, duración del episodio actual, etnia, co-medicación y diagnóstico se muestran para cada genotipo. Se investigó en un análisis ANOVA si había diferencias significativas entre los grupos CC, CT y TT (Sig). La Tabla muestra los resultados de todos los pacientes, pacientes que reciben sustratos de P-gp, y pacientes que reciben sustratos no de P-gp.

	CC	CT	TT	Sig.
<b>Todos los pacientes</b>				
N (% de mujeres)	7 (57,1%)	84 (55,9%)	344 (57,2%)	0,97
Edad	48 ± 4,3	48,6 ± 1,4	48,3 ± 0,8	0,98
HAM-D en la inclusión	30,7 ± 2,8	26,5 ± 0,7	26,4 ± 0,3	0,22
Edad en el comienzo	40,8 ± 6,8	38 ± 1,6	36 ± 0,8	0,44
duración de la enfermedad en años	7,1 ± 3,3	10,7 ± 1,2	12,3 ± 0,7	0,36
episodios previos	1,1 ± 0,5	3 ± 0,6	2,6 ± 0,2	0,58
hospitalizaciones anteriores	0,7 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,3	0,71
duración del actual	41,5 ± 8,5	38,4 ± 7,3	38,1 ± 3,7	0,99
Caucásico	100%	100%	100%	
Origen germano	100%	83,5%	85,5%	0,87
Neurolépticos	57,1%	10,7%	18%	0,01
Estabilizadores del ánimo	14,2%	16,6%	17,4%	1,00
Litio	0%	9,5%	6,7%	0,62
Benzodiazepinas	14,2%	28,5%	31,1%	0,67
Un solo episodio	42,8%	28,5%	31,9%	0,61
Depresión recurrente	57,1%	57,1%	52,7%	0,77
Bipolar II	0%	13%	12,3%	0,88

ES 2 394 529 T3

Distimia	0%	1,1%	0,5%	0,51
Trastorno esquizoafectivo	0%	0%	1,4%	0,62
Trastorno de ajuste	0%	0%	0,8%	1,00

---

Substratos de P-gp

N (% de mujeres)	2 (50%)	21 (61,9%)	110 (59%)	1,00
Edad	44,5 ± 9,5	48,2 ± 3	45 ± 1,4	0,66
HAM-D en la inclusión	29 ± 1	25,1 ± 1,5	26,7 ± 0,6	0,57
Edad en el comienzo	43,5 ± 9,5	36,9 ± 3,2	33,3 ± 1,4	0,43
duración de la enfermedad (años)	1 ± 0	12,1 ± 2,2	11,6 ± 1,1	0,41
episodios previos	0,5 ± 0,5	1,6 ± 0,5	2,7 ± 0,5	0,64
hospitalizaciones anteriores	0,5 ± 0,5	1,2 ± 0,4	1,1 ± 0,1	0,82
duración del actual	20 ± 4	32,2 ± 8,2	38 ± 6,3	0,86

---

Caucásico	100%	100%	100%	
-----------	------	------	------	--

Origen germano	100%	89,4%	84,6%	0,80
----------------	------	-------	-------	------

---

Neurolépticos	0%	19%	16,3%	0,83
---------------	----	-----	-------	------

Estabilizadores del ánimo	0%	14,2%	13,6%	1,00
---------------------------	----	-------	-------	------

Litio	0%	14,2%	7,3%	0,48
-------	----	-------	------	------

Benzodiazepinas	0%	23,8%	23,6%	1,00
-----------------	----	-------	-------	------

---

Un solo episodio	50%	33,3%	28,4%	0,64
------------------	-----	-------	-------	------

Depresión recurrente	50%	47,6%	56,8%	0,74
----------------------	-----	-------	-------	------

---

Sustratos de P-gp

Bipolar II	0%	14,2%	11,9%	0,79
------------	----	-------	-------	------

Distimia	0%	4,7%	0%	0,17
----------	----	------	----	------

Trastorno esquizoafectivo	0%	0%	1,8%	1,00
---------------------------	----	----	------	------

Trastorno de ajuste	0%	0%	0,9%	1,00
---------------------	----	----	------	------

---

Sustratos no de P-gp

N (% de mujeres)	3 (100%)	23 (52,1%)	72 (52,7%)	0,36
------------------	----------	------------	------------	------

Edad	45 ± 6,4	46,7 ± 2,9	50,4 ± 1,7	0,49
------	----------	------------	------------	------

HAM-D en la inclusión	35,6 ± 5,3	27,1 ± 1,3	26,6 ± 0,7	0,07
-----------------------	------------	------------	------------	------

Edad en el comienzo	31,3 ± 12,5	39,3 ± 2,9	37,4 ± 1,7	0,66
---------------------	-------------	------------	------------	------

duración de la enfermedad (años)	13,6 ± 6,3	7,1 ± 1,5	12,9 ± 1,8	0,23
----------------------------------	------------	-----------	------------	------

episodios previos	1 ± 1	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,4	0,62
-------------------	-------	-----------	-----------	------

hospitalizaciones	0 ± 0	0,6 ± 0,2	2,7 ± 1,3	0,64
-------------------	-------	-----------	-----------	------

anteriores

duración del actual	46,3 ± 15	23 ± 4,1	42,8 ± 9,1	0,49
Caucásico	100%	100%	100%	
Origen germano	100%	89,4%	83%	0,80
Neurolépticos	66,6%	0%	22,2%	0,002
Estabilizadores del ánimo	0%	4,3%	11,1%	0,59
Litio	0%	0%	4,1%	1,00
Benzodiazepinas	33,3%	30,4%	30,5%	1,00
Un solo episodio	66,6%	26%	40,8%	0,20
Depresión recurrente	33,3%	69,5%	45%	0,09
Bipolar II	0%	4,3%	14%	0,50
Distimia	0%	0%	0%	
Trastorno esquizoafectivo	0%	0%	0%	
Trastorno de ajuste	0%	0%	0%	

Tabla 7: Información sobre SNPs genotipados. Posición según Human Reference Sequence (UCSC Version hg 17; <http://genome.ucsc.edu/>). La información de SNP se consiguió de dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

SNP ID	Posición	Gen	Función	Alelos	Valor de p de HWE	MAF	% genotipado
rs4148809	86747914	ABCB4	intrón	A/G	0,82	0,411	71,2
rs2888611	86748321	ABCB4	intrón	C/G	0,70	0,172	71,4
rs1922239	86751465	ABCB4	sin traducir	C/G		No polimorfo	66,4
rs6979325	86751910	ABCB4	locus	A/C	0,46	0,044	71,4
rs10280466	86751997	ABCB4	locus	G/T		No polimorfo	70,5
rs2178658	86766673		desconocido	G/T	0,76	0,233	71,4
rs7789645	86767254		desconocido	C/G	1,00	0,175	71,6
rs7793196	86767498		desconocido	A/G	1,00	0,175	71,4
rs1055305	86777342		locus	A/C		No polimorfo	61,9
rs1055302	86777567		locus	A/G	0,34	0,133	76,4
rs17064	86778121	ABCB1	sin traducir	A/T	0,57	0,055	61,3
rs2235048	86783162	ABCB1	intrón codificante-non-and	C/T	0,32	0,451	94,6
rs11045642	86783296	ABCB1	sinón	A/C/G/T	0,63	0,446	97,5
rs6949448	86786465	ABC81	Intrón	C/T	0,04	0,446	71,4
rs7779562	86789467	ABCB1	Intrón	C/G	1,00	0,030	89,6
rs2235044	86790476	ABCB1	sinón codificante	A/G		No polimorfo	57

ES 2 394 529 T3

SNP ID	Posición	Gen	Función	Alelos	Valor de p de HWE	MAF	% genotipado
rs2235067	86794573	ABCB1	intrón	A/G	0,56	0,106	76,6
rs4148744	86795425	ABCB1	intrón	C/T	1,00	0,038	64,9
rs4148743	86795741	ABCB1	intrón	A/G	0,12	0,479	64,6
rs4148740	86796754	ABCB1	intrón	C/T	0,28	0,116	71,2
rs10280101	86798236	ABCB1	intrones	A/C	0,56	0,111	70,3
rs7787082	86801702	ABCB1	intrón	A/G	0,05	0,152	70,3
rs2032583	86805212	ABCB1	intrón	C/T	0,47	0,113	98
rs2032582	86805269	ABCB1	no sinón codificante	A/C/G/T	0,37	0,444	74,5
rs9282563	86805296	ABCB1	sinón codificante	C/T	1,00	0,002	69,6
rs4148739	86805700	ABCB1	intrón	A/G	0,28	0,115	71,4
rs11983225	86806171	ABCB1	intrón	C/T	0,40	0,117	70,3
rs4148738	86807700	ABCB1	intrón	A/G	0,19	0,448	89,4
rs10248420	86809637	ABCB1	intrón	A/G	0,07	0,150	70
rs2235040	86810401	ABCB1	intrón	A/G	0,16	0,113	73,6
rs12720067	86814007	ABCB1	intrón	A/G	0,25	0,111	71,2
rs1922242	86818318	ABCB1	intrón	A/T	0,18	0,439	63,1
rs2235046	86818717	ABCB1	intrón	A/G	0,08	0,444	95
rs2235036	86819922	ABCB1	no sinón codificante	A/G		No polimorfo	71,8
rs2235013	86823277	ABCB1	intrón	A/G	0,26	0,500	71,4
rs2235012	86823378	ABCB1	sinón codificante	C/G		No polimorfo	71,6
rs2235035	86823737	ABCB1	intrón	C/T	0,53	0,345	70,3
rs2235033	86823794	ABCB1	intrón	C/T	0,09	0,499	89,6
rs2235032	86824033	ABCB1	intrón	G/T		No polimorfo	70,5
rs2032588	86824094	ABCB1	intrón	C/T	1,00	0,054	62,8
rs1128503	86824252	ABCB1	sinón codificante	C/T	0,57	0,435	71,4
rs2229109	86824460	ABCB1	no sinón codificante	A/G	0,38	0,038	73,4
rs2235030	86824577	ABCB1	intrón	C/T		No polimorfo	64,2
rs2235029	86824586	ABCB1	intrón	G/T		No polimorfo	64,4
rs10276036	86824849	ABCB1	intrón	C/T	0,57	0,435	71,2
rs1922240	86828005	ABCB1	intrón	C/T	0,54	0,351	71,2
rs2235023	86835103	ABCB1	intrón	A/G	1,00	0,066	74,8
rs17407959	86840184	ABCB1	sinón codificante	A/T		No polimorfo	71,6
rs17407952	86840185	ABCB1	no sinón codificante	G/T		No polimorfo	71,6
rs1202169	86840501	ABCB1	intrón	A/G	0,20	0,429	95
rs1202168	86840613	ABC81	intrón	C/T	0,74	0,441	75

ES 2 394 529 T3

SNP ID	Posición	Gen	Función	Alelos	Valor de p de HWE	MAF	% genotipado
rs1202167	86841710	ABCB1	intrón	A/G	0,55	0,431	64
rs2235019	86843954	ABCB1	intrón	G/T	1,00	0,012	64,6
rs2235018	86844016	ABCB1	intrón	A/G	1,00	0,002	64,9
rs2235017	86844024	ABCB1	intrón	C/T	1,00	0,012	64,9
rs2235016	86844063	ABCB1	intrón	G/T		No polimorfo	63,3
rs2235015	86844215	ABCB1	intrones	G/T	0,60	0,168	92,6
rs2235014	86844266	ABCB1	intrón	C/T		No polimorfo	64,9
rs6950978	86845118	ABCB1	intrón	A/T	0,61	0,333	70,9
rs10256836	86845424	ABCB1	intrón	C/G	0,80	0,331	71,4
rs10264990	86847266	ABCB1	intrón	C/T	0,90	0,351	70,3
rs1202179	86848930	ABCB1	intrón	A/G	0,90	0,334	77,3
rs1989831	86850130	ABCB1	intrón	A/T	0,79	0,338	64,6
rs1202172	86855625	ABC81	intrón	G/T	0,75	0,334	98,2
rs1202171	86855696	ABCB1	intrón	A/T	0,90	0,335	76,6
rs17327442	86857641	ABCB1	intrón	A/T	0,37	0,149	71,2
rs4148733	86857883	ABCB1	intrón	C/T	0,23	0,147	64,2
rs1202186	86857909	ABCB1	intrón	A/G	1,00	0,329	64
rs1202185	86858035	ABCB1	intrón	A/G	0,79	0,338	64,6
rs1202182	86859955	ABCB1	intrones	C/T	0,60	0,340	64,6
rs1202181	86860801	ABCB1	intrón	C/T	0,66	0,327	55,4
rs2188525	86869423	ABCB1	intrón	G/T	1,00	0,035	71,6
rs2235074	86869697	ABCB1	intrón	C/T	1,00	0,038	62,8
rs2214102	86874152	ABCB1	sin traducir	A/G	0,15	0,103	55,9
rs3213619	86874844	ABCB1	sin traducir	C/T		No polimorfo	62,8
rs2188524	86875086	ABCB1	sin traducir	A/G		No polimorfo	64,6
rs4728709	86878253	ABCB1	sin traducir	A/G	1,00	0,056	70,3
rs4148731	86883980	ABCB1	sin traducir	C/T	1,00	0,021	64,4
rs4148730	86884002	ABCB1	sin traducir	C/T	1,00	0,019	64,2
rs13233308	86889611	ABCB1	sin traducir	C/T	0,43	0,489	71,2
rs4604363	86898847	ABCB1	sin traducir	A/G		No polimorfo	64,6
rs2157928	86903055	ABCB1	intrón no traducido	C/T		No polimorfo	64,4
rs4148729	86907037	ABCB1	intrón no traducido	A/C	0,15	0,024	64,9
rs10264856	86907232	ABCB1	intrón no traducido	A/G	1,00	0,050	88,3
rs2157926	86915151	ABCB1	intrón no traducido	A/T	1,00	0,054	64,4
rs4148728	86915468	ABCB1	intrón no traducido	A/C		No polimorfo	64,4

ES 2 394 529 T3

SNP ID	Posición	Gen	Función	Alelos	Valor de p de HWE	MAF	% genotipado
rs10246878	86920292	ABCB1	intrón no traducido	A/G	0,54	0,239	71,2
rs10267099	86923411	ABCB1	intrón no traducido	A/G	0,21	0,237	89,6
rs7796247	86969037	ABCB1	intrón no traducido	A/G	0,13	0,019	89,6
rs916715	86971580	ABCB1	intrón no traducido	C/T		No polimorfo	64
rs2188529	86977122	ABCB1	intrón no traducido	A/T	1,00	0,018	62,4
rs3747802	86987237		locus.intrón	C/T		No polimorfo	60,4
rs4148727	86987417		locus.intrón	C/T	0,15	0,024	64,9
rs10227683	86987607		locus.intrón	C/T		No polimorfo	71,2
rs10275625	87009899		intrón	C/T	0,13	0,019	89,6

Tabla 8: Características de los grupos dependientes de genotipo para rs2235015

Las características de los grupos, el número de pacientes (% de mujeres), edad, HDRS en la inclusión, edad en el comienzo, duración de la enfermedad en años, episodios previos, número de hospitalizaciones anteriores, duración del episodio actual, etnia, co-medicación y diagnóstico se muestran para cada genotipo. Se investigó en un análisis ANOVA si había diferencias significativas entre los grupos CC, CT y TT (Sig). La Tabla muestra los resultados de todos los pacientes, pacientes que reciben sustratos de P-gp, y pacientes que reciben sustratos no de P-gp.

	GG	GT	TT	Sig.
Todos los pacientes				
N (% de mujeres)	286 (58,7%)	112 (52,6%)	13 (61,5%)	0,51
Edad	49 ± 0,8	46,9 ± 1,3	48,6 ± 3,5	0,44
HAM-D en la inclusión	26,6 ± 0,3	26,3 ± 0,6	27,7 ± 2,1	0,75
Edad en el comienzo	36,9 ± 0,9	35,7 ± 1,4	41,9 ± 5,2	0,38
duración de la enfermedad en años	12,1 ± 0,7	11,3 ± 1	6,7 ± 2,4	0,30
episodios previos	2,4 ± 0,3	3 ± 0,5	1,3 ± 0,4	0,36
hospitalizaciones anteriores	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,68
duración del actual	39,5 ± 4,2	40,1 ± 6,5	41,3 ± 11,7	0,99
Caucásico	100%	100%	100%	
Origen germano	87,4%	79,5%	100%	0,10
Neurolépticos	18,5%	13,3%	38,4%	0,07
Estabilizadores del ánimo	18,8%	16%	7,6%	0,60
Litio	7,3%	7,2%	0%	0,93
Benzodiazepinas	30,7%	30,3%	30,7%	1,00
Un solo episodio	34,9%	26,7%	38,4%	0,25
Depresión recurrente	51,5%	58,9%	53,8%	0,42

ES 2 394 529 T3

Bipolar II	11,3%	13,3%	7,6%	0,86
<hr/>				
Todos los pacientes				
Distimia	0,3%	0,8%	0%	0,52
Trastorno esquizoafectivo	0,7%	0%	0%	1,00
Trastorno de ajuste	1%	0%	0%	0,60
<hr/>				
Sustratos de P-gp				
N (% de mujeres)	96 (62,5%)	33 (51,5%)	3 (33,3%)	0,36
Edad	45,8 ± 1,5	43,4 ± 2,4	48,3 ± 6,6	0,68
HAM-D en la inclusión	26,7 ± 0,6	25,9 ± 1,4	28,3 ± 0,8	0,76
Edad en el comienzo	34,1 ± 1,5	33,4 ± 2,6	47,6 ± 6,8	0,30
duración de la enfermedad en años	11,7 ± 1,1	10,3 ± 1,4	0,6 ± 0,3	0,19
episodios previos	2,9 ± 0,6	1,4 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,29
hospitalizaciones anteriores	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,13
duración del actual	38,9 ± 7,1	33 ± 7,4	29,3 ± 9,6	0,88
<hr/>				
Caucásico	100%	100%	100%	
Origen germano	84,5%	88%	100%	1,00
<hr/>				
Neurolépticos	14,5%	24,2%	0%	0,38
Estabilizadores del ánimo	16,6%	6%	0%	0,26
Litio	9,4%	6%	0%	0,79
Benzodiazepinas	21,8%	24,2%	33,3%	0,75
<hr/>				
Un solo episodio	30,5%	24,2%	66,6%	0,29
Depresión recurrente	52%	66,6%	33,3%	0,29
Bipolar II	13,6%	6%	0%	0,55
Distimia	0%	3%	0%	0,27
Trastorno esquizoafectivo	2,1%	0%	0%	1,00
Trastorno de ajuste	1%	0%	0%	1,00
<hr/>				
Sustratos no de P-gp				
N (% de mujeres)	62 (51,6%)	30 (53,3%)	4 (100%)	0,22
Edad	49,7 ± 1,8	49,9 ± 2,6	41,7 ± 8,1	0,55
HAM-D en la inclusión	27,1 ± 0,8	26,4 ± 1,1	30,7 ± 5,7	0,48
Edad en el comienzo	37,7 ± 1,9	38,5 ± 2,6	33,2 ± 10,2	0,80
duración de la enfermedad en años	11,9 ± 1,9	11,3 ± 2,2	8,5 ± 4	0,89
episodios previos	1,6 ± 0,3	3,2 ± 0,9	1,5 ± 0,9	0,13

ES 2 394 529 T3

hospitalizaciones anteriores	2,6 ± 1,5	1,5 ± 0,4	0 ± 0	0,80
duración del actual	40 ± 9	36,8 ± 12,9	30,7 ± 15,3	0,95
Caucásico	100%	100%	100%	
Origen germano	88,2%	76%	100%	0,42
Neurolépticos	20,9%	10%	50%	0,11
Estabilizadores del ánimo	11,2%	6,6%	0%	0,81
Litio	4,8%	0%	0%	0,60
Sustratos no de P-gp				
Benzodiazepinas	25,8%	43,3%	25%	0,23
Un solo episodio	44,2%	26,6%	50%	0,22
Depresión recurrente	42,6%	66,6%	25%	0,049
Bipolar II	13,1%	6,6%	25%	0,33
Distimia	0%	0%	0%	
Trastorno esquizoafectivo	0%	0%	0%	
Trastorno de ajuste	0%	0%	0%	

Tabla 9: Detalles con respecto a animales, procedimientos experimentales y de extracción, y cromatografía de líquidos de altas prestaciones.

	Citalopram	Mirtazapina	Venlafaxina
<b>Animales</b>			
Género	macho	macho	macho
Tamaño del grupo [n]	8	9	8
Age [semanas]	16-24	15-17	12-15
Peso <i>abcb1ab</i> (-/-)	31,2 ± 0,6	28,6 ± 0,3	30,6 ± 0,5
Peso <i>abcb1ab</i> (+/+)	29,8 ± 1,0	28,3 ± 0,6	29,9 ± 1,0
<b>Procedimiento experimental</b>			
administración s.c. vía bombas osmóticas	60 µg/día	60 µg/día	300 µg/día
<b>Procedimientos de extracción</b>			
Alcohol isoamílico (extracción plasmática)	0%	0%	0,5%
Alcohol isoamílico (extracción de órganos)	0%	0%	0,5%
<b>cromatografía de líquidos de altas prestaciones</b>			
Gradiente de fase móvil [% B]	5-25	0-25	0-30



Detección UV [nm]	214	214	214
Detección de la fluorescencia			
ex/em [nm]	230/300	295/370	225/305

B, acetonitrilo; ex, extinción; em, emisión

#### Referencias

- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., y Gottesman, M.M., (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361-398.
- 5 Binder, E.B., Salyakina, D., Lichtner, P., Wochnik, G.M., Ising, M., Putz, B., Papiol, S., Seaman, S., Lucae, S., Kohli, M.A., Nickel, T., Kunzel, H.E., Fuchs, B., Majer, M., Pfennig, A., Kern, N., Brunner, J., Modell, S., Baghai, T., Deiml, T., Zill, P., Bondy, B., Rupprecht, R., Messer, T., Kohnlein, O., Dabitz, H., Bruckl, T., Muller, N., Pfister, H., Lieb, R., Mueller, J.C., Lohmussaar, E., Strom, T.M., Bettecken, T., Meitinger, T., Uhr, M., Rein, T., Holsboer, F., y Muller-Myhsok, B. (2004). Polimorfoisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat. Genet.* 36, 1319-1325.
- 10 Brinkmann, U. (2002). Functional polimorfoisms of the human multidrug resistance (MDR1) gene: correlation with P glycoprotein expression and activity in vivo. *Novartis Found Symp.* 243, 207-210; discussion 210-217; 231-235.
- Callen, D.F., Baker, E., Simmers, R.N., Seshadri, R., y Roninson, I.B. (1987). Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum. Genet.* 77, 142-144.
- 15 Cascorbi, I., Gerloff, T., Johne, A., Meisel, C., Hoffmeyer, S., Schwab, M., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Brinkmann, U., y Roots, I. (2001). Frequency of single nucleotide polimorfoisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 169-174.
- Chin, J.E., Soffir, R., Noonan, K.E., Choi, K., y Roninson, I.B. (1989). Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3808-3820.
- 20 Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., y Bertino, J.R. (1989). Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 695-698.
- Devault, A., y Gros, P. (1990). Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1652-1663.
- 25 Eichelbaum, M., Fromm, M.F., y Schwab, M. (2004). Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polimorfoism. *Ther. Drug. Monit.* 26, 180-185.
- Fisher, R.A. (1932). *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd, London
- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Neen Liu-Cordero, S., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J., y Altshuler, D. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225-2229.
- Grauer, M.T., y Uhr, M. (2004). P-glycoprotein reduces the ability of amitriptyline to cross the blood brain barrier in mice after a 10-day administration of amitriptyline. *J. Psychopharmacol.* 18, 66-74.
- Hill, W.G., y Robertson, A. (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoret. Appl. Genet.* 38, 226-231.
- 35 Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H.P., Brockmoller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., y Brinkmann, U. (2000). Functional polimorfoisms of the human multidrug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3473-3478.
- 40 Ito, S., Ieiri, I., Tanabe, M., Suzuki, A., Higuchi, S., y Otsubo, K. (2001). Polimorfoism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics* 11, 175-184.
- Kim, R.B., Leake, B.F., Choo, E.F., Dresser, G.K., Kubba, S.V., Schwarz, U.I., Taylor, A., Xie, H.G., McKinsey, J., Zhou, S., Lan, L.B., Schuetz, J.D., Schuetz, E.G., y Wilkinson, G.R. (2001). Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70, 189-199.
- 45 Kim, R.B. (2002). MDR1 single nucleotide polimorfoisms: multiplicity of haplotypes and functional consequences. *Pharmacogenetics* 12, 425-427

- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, M.J., Kim, I.-W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., y Gottesman, M.M. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525-528.
- 5 Kioka, N., Tsubota, J., Kakehi, Y., Komano, T., Gottesman, M.M., Pastan, I., y Ueda, K. (1989). P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 224-231.
- Kroetz, D.L., Pauli-Magnus, C., Hodges, L.M., Huang, C.C., Kawamoto, M., Johns, S.J., Stryke, D., Ferrin, T.E., DeYoung, J., Taylor T., Carlson, E.J., Herskowitz, I., Giacomini, K.M., y Clark, A.G. (2003). Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 13, 481-494.
- 10 Kunzel, H.E., Binder, E.B., Nickel, T., Ising, M., Fuchs, B., Majer, M., Pfennig, A., Ernst, G., Kern, N., Schmid, D.A., Uhr, M., Holsboer, F., y Modell, S. (2003). Pharmacological and nonpharmacological factors influencing hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis reactivity in acutely depressed psychiatric in-patients, measured by the Dex-CRH test. *Neuropsychopharmacology* 28, 2169-2178.
- 15 McMahan, F.J., Buervenich, S., Charney, D., Lipsky, R., Rush A.J., Wilson A.F., Sorant A.J.M., Papanicolaou G.J., Laje G., Fava M., Trivedi M.H., Wisniewski S.R. y Manji, H. (2006). Variation in the Gene Encoding the Serotonin 2A Receptor Is Associated with Outcome of Antidepressant Treatment. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 804-814.
- Meijer, O.C., de Lange, E.C., Breimer, D.D., de Boer, A.G., Workel, J.O., y de Kloet, E.R. (1998). Penetration of Dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1A* P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* 139, 1789-1793.
- 20 Mickley, L.A., Lee, J.S., Weng, Z., Zhan, Z., Alvarez, M., Wilson, W., Bates, S.E., y Fojo, T. (1998). Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood* 91, 1749-1756.
- Murray, C.J., y Lopez, A.D. (1996). Evidence-based health policy - lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274, 740-743. Sakaeda, T., Nakamura, T., and Okumura, K. (2003). Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics*, 4, 397-410.
- 25 Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., Smit, J.J., van der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E., y Borst, P. (1997). Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4028-4033.
- 30 Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., y van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97, 2517-2524.
- Stein, U., Walther, W., y Wunderlich, V. (1994). Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs. *Eur. J. Cancer* 30A, 1541-1545.
- 35 Tanabe, M., Ieiri, I., Nagata, N., Inoue, K., Ito, S., Kanamori, Y., Takahashi, M., Kurata, Y., Kigawa, J., Higuchi, S., Terakawa, N., y Otsubo, K. (2001). Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 1137-1143.
- Tang, K., Ngoi, S.M., Gwee, P.C., Chua, J.M., Lee, E.J., Chong, S.S., y Lee, C.G. (2002). Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics* 12, 437-450.
- 40 Tang, K., Wong, L.P., Lee, E.J., Chong, S.S., y Lee, C.G. (2004). Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Hum. Mol. Genet.* 13, 783-797.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., y Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7735-7738.
- 45 Trivedi, M.H., Rush, A.J., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Warden, D., Ritz, L., Norquist, G., Howland, R.H., Lebowitz, B., McGrath, P.J., Shores-Wilson, K., Biggs, M.M., Balasubramani, G.K., y Fava, M. (2006). Evaluation of outcomes with Citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am. J. Psychiatry* 163, 28-40.
- 50 Uhr, M., Steckler, T., Yassouridis, A., y Holsboer, F. (2000). Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to *mdr1a* P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacology* 22, 380-387.

- Uhr, M., Holsboer, F., y Muller, M.B. (2002). Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mdr1a and mdr1b P-glycoproteins. *J. Neuroendocrinol.* 14, 753-759.
- 5 Uhr, M., Grauer, M.T., y Holsboer, F. (2003). Differential enhancement of antidepressant penetration into the brain in mice with abcb1ab (mdr1ab) P-glycoprotein gene disruption. *Biol. Psychiatry* 54, 840-846.
- Uhr, M., y Grauer, M.T. (2003). abcb1ab P-glycoprotein is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J. Psychiatr. Res.* 37, 179-185.
- 10 Uhr, M., Namendorf, C., Grauer, M.T., Rosenhagen, M., y Ebinger, M. (2004). P-glycoprotein is a factor in the uptake of dextromethorphan, but not of melperone, into the mouse brain: evidence for an overlap in substrate specificity between P-gp and CYP2D6. *J. Psychopharmacol.* 18, 509-515.
- Uhr, M., Ebinger, M., Rosenhagen, M.C., y Grauer, M.T. (2005). The anti-Parkinson drug budipine is exported actively out of the brain by P-glycoprotein in mice. *Neurosci. Lett.* 383, 73-76.
- 15 Uhr, M., Grauer, M.T., Yassouridis, A., y Ebinger, M. (2007). Blood-brain barrier penetration and pharmacokinetics of amitriptyline and its metabolites in P-glycoprotein (abcb1ab) knock-out mice and controls. *J. Psychiatric Res.* 41, 179-188.
- van de Vrie, W., Marquet, R.L., Stoter, G., de Bruijn, E.A., y Eggermont, A.M. (1998). *In vivo* model systems in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 35, 1-57.
- Westfall, P.H., y Young, S.S. (1993). Resampling-based multiple testing. John Wiley & Sons, Nueva York.
- 20 Wigginton, J.E., Cutler, D.J., y Abecasis, G.R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 887-893.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para determinar el pronóstico de una respuesta clínica de un paciente humano a un medicamento activo sobre el sistema nervioso central (SNC), que es un sustrato de la proteína ABCB1, en el que se determina la presencia de al menos un polimorfismo en el gen ABCB1 de ese paciente que está asociado con una respuesta clínica atrasada, parcial, subóptima o ausente a dicho medicamento, y en el que se determina al menos un primer polimorfismo rs4148740.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se determina al menos un polimorfismo adicional en el gen ABCB1, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs12720067 y/o combinaciones de los mismos.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que al menos un polimorfismo adicional, en particular al menos un polimorfismo adicional seleccionado del grupo que consiste en rs2235067, rs2032583, rs2235040, rs2235015 y combinaciones de los mismos, está en desequilibrio de ligamiento con dicho primer polimorfismo rs4148740.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polimorfismo se determina mediante genotipado.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el genotipado comprende un análisis de micromatriz o un análisis por espectrometría de masas o el uso de cebadores y/o de sondas específicas del polimorfismo, en particular una reacción de extensión de cebador.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, además de la determinación del al menos un polimorfismo, se determina un cambio en la función del gen ABCB1, en el que dicho procedimiento comprende en particular determinar el transporte de sustancias específicas a nivel de la barrera hetamoencefálica.
- 20 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medicamento se selecciona del grupo que consiste en antidepresivos, ansiolíticos, hipnóticos, nootrópicos, antipsicóticos, agentes neuroprotectores, antieméticos, antiepilépticos, antibióticos, agentes anticancerígenos, antimicóticos, agentes antiparkinsonianos, agentes antivirales, glucocorticoides, inmunosupresores, estatinas, neurolépticos y opioides.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el medicamento es un antidepresivo, en particular citalopram, venlafaxina, amitriptilina y/o paroxetina.
9. Medicamento activo sobre el SNC que es un sustrato de la proteína ABCB1 destinado a ser usado para tratar un trastorno del SNC en un paciente que tiene al menos un polimorfismo en el gen ABCB1, en el que dicho polimorfismo es rs4148740, eventualmente combinado con al menos un polimorfismo adicional en el gen ABCB1 seleccionado entre rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420, rs12720067, rs2235067, rs2032583, rs2235040, rs2235015 y rs4148740, y combinaciones de los mismos, comprendiendo dicho medicamento una dosis más elevada que la dosis estándar, o una combinación con otro medicamento inhibidor de la proteína ABCB1.
- 30 10. Medicamento activo sobre el SNC según la reivindicación 9, destinado a ser usado para tratar un estado clínico según la reivindicación 9, en el que el medicamento se selecciona del grupo que consiste en antidepresivos, ansiolíticos, hipnóticos, nootrópicos, antipsicóticos, agentes neuroprotectores, antieméticos, antiepilépticos, antibióticos, agentes anticancerígenos, antimicóticos, agentes antiparkinsonianos, agentes antivirales, glucocorticoides, inmunosupresores, estatinas, neurolépticos y opioides.
- 35 11. Uso de una composición o de un kit de diagnóstico en el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo la composición o el kit al menos un cebador o una sonda para determinar al menos un polimorfismo en el gen ABCB1 en dicho paciente que está asociado con una respuesta clínica atrasada, parcial, subóptima o ausente a dicho medicamento, estando dicho cebador o sonda destinado a determinar el polimorfismo rs4148740, y comprendiendo la composición o el kit además al menos un cebador o sonda adicional para determinar al menos un polimorfismo adicional en el gen ABCB1, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y/o rs12720067.
- 40 45 12. Uso según la reivindicación 11, comprendiendo la composición o el kit un cebador o una sonda que se hibrida al gen ABCB1 humano y que permite una determinación específica de dicho polimorfismo, o que comprende al menos un cebador y/o una sonda adicional para determinar al menos un polimorfismo adicional en desequilibrio de ligamiento con rs4148740, en particular al menos un cebador o una sonda adicional para determinar al menos un polimorfismo seleccionado del grupo que consiste en rs2235067, rs2032583, rs2235040, y rs2235015.
- 50 13. Uso de una micromatriz en el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo la micromatriz un soporte sobre el cual se inmoviliza al menos una sonda para determinar al menos un polimorfismo en el gen ABCB1 en dicho paciente que está asociado con una respuesta clínica atrasada, parcial, subóptima o ausente de dicho medicamento, estando dicha sonda destinada a determinar el polimorfismo rs4148740, y estando al menos una sonda adicional inmovilizada sobre dicho soporte a fin de determinar al menos un polimorfismo
- 55

adicional en el gen ABCB1, en particular rs10280101, rs7787082, rs4148739, rs11983225, rs10248420 y/o rs12720067.

- 5 14. Uso según la reivindicación 13, en el que al menos un polimorfismo adicional, en particular al menos un polimorfismo adicional seleccionado del grupo que consiste en rs2235067, rs2032583, rs2235040, y rs2235015 está en desequilibrio de ligamiento con al menos uno de dichos primeros polimorfismos.

Figura 1

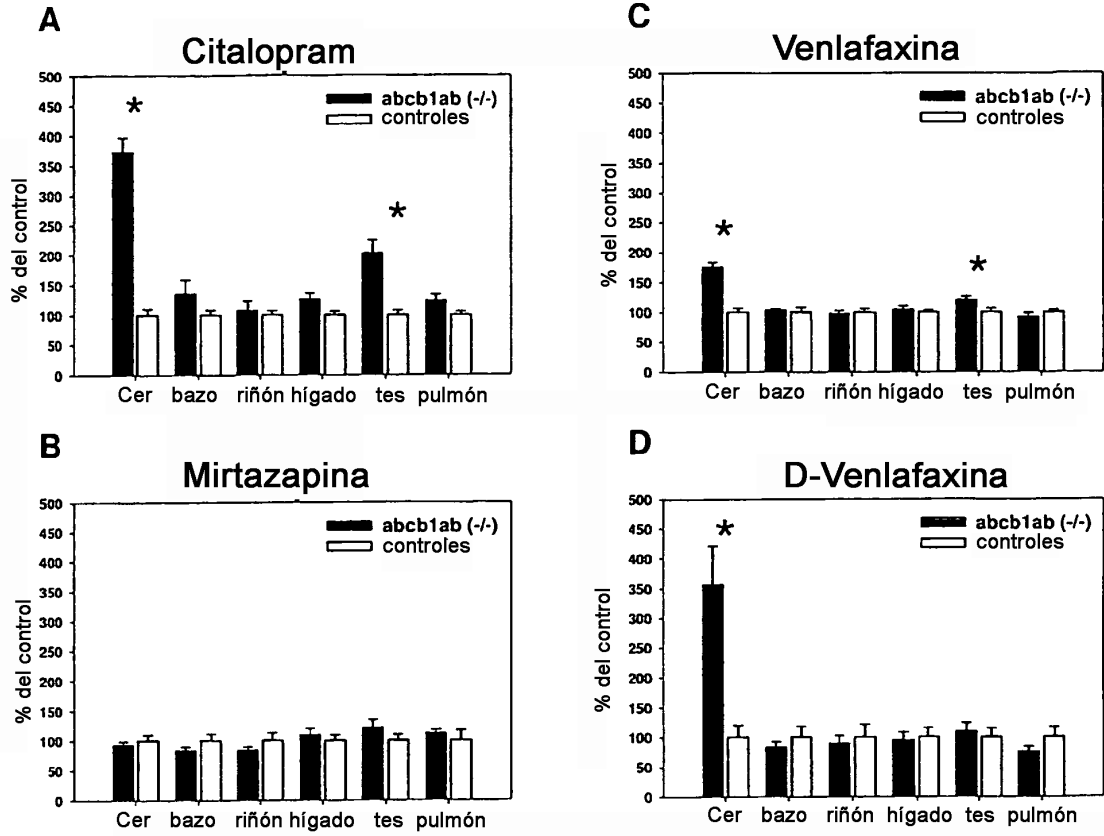


Figura 2

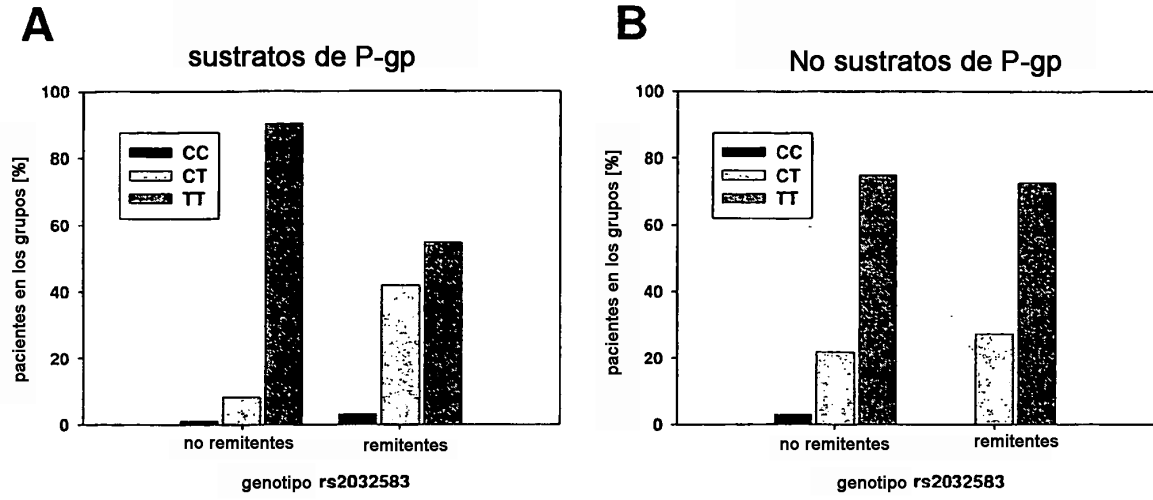


Figura 3

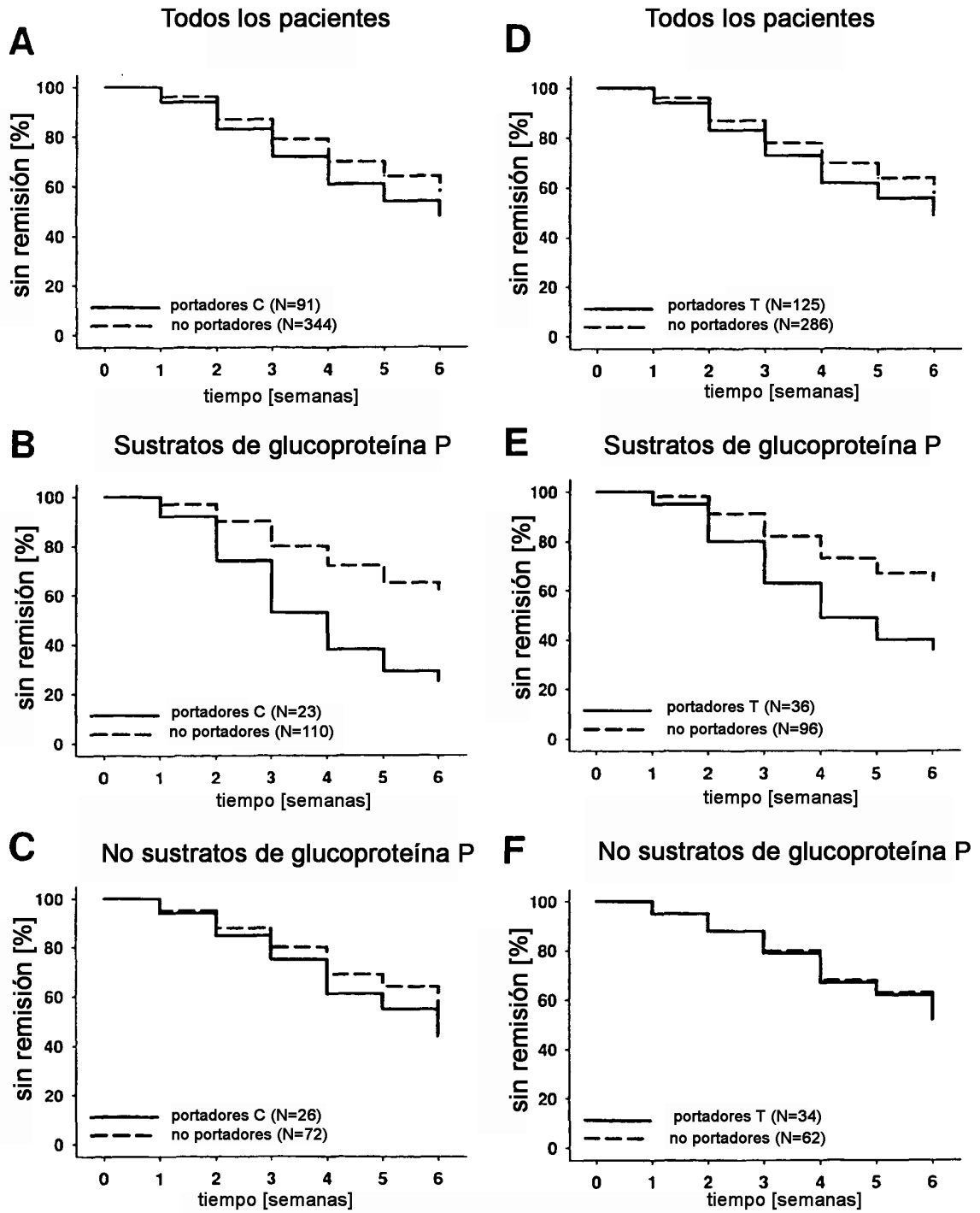




Figura 4

