

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 953**

51 Int. Cl.:

A61K 31/64 (2006.01)

A61K 31/17 (2006.01)

A61K 31/4015 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2007 PCT/EP2007/057937**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2008 WO08015226**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2007 E 07788108 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2046341**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar la diabetes y la disfunción neuropsicológica**

30 Prioridad:

02.08.2006 EP 06291256

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

17.11.2016

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS (50.0%)
3 AVENUE VICTORIA
75004 PARIS, FR y
UNIVERSITE PARIS DESCARTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**POLAK, MICHEL y
CZERNICHOW, PAUL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 589 953 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

Composiciones y métodos para tratar la diabetes y la disfunción neuropsicológica

La presente invención se refiere a composiciones para uso en métodos para tratar diabetes mellitus, trastornos neuropsicológicos, musculares y neurológicos en un grupo particular de pacientes. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para tratar diabetes mellitus, trastornos neuropsicológicos, musculares y neurológicos en pacientes que tienen canales de potasio defectivos. La invención puede usarse en sujetos humanos, particularmente adultos o niños, y es apropiada para tratar diversos trastornos neurológicos.

Introducción

Los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}) acoplan el metabolismo celular a la actividad eléctrica regulando el movimiento del potasio a través de la membrana. Estos canales son complejos octaméricos con dos clases de subunidades: cuatro receptores de sulfonilurea regulatorios (SUR) que engloban cuatro canales de potasio rectificadores interiormente formadores de poros (Kir). Existen varias isoformas para cada tipo de subunidades: SUR1 se encuentra en la célula β pancreática y las neuronas, mientras que SUR2A está en las células del corazón y SUR2B en el músculo liso; Kir6.2 está en la mayoría de los tejidos, como la célula β pancreática, el cerebro, el corazón y el músculo esquelético, y Kir6.1 puede encontrarse en el músculo vascular liso y los astrocitos. Los canales K_{ATP} juegan múltiples papeles fisiológicos en la regulación del metabolismo de la glucosa, especialmente en la célula β , donde regula la secreción de insulina, en respuesta al aumento en la concentración de ATP. También parecen ser sensores metabólicos críticos en la protección contra el estrés metabólico, como hipo o hiperglicemia, hipoxia, isquemia.

La hipoglicemia hiperinsulinémica persistente de la infancia (HI) es un trastorno heterogéneo que puede dividirse en dos formas en base a la lesión histopatológica (difusa y focal). Han sido implicadas diferentes mutaciones inactivadoras en ambas formas: la inactivación permanente de los canales K_{ATP} provoca una secreción de insulina inapropiada, a pesar de un ATP bajo. El diazóxido, usado eficazmente en ciertas HI, abre los canales de K_{ATP} y por lo tanto supera al efecto de las mutaciones sobre la secreción de insulina. En cambio, varios estudios reportaron la secuenciación de KCNJ11, que codifica Kir6.2, en pacientes con diabetes mellitus neonatal permanente, y encontraron diferentes mutaciones para el 30 al 50% de los casos. Se han identificado ahora aproximadamente 28 mutaciones activadoras heterocigóticas, estando la mutación más frecuente en el aminoácido R201. Estas mutaciones dan como resultado una sensibilidad al ATP reducida de los canales K_{ATP} en comparación con los tipos salvajes, y el nivel de bloqueo de los canales es responsable de diferentes características clínicas: la forma "leve" confiere diabetes neonatal permanente aislada, mientras que la forma grave combina diabetes y síntomas neurológicos tales como epilepsia, retraso en el desarrollo, debilidad muscular y características dimórficas leves. Las sulfonilureas cierran los canales K_{ATP} por unión con alta afinidad al SUR.

Compendio de la invención

Aquí, los autores de la invención mostraron por primera vez que puede usarse terapia con sulfonilurea en un grupo de sujetos que tienen un canal de potasio defectivo, mutado, en particular un canal de potasio sensible al ATP. Más específicamente, la invención mostró que puede usarse terapia con sulfonilurea para tratar sujetos que tienen polipéptidos SUR1 mutados, y puede reemplazar a la insulina en esos pacientes diabéticos.

Sorprendentemente, los autores de la invención también mostraron que puede usarse terapia con sulfonilurea en tal grupo de pacientes para el tratamiento de trastornos neuropsicológicos, musculares y neurológicos, incluyendo trastornos oculares. Más específicamente, los autores de la invención diseñaron un protocolo para transferir y evaluar niños que tienen diabetes tratada con insulina debido a una mutación de KCNJ11, de insulina a sulfonilurea. Los resultados de los autores de la invención muestran que la transferencia de inyecciones de insulina a terapia oral con glibenclamida es sumamente eficaz para la mayoría de los pacientes, y segura.

Además, los autores de la invención cribaron recientemente los 39 exones de ABCC8 en 34 pacientes diagnosticados con diabetes neonatal (ND) permanente o transitoria de origen desconocido en una serie de casos de 73 pacientes con ND. Los autores de la invención identificaron siete mutaciones sin sentido en nueve pacientes. Cuatro mutaciones eran familiares y mostraban transmisión vertical, con diabetes neonatal y de comienzo en edad adulta; las mutaciones restantes eran *de novo*. A pesar de ser el receptor de las sulfonilureas, los resultados de los autores de la invención muestran inesperadamente que el tratamiento con sulfonilureas en pacientes con SUR1 mutado consiguieron euglicemia.

Esto ilumina cómo el entendimiento molecular de alguna forma monogénica de diabetes puede conducir a un cambio inesperado del tratamiento en niños. Este es un ejemplo espectacular por el cual una estrategia farmacogenómica mejora de manera extraordinaria la calidad de vida de nuestros pacientes jóvenes.

Un objeto de la presente invención se refiere al uso de un ligando del canal de potasio para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la diabetes mellitus o/y un trastorno neuropsicológico, muscular y neurológico en un sujeto que tiene una subunidad del canal de potasio (canales de K^+ sensibles a ATP) defectiva, mutada.

5 La presente invención se refiere al uso de un ligando del canal de potasio seleccionado de sulfamidas y glinidas, o cualquier combinación de las mismas, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la diabetes mellitus o/y un trastorno neuropsicológico, muscular y neurológico en un sujeto que tiene una subunidad SUR1 del canal de potasio defectiva, mutada, en donde el polipéptido SUR1 mutado exhibe al menos una de las siguientes mutaciones de aminoácidos: L213R, I1424V, C435R, L582V, H1023Y, R1182Q, y R1379C.

10 Un objeto adicional de la presente invención es un método para tratar diabetes mellitus o/y un trastorno neuropsicológico, muscular y neurológico en un sujeto que tiene una subunidad SUR1 del canal de potasio defectiva, mutada, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ligando del canal de potasio. Preferiblemente, la cantidad eficaz es una cantidad que reduce la apertura del canal, o cierra el canal, preferiblemente durante un periodo de tiempo suficiente para inducir o restaurar la despolarización de la membrana.

15 Un objeto adicional de la presente invención es un método para tratar diabetes mellitus o/y un trastorno neuropsicológico, muscular y neurológico en un sujeto, comprendiendo el método una etapa de determinación de si el sujeto tiene una subunidad SUR1 del canal de potasio defectiva, mutada, siendo la presencia de tal subunidad mutada una indicación de que el sujeto puede beneficiarse de un tratamiento con un ligando del canal de potasio.

20 Un objeto adicional de la presente invención es un método para determinar si un paciente que padece diabetes mellitus o/y un trastorno neuropsicológico, muscular y neurológico puede ser tratado con un ligando del canal de potasio, comprendiendo el método determinar si el sujeto tiene una subunidad SUR1 del canal de potasio defectiva, mutada.

25 La subunidad SUR1 presenta una mutación activadora que aumenta la probabilidad de la apertura del canal, impidiendo de este modo la despolarización y limitando la secreción de insulina. El polipéptido SUR1 mutado exhibe al menos una de las siguientes mutaciones de aminoácidos: L213R, I1424V, C435R, L582V, H1023Y, R1182Q, y R1379C. Opcionalmente, el canal de potasio también puede presentar un polipéptido Kir6.2 mutado. Preferiblemente, el canal de potasio no presenta un polipéptido Kir6.2 mutado.

30 Según la presente invención, el sujeto tiene un polipéptido SUR mutado, que exhibe al menos una de las siguientes mutaciones de aminoácidos: L213R, I1424V, C435R, L582V, H1023Y, R1182Q, y R1379C.

35 En una realización adicional, el sujeto puede tener también un polipéptido Kir6.2 mutado, que exhibe preferiblemente al menos una de las siguientes mutaciones de aminoácidos: F35V, F35L, H46Y, R50Q, Q52R, G53N, G53R, G53S, V59G, V59M, L164P, K170T, I182V, R201C, R201H, R201L, I296L, E322K, Y330C, Y330S, y F333I. Preferiblemente, el polipéptido Kir6.2 mutado exhibe al menos una de las siguientes mutaciones de aminoácidos: F35V, F35L, H46Y, R50Q, Q52R, G53N, G53R, G53S, V59G, V59M, K170T, I182V, R201C, R201H, R201L, E322K, Y330C, Y330S, y F333I.

40 Un objeto adicional de la presente invención es un método para tratar un trastorno neuropsicológico, muscular y/o neurológico en un sujeto, que tiene preferiblemente una subunidad del canal de potasio defectiva, mutada, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ligando del canal de potasio. Preferiblemente, la cantidad eficaz es una cantidad que reduce la apertura del canal, o cierra el canal, preferiblemente durante un periodo de tiempo suficiente para inducir o restaurar la despolarización de la membrana.

45 Un objeto adicional de la presente invención es un método para tratar un trastorno neuropsicológico, muscular y/o neurológico en un sujeto, que tiene preferiblemente una subunidad del canal de potasio defectiva, mutada, comprendiendo el método una etapa de determinación de si el sujeto tiene una subunidad del canal de potasio defectiva, mutada, siendo la presencia de tal subunidad mutada una indicación de que el sujeto puede beneficiarse de un tratamiento con un ligando del canal de potasio. En una realización particular, la etapa de determinación de si el sujeto tiene una subunidad del canal de potasio defectiva, mutada, comprende la etapa de determinación de la presencia de un polipéptido SUR1 mutado. Opcionalmente, la etapa de determinación de si el sujeto tiene una subunidad del canal de potasio defectiva, mutada, comprende adicionalmente la etapa de determinación de la presencia de un polipéptido Kir6.2 mutado.

50 Un objeto adicional de la presente invención es un método para determinar si un paciente que padece un trastorno neuropsicológico, muscular y/o neurológico puede ser tratado con un ligando del canal de potasio, comprendiendo el método determinar si el sujeto tiene una subunidad del canal de potasio defectiva, mutada, determinando la presencia de un polipéptido SUR1 mutado. Opcionalmente, la etapa de determinación de si el sujeto tiene una subunidad del canal de potasio defectiva, mutada, comprende adicionalmente la etapa de determinación de la presencia de un polipéptido Kir6.2 mutado.

55 Preferiblemente, el trastorno neuropsicológico, muscular y/o neurológico se selecciona de epilepsia, retraso en el desarrollo, debilidad muscular, dispraxia, dislexia, distonía, disfasia, y trastornos oculares que incluyen trastornos coriorretinales. Por ejemplo, los trastornos coriorretinales pueden ser neovascularizaciones coriorretinales, edema retinal, trastornos de permeabilidad y/o trastornos oculares degenerativos. Para los trastornos coriorretinales, el ligando puede administrarse al sujeto por vía oral o intraocular. En particular, la dispraxia visiomotora puede ser mejorada por el ligando del canal de potasio. Los trastornos musculares incluyen trastornos neuromusculares, miopatía, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, atrofias musculares espinales (AME), esclerosis

lateral primaria (ELP), ataxia heredada, atrofia muscular progresiva, síndrome postpolio, y distrofia muscular, etc.

El ligando es un ligando del canal de potasio sensible al ATP, seleccionado de sulfamidas y glinidas, bien solas o bien en cualquier combinación. En particular, el ligando puede seleccionarse entre los siguientes tipos de fármacos: sulfamida hipoglicémica (p.ej. carbutamida (Glucidoral), glibenclamida o gliburida (EE.UU.) (Daonil, Daonil Faible, Euglucan, Hemi-Daonil, Miglucan), glibomurida (Glutril), glicazida (Diamicron), glimepirida (Amarel), y glipizida (Glibenese, Minidiab, Ozidia)), glinidas (p.ej. repaglinida (NovoNorm); y asociaciones (p.ej. metformina + glibenclamida (Glucovance)). Tales ligandos incluyen las sulfonilureas. Una dosis preferida está comprendida entre aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,5 mg/kg/día. Más preferiblemente, la dosis preferida está comprendida entre aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,2 mg/kg/día, aún más preferiblemente de 0,30 a 0,8 o 1 mg/kg/día. Estas dosis están en el extremo alto de, o exceden, las dosis recomendadas por la Administración de Alimentos y Fármacos para tratar la diabetes tipo 2 en adultos. Además, la dosificación puede ser disminuida después del cese de la insulina. La dosis diaria se administra preferiblemente en dos, tres o cuatro veces. En una realización preferida, el ligando se administra por vía oral.

El sujeto puede ser cualquier mamífero, preferiblemente un sujeto humano, tal como un adulto o un niño. En una realización particular, el sujeto es un niño. En una realización preferida, el sujeto no tiene anticuerpos antiislotes detectables, y la ultrasonografía no revela anomalías pancreáticas. La presente invención puede aplicarse también para animales y usarse en medicina veterinaria, por ejemplo para patologías oculares y/o musculares. Por consiguiente, el sujeto puede ser un animal, tal como un perro, un gato o un caballo, o un animal de granja tal como una vaca, un cerdo, una oveja y una cabra.

Un objeto particular de esta invención se refiere al uso de un compuesto de sulfamida o glinida para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la diabetes mellitus o/y un trastorno neuropsicológico y/o muscular y/o neurológico (incluyendo uno ocular) en donde el sujeto es un niño, que tiene un polipéptido SUR1 mutado.

La proteína SUR1 es el receptor de sulfonilurea codificada por el gen ABCC8 (uniGene Hs.54470; Genbank NP_000343 y NM_000352). Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que la mutación alterara la unión y de que no pudiera estar presente la unión a sulfonilurea en el paciente. Sin embargo, y pesar de esta posibilidad teórica, después de la identificación de sus mutaciones, se inició una terapia con glibenclamida (gliburida) y se encontró inesperadamente que era exitosa en los pacientes humanos de PND (diabetes neonatal permanente): la insulina fue interrumpida después de 2 y 15 días en los pacientes PND12 y 16, respectivamente. Las dosis actuales de glibenclamida (gliburida) son 0,59 y 0,22 mg/kg/día en los pacientes PND12 y PND16, respectivamente. Estos resultados son inesperados y demuestran, en sujetos humanos, la eficacia de la presente invención.

Leyenda a las figuras

Figura 1. Diferentes formas de canales K_{ATP} y regulación metabólica. Varias isoformas de subunidades tanto Kir como SUR se encuentran en los diferentes órganos y confieren a los canales su especificidad, pero todas interfieren con el metabolismo de la glucosa. Los canales Kir6.2/SUR1 se encuentran en las neuronas y el páncreas, mientras que los Kir6.2/SUR2 se encuentran en el corazón y el músculo esquelético.

Figura 2. Metabolismo celular de acoplamiento de los canales K_{ATP} a la actividad eléctrica en la célula pancreática β . En presencia de baja glucosa y baja relación ATP/ADP, los canales K_{ATP} se abren y la membrana celular se hiperpolariza. Cuando la concentración de glucosa y por lo tanto la relación ATP/ADP aumentan, los canales K_{ATP} se cierran, provocando la despolarización de la membrana, la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y la exocitosis de insulina.

Figura 3. Secreción anormal de insulina por mutación activadora de KCNJ11. La mutación activadora es responsable de una sensibilidad al ATP reducida del canal, y por lo tanto la apertura permanente del canal inhibe la liberación de insulina cuando la glucosa aumenta.

Figura 4. Monitorización continua de la glicemia durante 3 días de un paciente de 37 años de edad con mutación R201H, primero bajo insulina y después bajo glibenclamida. Véase la disminución en la variabilidad del nivel glicémico después de la transferencia a glibenclamida.

Descripción detallada de la invención

Introducción

Los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}) son canales ubicuos que acoplan el metabolismo celular a la actividad eléctrica regulando los movimientos del potasio a través de la membrana celular. Numerosos estudios fisiológicos de estos canales permitieron entender su papel esencial en muchos órganos, y especialmente en el metabolismo de la glucosa. Estos canales están compuestos de 2 tipos de subunidades: las subunidades Kir formadoras de poros englobadas por las subunidades SUR regulatorias. Existen varias isoformas de estos canales en diferentes tipos celulares. El entendimiento de su papel en la secreción de insulina en la célula beta pancreática ha permitido identificar numerosas mutaciones responsables de hiperinsulinismo persistente o diabetes mellitus neonatal, y por lo tanto cambiar los aspectos terapéuticos de estos pacientes.

Fisiología del canal de potasio

Los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}) acoplan el metabolismo celular a la actividad eléctrica regulando el movimiento del potasio a través de la membrana. Estos canales son complejos octaméricos con dos clases de subunidades: cuatro receptores de sulfonilurea regulatorios (SUR) que engloban cuatro canales de potasio rectificadores interiormente formadores de poros (Kir) [1, 2]. Una estequiometría SUR1:Kir6.2 1:1 es tanto necesaria como suficiente para el ensamblaje de canales K_{ATP} activos [3 4]. SUR, un miembro de la familia de transportadores ABC, se origina a partir de 2 genes independientes, y por lo tanto aparece en varias isoformas empalmadas. SUR1 se encuentra en la célula β pancreática y las neuronas [5], mientras que SUR2A está en las células del corazón y SUR2B en el músculo liso [6]. La subunidad Kir6.2 forma el poro del canal en la mayoría de los tejidos, como la célula β pancreática, el cerebro, el corazón y el músculo esquelético [3], mientras que Kir6.1 puede encontrarse en el músculo vascular liso y los astrocitos. Estas diferentes formas del canal tienen diferentes propiedades de poro y sensibilidad a los nucleótidos de adenina [3] (Figura 1). El gen KCNJ11, que codifica Kir 6.2, y el gen ABCC8, que codifica SUR1, están situados en 11p15 [7], cerca del pico grande de enlace IDDM2.

Los canales K_{ATP} juegan múltiples papeles fisiológicos en la regulación del metabolismo de la glucosa: secreción de insulina por las células beta pancreáticas, liberación de glucagón por las células alfa pancreáticas [8], secreción de somatostatina desde las células D [9], y secreción de GLP1 desde las células L [10]. Cuando está cerrado, el canal K_{ATP} se dice que está inactivado, ya que el flujo de potasio está bloqueado (pero paradójicamente este cierre permite la despolarización de la membrana y por lo tanto el efecto metabólico). En cambio, cuando está abierto, el canal está activado, ya que el flujo de potasio es efectivo. Las subunidades de sulfonilurea sienten los cambios en la concentración de ATP y ADP y de este modo afectan a la actividad del canal K_{ATP} [11-13]. Estos nucleótidos tienen efectos opuestos sobre la actividad del canal: el ATP actúa como bloqueador del canal y el MgADP como abridor del canal. En la célula β pancreática, a baja concentración de glucosa, el flujo de potasio a través de los canales K_{ATP} abiertos ("activados") establece una hiperpolarización de la membrana (con un potencial de aproximadamente -70 mV). El aumento en la concentración de ATP (y la disminución concomitante en MgAD) en respuesta al metabolismo de la glucosa cierra los canales K_{ATP} y es responsable de una despolarización de la membrana. Esta despolarización causa la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, permitiendo la entrada de Ca^{2+} , que desencadena la exocitosis de gránulos que contienen insulina [14] (Figura 2). Además, los canales K_{ATP} son importantes para la supervivencia de la célula pancreática de insulina y regulan la diferenciación de las células de los islotes en los ratones desprovistos de Kir6.2 [15, 16].

En el músculo cardiaco, liso y esquelético, los tejidos neuronales cerebrales, los canales K_{ATP} normalmente se abren y cierran en respuesta al estrés metabólico, y de este modo conducen a la inhibición de la actividad eléctrica [17]. Además, estudios en ratones nulos en Kir6.1 o Kir6.2 muestran que los canales K_{ATP} son sensores metabólicos críticos en la protección contra el estrés metabólico, como hiper o hipoglucemia, isquemia o hipoxia [18]. Las células que expresan mRNA de Kir6.2 están distribuidas ampliamente en todo el cerebro [19], pero la expresión más alta de los canales K_{ATP} está en la pars reticulada de la sustancia negra, que juega un papel crucial en la supresión de la propagación de ataques epilépticos generalizados [20, 21]. La apertura de los canales K_{ATP} ejerce un fuerte efecto supresor sobre la actividad neuronal durante la hipoxia cambiando los potenciales de la membrana en la dirección hiperpolarizada [22]. Los ratones que carecen de Kir6.2 son extremadamente susceptibles al ataque epiléptico generalizado después de una breve hipoxia, y los canales K_{ATP} podrían participar por lo tanto en un mecanismo de protección neuronal inducido por preconditionamiento [20, 21]. La neuroglicopenia estimula la secreción de hormonas contrarregulatorias, entre las cuales está la secreción de glucagón por las células α pancreáticas mediante la activación de neuronas autónomas. Los canales K_{ATP} tienen un papel principal para la detección de glucosa en las neuronas del hipotálamo ventromedial, y está dañada en los ratones nulos en Kir6.2, conduciendo a una secreción de glucagón notablemente reducida [23]. Además, en ensayos de comportamiento, los ratones desprovistos de Kir6.2 son menos activos, con una coordinación dañada y una reactividad emocional diferente en comparación con el tipo salvaje, especialmente en situaciones nuevas [24].

En el músculo cardiaco y esquelético, la isoforma SUR2A coexpresada con Kir6.2 es menos sensible al ATP [5]. El canal K_{ATP} conecta el estado energético de las fibras musculares con la actividad eléctrica de la membrana celular: impide el desarrollo de tensión de reposo durante la fatiga y mejoran la recuperación de fuerza después de la fatiga [25]. Expresados en alta densidad en el sarcolema cardiaco [5], los canales K_{ATP} están asociados probablemente, como en el cerebro, con el mecanismo cardioprotector de preconditionamiento relacionado con isquemia [26-29]. Bajo un aumento rápido de catecolaminas, se requiere una actividad apropiada de los canales K_{ATP} para las funciones celulares normales dependientes de la membrana, tales como la pérdida celular de potasio y la gestión adecuada del calcio [26, 27, 29, 30]. Un déficit en la función de los canales K_{ATP} en ratones nulos en Kir6.2 es reconocido como un factor de riesgo de arritmia bajo estimulación simpática [26, 31] y de mayor susceptibilidad a la isquemia bajo condiciones basales [32]. Sin embargo, la rápida velocidad del corazón del ratón puede magnificar la importancia relativa de los canales K_{ATP} en comparación con el ser humano. No obstante, se han identificado mutaciones en el receptor de sulfonilurea cardiaco en pacientes con cardiomiopatía y arritmia ventricular [33]. En el músculo vascular liso, los canales K_{ATP} están implicados en el tono del vaso [34, 35]. Se han descrito dos clases de mutaciones en las subunidades Kir6.2 o SUR1. Primero, las mutaciones inactivadoras (como en el hiperinsulinismo) son responsables del cierre permanente de los canales K_{ATP} y por lo tanto la exocitosis incontrolada de insulina. En cambio, las mutaciones activadoras (como en la diabetes mellitus neonatal) provocan la apertura permanente de los canales y por lo tanto la hiperpolarización de la membrana y la no exocitosis de insulina.

Canal de potasio e hiperinsulinismo

La hipoglicemia hiperinsulinémica (HI) persistente de la infancia es un trastorno heterogéneo que puede ser dividido en dos formas en base a la lesión histopatológica (difusa y focal), pero que son clínicamente indistinguibles. Las formas difusas se caracterizan por una secreción de insulina no regulada del páncreas entero, mientras que las formas focales corresponden a hiperplasia somática de las células de los islotes [36-38]. La HI focal es esporádica y está asociada con hemi u homocigosidad de una mutación inactivadora heredada paternalmente de SUR1 o Kir6.2 y pérdida del alelo materno en los islotes hiperplásicos [39, 40]. La HI difusa es un trastorno heterogéneo [41] que puede ser causado por diversos defectos en la regulación de la secreción de insulina: mutación inactivadora de Kir6.2 o SUR1, mutaciones de glucocinasa [42], glutamato deshidrogenasa [43, 44], L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta [45], y modificaciones en el receptor de insulina [46]. Las mutaciones de SUR1 o Kir6.2 homocigóticas o doble heterocigóticas recesivas [47-51] son responsables de la mayoría de los casos de HI neonatal difusa y grave (80%) resistentes al tratamiento médico, y requieren a menudo pancreatocetomía subtotal. Las mutaciones de SUR1 y Kir6.2 dominantes son responsables de reducir el 50% de la actividad de los canales K_{ATP} y causan una HI menos grave, que aparece durante el primer año de vida y es sensible al diazóxido [52].

15 Detección de una mutación en un gen o polipéptido del canal de potasio

Pueden usarse diversas técnicas conocidas en la técnica para detectar la presencia de una mutación particular en un gen del canal de potasio (KCNJ11 o ABCC8) o polipéptido (kir6.2 o SUR1). En particular, tales técnicas se realizan típicamente in vitro o ex vivo, sobre una muestra biológica derivada del sujeto, tal como una muestra de sangre.

20 Los ejemplos de técnicas conocidas per se por el experto en la materia que pueden usarse para determinar el genotipo incluyen secuenciación, cualquier método que emplee amplificación (p.ej., PCR), cebadores específicos, sondas específicas, migración, etc., típicamente ensayos de RT-PCR cuantitativa, LCR (Reacción en Cadena de Ligasa), TMA (Amplificación Mediada por Transcripción), PCE (un inmunoensayo amplificado por enzimas), DHPLC (Cromatografía Líquida de Alta resolución desnaturalizante), MLPA (Amplificación con Sonda dependiente de Ligación Múltiple) y bDNA (amplificación de señal de ADN ramificado).

En una realización particular, la determinación de un residuo de aminoácido en cualquier posición en un polipéptido comprende una etapa de secuenciación del gen del canal o ARN o una porción del mismo que comprende los nucleótidos que codifican dicho residuo de aminoácido.

30 En otra realización particular, la determinación de un residuo de aminoácido comprende una etapa de amplificar el gen o ARN o una porción del mismo que comprende los nucleótidos que codifican dicho residuo de aminoácido. La amplificación puede realizarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR simple, RT-PCR o PCR anidada, por ejemplo, usando métodos y cebadores convencionales.

35 En otra realización particular, la determinación de un residuo de aminoácido comprende una etapa de digestión con enzimas de restricción específicas a alelos. Esto puede hacerse usando enzimas de restricción que escinden la secuencia codificante de un alelo particular y que no escinden el otro alelo.

En una realización particular adicional, la determinación de un residuo de aminoácido comprende una etapa de hibridación del gen o ARN o una porción del mismo que comprende los nucleótidos que codifican dicho residuo de aminoácido con una sonda de ácido nucleico específica para el genotipo, y determinar la presencia o ausencia de híbridos.

40 Subunidad Kir6.2 del canal de potasio y diabetes

45 Conociendo el papel fundamental de los canales K_{ATP} en la secreción de insulina y las mutaciones de Kir6.2 implicadas en el hiperinsulinismo de la infancia, se buscaron mutaciones en Kir6.2 codificado por KCNJ11 en diabetes tipo 1 y tipo 2, asumiendo que la sobreactividad del canal K_{ATP} podría causar diabetes inhibiendo la secreción de insulina [53] (Figura 3). En efecto, se encontró que el polimorfismo E23 común en Kir6.2 estaba fuertemente asociado a la diabetes tipo 2 [54, 55], con secreción de insulina disminuida en el ensayo de tolerancia a la glucosa [56] y supresión disminuida de la secreción de glucagón en respuesta a hiperglicemia [57]. Una cohorte basada en una población grande de niños diabéticos sugiere que la diabetes permanente de comienzo temprano que se establece antes de 6 meses de edad difiere de casos de comienzo más tardío por genotipo HLA "protector" frecuente para la diabetes tipo 1, autoinmunidad menos frecuente y peso al nacer más pequeño de lo normal [58].

50 Así, varios estudios reportaron la secuenciación de KCNJ11, que codifica Kir6.2, en pacientes con diabetes mellitus neonatal permanente sin etiología conocida (mutaciones en glucocinasa, factor 1 promotor de insulina, PTF1a, FOXP3 y EIF2AK3 [59-63]) y encontraron diferentes mutaciones para el 30 al 50% de los casos [14, 64, 65] (véase la Tabla 2). En el estudio de los autores de la invención de pacientes de la Red Francesa para el Estudio de la Diabetes Neonatal, los autores de la invención cribaron el gen KCNJ11 para 17 bebés nacidos a término con una mediana de edad en la diagnosis de diabetes de 64 días (intervalo 1-260). Los autores de la invención identificaron en nueve pacientes siete mutaciones heterocigóticas: 3 ya descritas (V59M, R201H, R201C) y 4 mutaciones nuevas (F35L, G53N, E322K, Y330C). La mayoría de los pacientes tuvieron un peso al nacer pequeño, debido

probablemente a insuficiencia secretora de insulina en el útero [64]. También se identificaron mutaciones en KCNJ11, pero con menos frecuencia, en casos de diabetes neonatal transitoria [66]. La mayoría de las mutaciones descritas (aproximadamente 80% [14]) son de novo, pero se ha reportado un caso con un mosaicismo de línea germinal demostrado que sugiere que esta posibilidad debe ser considerada cuando se trata riesgo de recurrencia [67]. Estas mutaciones dan como resultado una sensibilidad al ATP reducida de los canales K_{ATP} en comparación con los tipos salvajes, y el nivel de bloqueo de los canales es responsable de diferentes características clínicas: la forma "leve" confiere diabetes neonatal permanente aislada, mientras que la forma grave combina diabetes y síntomas neurológicos tales como epilepsia, retraso en el desarrollo, debilidad muscular y características dismórficas leves [14, 64, 65, 68]. Las mutaciones más frecuentes están situadas en el R201 (situado en el término C) debido a la presencia de un dinucleótido CpG, que es un punto caliente de mutación. La sustitución en este aminoácido por otro residuo cargado positivamente tiene solamente efectos pequeños sobre la sensibilidad al ATP, mientras que la sustitución con un aminoácido neutro o cargado negativamente causa un daño mayor en la función del canal [14, 69-71]. Sin embargo, la disminución en sensibilidad al ATP debida a la mutación R201 sigue siendo pequeña, y por lo tanto es responsable de diabetes neonatal aislada, mientras que las que causan mayor reducción, como V59M, V59G, Q52R, están asociadas con enfermedad grave [14, 64, 65, 68]. Las 4 mutaciones identificadas [66, 72] en la diabetes neonatal transitoria (R201H, G53S, G53R y I182V) dan como resultado una reducción más leve en sensibilidad al ATP, pero el fenotipo asociado es variable, ya que las madres de los probandos tenían diabetes neonatal permanente o diabetes revelada después de 5 años de edad para 3 de 4. La debilidad muscular observada puede ser de origen tanto muscular como neurológico, ya que Kir6.2 se expresa en ambas células. El retraso en el desarrollo y la epilepsia resultan de los canales K_{ATP} presentes en el sistema nervioso central, como se describió anteriormente. En cambio, no se ha descrito un efecto marcado sobre la función del corazón o el ECG, y esto puede ser explicado por la mayor inhibición de ATP de Kir6.2/SUR2A mutante que de Kir6.2/SUR1 [68, 73, 74].

Uso de sulfonilurea en adultos y niños con una mutación de KCNJ11

El efecto de las sulfonilureas sobre las células β pancreáticas fue descubierto en 1942 por Janbon porque los pacientes tratados para fiebre tifoidea tenían hipoglucemia severa. Desde entonces, la familia de sulfonilureas se desarrolló rápidamente y se usó como tratamiento para diabéticos que no requerían insulina desde 1956 [75]. Las sulfonilureas cierran los canales K_{ATP} uniéndose con alta afinidad a SUR [74, 76, 77]. En ausencia de nucleótidos añadidos, la inhibición con alta afinidad de la corriente de K_{ATP} por sulfonilurea alcanza sólo 60-80% [17].

SUR1 posee dos sitios de unión para la glibenclamida, mientras que la tolbutamida se une sólo a uno [2, 74, 75]. Esta doble unión puede explicar el largo tiempo de eliminación de la glibenclamida [78]. Además de unirse al canal K_{ATP} pancreático, la glibenclamida inhibe la actividad del canal de tipo cardiaco y de músculo esquelético o liso [78] pero también canales mitocondriales por unión a SUR2. Sin embargo, esta afinidad de la glibenclamida por SUR2 es 300 a 500 veces más baja que por SUR1. No obstante, pueden tenerse que tomar precauciones cuando se tratan pacientes con enfermedad cardiaca isquémica a alta dosis de glibenclamida [78], ya que los canales K_{ATP} intervienen en el mecanismo cardioprotector de preconditionamiento relacionado con isquemia como se describió anteriormente. Sin embargo, la ausencia de efectos laterales de este tipo reportada en la diabetes de tipo 2 sugiere que los efectos de una inhibición extra del canal pancreático podrían ser sutiles.

La alta afinidad de la sulfonilurea por los canales K_{ATP} pancreáticos sugirió que estos fármacos pueden usarse para reemplazar a la insulina en estos pacientes. La inyección intravenosa de tolbutamida pudo estimular la secreción de insulina en pacientes con una mutación de KCNJ11 incluso cuando no respondían a glucosa intravenosa [14]. Posteriormente, 6 pacientes han sido cambiados con éxito de inyecciones subcutáneas de insulina a terapia con sulfonilurea oral [14, 79-81]. La dosis de glibenclamida requerida ha sido hasta 0,8 mg/kg/d, esto es, dosis mucho más altas que las usadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2. La demora necesitada para detener la insulina es entre 3 días y 8 semanas, con un seguimiento de casi 2 años ya. Estos resultados muestran gran heterogeneidad entre los pacientes, incluso con las mismas mutaciones de KCNJ11. La propia experiencia de los autores de la invención muestra una transferencia exitosa de insulina a glibenclamida oral para 5 pacientes de 7, siendo las últimas dos niñas incapaces de transferir gemelas con características neurológicas relacionadas probablemente con otra patología no entendida aún, y para las que el cumplimiento probablemente no fue óptimo.

El reciente estudio colaborativo europeo de los autores de la invención reportará un total de 49 pacientes consecutivos (de 3 meses a 36 años de edad) de 40 familias que tienen una diabetes neonatal permanente por mutación heterocigótica de KCNJ11 [82]. De estos 49 pacientes tratados con dosis adecuadas de sulfonilureas (0,8 mg/kg/día de glibenclamida equivalente), 44 (90%) pudieron detener el tratamiento con insulina. La mediana de dosis de glibenclamida requerida inicialmente fue 0,45 mg/kg/día (0,05 a 1,5 mg/kg/día). El control glicémico fue mejorado en todos los 38 pacientes ensayados, con un nivel de hemoglobina glicosilada medio que cayó de 8,1% antes de la sulfonilurea a 6,4% a las 12 semanas después del cese de insulina, sin aumentar la frecuencia de hipoglucemia. El ochenta por ciento (4 de 5) de los pacientes incapaces de detener la insulina tenían síntomas neurológicos, en contraste con sólo 14% (6 de 44) en el grupo exitoso. Cinco pacientes tuvieron diarrea transitoria, no se reportó ningún otro efecto secundario. Algunos estudios han mostrado que el cierre de los canales K_{ATP} mediante sulfonilurea podría inducir la apoptosis de las células β en los islotes humanos y precipitar por tanto la disminución en la masa de células β en pacientes con diabetes tipo 2, pero esta responsabilidad debe ser confirmada aún [83, 84]. Sin embargo, respecto a los pacientes con mutaciones de KCNJ11, si bien la eficacia de la glibenclamida es transitoria durante varios años, esto significa años sin inyecciones subcutáneas diarias y la

consiguiente mejora de la calidad de vida (véase el testimonio personal de un chico joven después de un cambio con éxito a terapia oral en Diabetes UK Careline Journal, 2006). Los autores de la invención, por lo tanto, diseñaron un protocolo para transferir y evaluar niños que tienen diabetes tratada con insulina debido a mutación de KCNJ11, de insulina a sulfonilurea. Los autores de la invención obtuvieron la aprobación de la Dirección de Investigación Clínica de su institución (AP-HP, París, Francia), así como el consentimiento del comité ético y de las autoridades francesas para el cuidado de la salud (AFSSAPS), para incluir a los niños identificados hasta ahora (n=12).

Transferencia de insulina a glibenclamida: un estudio de un caso

Los autores de la invención reportamos aquí el caso de una paciente de 37 años con diabetes neonatal permanente descubierta a los 2 meses de edad, durante una monitorización sistemática de glucosa cuando fue hospitalizada por otitis bilateral. El control metabólico fue bueno, bajo dieta apropiada, hasta que tuvo 5 años, cuando se inició la terapia con insulina. Sin embargo, a pesar de muchas retiradas de las inyecciones durante varios días, nunca tuvo cetoacidosis. Tuvo 2 hijos, siendo el primero una niña que reveló una diabetes neonatal permanente el primer día de vida y fue tratada inmediatamente con inyecciones de insulina. En 2004 se encontró la mutación de Kir6.2 R201H tanto para la madre como la hija, y los autores de la invención empezaron la terapia con glibenclamida en enero de 2005 [82]. La transferencia fue un gran éxito, ya que el primer comprimido tomado fue suficiente para detener permanentemente las inyecciones de insulina para ambas, con una dosis requerida por debajo de 0,1 mg/kg/día de glibenclamida (la madre a los 36 años, la hija a los 15 años). Ambas mejoraron su control glicémico y su HbA1c (de 7,4% a 6% para la madre y de 9,5 a 7,9% para la hija) con 18 meses de seguimiento ahora y sin efectos secundarios, particularmente sin hipoglicemia recurrente. Como se muestra en la figura 4, los valores glicémicos fueron mucho más estables bajo glibenclamida que bajo terapia de insulina.

SUR1, diabetes mellitus y características neuropsicológicas

Muy recientemente, los autores de la invención observaron siete mutaciones ABCC8 heterocigóticas en 9 de 34 pacientes con diabetes neonatal: L213R y I1424V en dos personas con PND, y C435R, L582V, H1023Y, R1182Q o R1379C en personas con TND (Diabetes Neonatal Transitoria). Los aminoácidos afectados se conservan en la rata, ratón, pollo, y el pez Fugu japonés, sugiriendo que son críticos para la función del canal. Los autores de la invención no observaron estas mutaciones tras secuenciar los exones relevantes de 180 sujetos diabéticos y 140 individuos blancos no diabéticos sin parentesco de origen francés. Además, los autores de la invención no detectaron cambios no sinónimos adicionales en los exones de ABCC8 no afectados por mutaciones en un subconjunto de 110 sujetos diabéticos, incluyendo 24 probandos diagnosticados con diabetes de comienzo en la madurez de los jóvenes (MODY) de familias sin mutaciones asociadas a MODY conocidas.

Se han llevado a cabo las genealogías parciales de familias que portan las mutaciones. Las mutaciones de L213R, L582V (TND36), H1023Y, I1424V y R1379C (TND19) son mutaciones de novo (las mutaciones de L582V, TND16, y R1379C, TND17, también eran heredadas). En las familias C435R, L582V (TND16), R1182Q y R1379C (TND17), los padres eran heterocigotos y los alelos mutantes co-segregados con la diabetes. El padre de TND13 (C435R) fue diagnosticado con diabetes mellitus a la edad de 13; después de la identificación de su mutación, interrumpió la insulina (después de 24 años de tratamiento) tras la respuesta exitosa a la glibenclamida (10 mg/día). Un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) mostró que el padre de TND34 (R1182Q) tiene diabetes; está siendo tratado actualmente con dieta sola. En la familia TND16, los individuos II-3 y II-4 fueron diagnosticados con diabetes después de la edad de 30 por OGTT y están tratados actualmente con dieta sola. A la edad de 32, el padre de TND17 (R1379C) desarrolló diabetes, y está tratado con glibenclamida. El alelo R1379C también se identificó en una abuela, diagnosticada previamente con diabetes gestacional y tratada actualmente con dieta, y una tía abuela diagnosticada con diabetes a la edad de 44 y tratada actualmente con sulfonilureas.

Por lo tanto, los autores de la invención encontraron mutaciones de ABCC8 en 9 de los 34 casos ND en su serie de casos, en los que no se identificó previamente ningún defecto genético. Estos 9 pacientes representan el 12% de los 73 casos ND incluidos en el estudio. De los 29 pacientes PND en el estudio, 12 casos de KCNJ11 representan el 41%, 2 casos ABCC8 el 7%, mientras que casi el 52% siguen sin explicación. Casi el 57% de los 44 casos TND son atribuibles a anomalías en el cromosoma 6q (n=25), 2% a mutaciones de KCNJ11 (n=1) y ~15% a mutaciones de ABCC8 (n=7). La etiología de once casos TND queda por determinar.

Diabetes

La Tabla I proporciona un resumen de las características clínicas de pacientes con SUR1 mutante. La diabetes mellitus se diagnosticó a una mediana de edad de 32 días (intervalo: 3 a 125 días) con hiperglicemia que condujo a poliuria y polidipsia en 5 casos y cetoacidosis en 2 casos. TND 17 y 34 tuvieron bajos pesos al nacer e hiperglicemia. No hubo anticuerpos antiislotos detectables, y la ultrasonografía no reveló anomalías pancreáticas. Se requirió tratamiento inicial con insulina durante 1, 2,5, 3, 4, 4, 8,5 y 10 meses en los probandos TND16, 34, 17, 19, 13, 36 y 28, respectivamente. La última dosis documentada de insulina varió de 0,12 a 1,2 U/kg/día, con una media de 0,67 U/kg/día.

La proteína SUR1 es el receptor de sulfonilurea. Por lo tanto se consideró la posibilidad de que la mutación alterara la unión y de que no pudiera estar presente unión a sulfonilurea en el paciente. Sin embargo, y a pesar de esta

5 posibilidad teórica, después de la identificación de sus mutaciones, se inició la terapia con glibenclamida (gliburida) y se encontró que fue exitosa en los pacientes PND: la insulina se interrumpió después de 2 y 15 días en los pacientes PND12 y 16, respectivamente. Las dosis actuales de glibenclamida (gliburida) son 0,59 y 0,22 mg/kg/día en los pacientes PND12 y PND16, respectivamente. Dos de las personas con TND requirieron insulina de nuevo más adelante en su vida. TND28 se volvió hiperglicémico de nuevo a la edad de 16, se trató con insulina y después se cambió a glipizida (0,16 mg/kg/día). TND 19 requirió insulina a la edad de 11, y a la edad de 16 se cambió a glibenclamida (0,28 mg/kg/día). Estas dosis son el extremo alto de, o exceden, las dosis de glipizida y glibenclamida recomendadas actualmente por la FDA de Estados Unidos para tratar la diabetes tipo 2 en adultos.

Tabla 1. Características clínicas de probandos con diabetes neonatal con SUR1 mutante*													
Familia Nº	Mutación	Sexo	Semanas de gestación	Peso al nacer g (percentil)	Edad días	Peso g	Presentación	Glucosa mmol/litro	Edad años	Altura cm (DE)†	Peso kg (percentil)	Insulina U/kg/día	Tratamiento actual
Diabetes neonatal permanente													
12	L213R	Varón	41	3.065 (22)	125	5.320	Poliuria, polidipsia	28,6	4,75	107,8 (0)	17 (50)	0,12	Glb, 10 mg/día
16	I1424V	Varón	40	3.080 (25)	13	3.360	Cetoacidosis	66	16,5	178 (+0,9)	69 (85)	0,88	Glb, 15 mg/día
Diabetes neonatal transitoria													
13	C435R	Varón	40	3.040 (25)	32	3.575	Poliuria, polidipsia	44,5	4,75	108,8 (+0,5)	17,5 (75)		
16	L582V	Varón	40	3.310 (50)	15	3.210	Poliuria, polidipsia	51,4	5,25	117 (+1,9)	18,4 (50)		
17	R1379C	Mujer	40	2.010 (<3)	3	2.100	Hiper glucemia	6,9	5,25	114,5 (+1,6)	19,5 (82)		
19	R1379C	Mujer	40	2.310 (<3)	60	4.900	Poliuria, polidipsia	22	15,7	158 (-0,8)	54 (70)	1,2	Glb, 10 mg/día
28	H1023Y	Varón	40	3.400 (55)	21	ND	Cetoacidosis	37,8	16	180 (+1,2)	59,5 (60)	0,5	Glp, 10 mg/día
34	R1182Q	Varón	34	1.830 (8)	4	1.680	Hiper glucemia	13,6	2	82 (-1,5)	10,3 (8)		
36	L582V	Varón	40	3.570 (67)	74	6.100	Poliuria, polidipsia	34	1,8	92 (+2)	14 (90)		

* Glb denota glibenclámda, ND no disponible, y Glp glibizida. Para convertir valores para glucosa a miligramos por decilitro, dividir por 0,05551.

† Los valores en paréntesis son la desviación estándar de la norma.

Características neurológicas, musculares y neuropsicológicas

5 El paciente PND12 presentó retraso en el desarrollo, pero, en contraste con algunos individuos que portan una mutación de KCNJ11, no tuvo ataques epilépticos ni debilidad muscular. Sus padres reportaron retraso motor y en el desarrollo, el cual se documentó posteriormente que incluía dispraxia. TND17 presentó distonía menor. TND16 mostró ideación lenta y TND13 presentó dispraxia visual-espacial menor. Ninguno tenía los rasgos faciales asociados con algunas mutaciones de KCNJ11. Ninguno de los otros casos indexados presentó función cognitiva ni desarrollo anormales.

Ensayos metabólicos

10 Los niveles en ayunas de línea base de péptido C en los pacientes PND12 y 16 fueron bajos (0,24 y 0,63 nM), pero aumentaron 358 y 222% a 1,1 y 1,4 nM, respectivamente, 2 horas después del tratamiento con glibenclamida oral. Consistentemente con la disfunción de las células beta, la estimulación por glucagón fue afectada, con incrementos de 79% (0,19 nM) y 106% (0,67 nM) sobre los niveles de la línea base. (Una respuesta normal es un aumento de al menos 150%).

Características clínicas de ND según la etiología genética

15 Los pesos al nacer para casos TND relacionados con anomalías del cromosoma 6 (TND-6q; n=25) fueron bajos, a menudo en el tres por ciento más bajo de la población (20/25 frente a 2/7, P=0,014), cuando se comparan con los de personas con TND causada por SUR1 mutante (Tabla I y Suplemento). Estuvo presente macroglosia en 4 de 25 probandos TND-6q24, pero no en los pacientes TND-SUR1. Se diagnosticó diabetes más pronto en pacientes TND-6q24 en comparación con TND-SUR1 (media de 4 días frente a 29,9 días, P<0,05), lo que probablemente refleja, al menos en parte, los pesos al nacer más bajos de los pacientes TND-6q24 (20 casos frente a 2, respectivamente, P=0,019), dando una probabilidad mayor de monitorización sistemática de glucosa. Otras características clínicas no difirieron, incluyendo el retraso en el desarrollo, la frecuencia y momento de recurrencia de la diabetes. Las anomalías del cromosoma 6 no estuvieron asociadas con PND.

20

Tabla S1. Comparación de características clínicas* de pacientes ND con KCNJ11, ABCC8 mutantes o 6q24 anormal.

	PND-KCNJ11 (n=12)	PND-ABCC8 (n=2)	TND-ABCC8 (n=7)	TND-6q24 (n=25)
GESTACIÓN				
Semanas	38,2 (38-41)	40,5 (40-41)	38,4 (34-40)	38 (36-41)
Peso (g)	2.860,7 (2.110-3.260)<3-60	3.072 (3.065-3.080)22-25	2.795 (1.830-3.570)<3-67	1.830 (1.200-3.570)<3-26
DIAGNOSIS AT				
Edad (días)	67 (1-127)	70 (33-125)	29,9 (3-74)	4 (1-34)
Peso (g)	3.581 (2.110-5.040)	4.340 (3.360-5.320)	3.594,2 (1.680-6.100)	1.994 (1.200-6.100)
Glucosa (mmol/litro)	37,5 (9,5-55)	47,3 (28,6-58)	34 (5,9-51,4)	22 (7,3-43,6)
% de pacientes con				
cetoacidosis	75	50	14	4
poliuria y polidipsia	8	50	57	8
monitorización de glucosa	17	0	29	88
Meses de terapia inicial con insulina	no aplicable	no aplicable	4 (1-10)	2,8 (0-35)
% de pacientes con características neurológicas				
retraso en el desarrollo	25	50	0	12
ataques de epilepsia	8	0	0	0
dispraxia	17	0	14	0

25 * Las características promediadas se expresan como media(intervalo)percentil.

5 La comparación de personas con ND causada por SUR1 mutante (n=9) con aquellas con ND causada por Kir6.2 mutante (n=13) no mostró diferencia significativa en distribución de peso al nacer bajo, edad de diagnóstico, o niveles de glucosa en la presentación. La cetoacidosis estuvo asociada más frecuentemente con diabetes causada por Kir6.2 mutante que con diabetes causada por SUR1 mutante (9/13 frente a 2/9), pero esta diferencia (P=0,09) no fue estadísticamente significativa, debido posiblemente al pequeño tamaño de la muestra. La prevalencia de retraso en el desarrollo no fue diferente (3/13 frente a 1/9) y la epilepsia se diagnosticó en 1/13 casos de ND-Kir6.2, pero ninguno de los casos de ND-SUR1. La dispraxia se observó en dos casos de ND-Kir6.2 y uno de ND-SUR1. En la serie de casos de los autores de la invención, las mutaciones de KCNJ11 están asociadas principalmente con PND (12/13), mientras que la mayoría de mutaciones de ABCC8 (7/9) están relacionadas con TND.

10 Los resultados de los autores de la invención indican que las mutaciones activadoras, heterocigóticas, en ABCC8, que codifica la subunidad reguladora SUR1 de los canales de K⁺ sensibles al ATP encontrados en las células beta, causan diabetes neonatal tanto permanente como transitoria. La comparación de los pacientes ND-SUR1 frente a ND-Kir6.2 no reveló diferencias significativas en la prevalencia de bajo peso al nacer, edad de diagnóstico o gravedad de la hiperglicemia o cetoacidosis acompañante. Las mutaciones de KCNJ11 están asociadas típicamente con PND, mientras que la mayoría de las mutaciones de ABCC8 están asociadas con TND, reflejando quizás una forma menos grave de diabetes.

15 Los informes previos han resaltado una heterogeneidad de síntomas asociados con ND causada por Kir6.2 mutante, lo que puede reflejar la compartición del poro Kir6.2 tanto por canales neuroendocrinos SUR1/Kir6.2 como canales SUR2A/Kir6.2 sarcolemales. Las características neurológicas de varias personas con ND-SUR1 implican que los canales K_{ATP} que contienen SUR1 pueden controlar el potencial de la membrana de células neuronales, tales como neuronas motoras inhibitorias.

20 La diagnosis de diabetes en los padres con mutaciones de ABCC8 es consistente con la diabetes tipo 2 de comienzo en adultos o con una forma leve de TND. El cribado de sangre sistemático en neonatos franceses hace a esto último improbable, y los autores de la invención proponen que las mutaciones de ABCC8 pueden dar lugar a una nueva forma monogénica de diabetes tipo 2, con expresión y edad de comienzo variables. La contribución potencial de mutaciones de ABCC8 sobreactivas a diabetes tipo 2 de comienzo temprano familiar queda por evaluar, pero el presente informe pone énfasis en cómo el entendimiento molecular de una forma pediátrica rara de diabetes puede iluminar la forma más común de la enfermedad.

25 En la práctica clínica no hay manera de distinguir entre pacientes con mutaciones de ABCC8 o KCNJ11 frente a anomalías en el cromosoma 6q24. Se requiere secuenciación de genes, y una estrategia útil es cribar el cromosoma 6 y el KCNJ11 sin intrón corto primero, a menos que los padres presenten hiperglicemia en ayunas, en cuyo caso se analiza GCK. Si no se identifican mutaciones, se analiza ABCC8. El ensayo genético tiene claramente profundas implicaciones para la atención y terapia de los pacientes con ND. En efecto, inesperadamente, en presencia de una mutación en su receptor, las sulfonilureas demostraron ser eficaces en detener el tratamiento con insulina en los pacientes jóvenes y adultos.

Características neuropsicológicas, Kir6.2, SUR1 y tratamiento con sulfonilurea

Los siguientes resultados adicionales muestran que las moléculas que se unen al canal de potasio (como las sulfonilureas) pueden impactar positivamente sobre los aspectos de neurodesarrollo de niños que portan una mutación en la subunidad Kir6.2.

40 Se vio una niña de 5 meses con espasmos infantiles, retraso en el desarrollo, diabetes de comienzo temprano. Tenía una mutación activadora heterocigótica en Kir6.2. Los espasmos infantiles con hipsarritmia en el electroencefalograma eran severos, y refractarios a esteroides. La adición de sulfonilurea oral permitió un control parcial y transitorio de la epilepsia.

45 Un sujeto que tiene una mutación de KCNJ11 privada desarrolló dificultades en el desarrollo leves, asociadas con diabetes mellitus permanente. Después de un tratamiento con sulfonilureas, la insulina pudo ser detenida y los eventos neuropsicológicos mejoraron. Los padres reportaron que la capacidad de concentración y las habilidades motoras finas mejoraron.

50 Además, el resto de los pacientes (10 con ABCC8 (Sur1) o bien KCNJ11 (KIR6.2)) mostraron una mejora en el funcionamiento neuropsicológico como consecuencia de la transferencia a sulfonilureas. Fue obvio que el tono muscular mejoró, así como las características de comportamiento globales.

En base a esos dos casos y esas observaciones, está en camino un ensayo clínico futuro, tanto en pacientes con mutaciones Kir6.2 como SUR1, para corroborar adicionalmente los efectos beneficiosos de las sulfonilureas sobre el desarrollo neuropsicológico en los niños con una mutación en el canal de potasio. Se ha mostrado que los fármacos cruzan la barrera sangre cerebro.

55 Ensayo clínico

Los inventores iniciaron un ensayo clínico para cambiar a niños con diabetes mellitus neonatal permanente debida a

mutación activadora de Kir6.2 o mutación de SUR1, de insulina subcutánea a terapia con glibenclamida oral.

Este ensayo incluyó 10 pacientes. El propósito de este ensayo es en primer lugar terapéutico, cambiando a los pacientes de insulina subcutánea a terapia con glibenclamida oral, y cognitivo, evaluando la mejora potencial bajo terapia con glibenclamida del estado neurológico y de desarrollo de los pacientes. Un paciente ha sido excluido del ensayo. Los pacientes recibieron una cantidad creciente de glibenclamida, de 0,3 mg/kg/día el primer día hasta 0,8 mg/kg/día o la dosis que permitía detener el tratamiento con insulina y obtener una glicemia correcta. La dosis se administra en 2, 3 o 4 veces dependiendo del hábito de comidas.

Se establece un estado neurológico y de desarrollo justo antes del cambio, y dos, seis, doce y dieciocho meses después del comienzo del tratamiento con glibenclamida.

Cada paciente ha sido sometido a una fina evaluación del neurodesarrollo, en particular según las escalas que evalúan de una manera cuantitativa el desarrollo neuropsicomotor en niños (www.ecpa.fr/defaultsite.asp?id=33). Más específicamente, el ensayo neuropsicomotor incluyó los estudios del tono, lateralización, coordinación motora (estática y dinámica), praxis y gnosia, capacidades de atención, capacidades espaciales (batería de ensayos: NP-MOT, ECPA-Elsevier Editor, Vaivre-Douret, 2006, y ensayo EMG, editor ECPA, Vaivre-Douret, 1997). Para niños jóvenes (0 a 4 años de edad) se usó la escala de desarrollo motor (DF-MOT, ECPA editor, Vaivre-Douret, 1999) así como habilidades motoras globales y finas para dar una edad de desarrollo motor. El ensayo neuropsicológico incluyó: habilidades oculo-motoras primero, después escritura (ensayo BHK, ECPA), habilidades para el tiempo (Stambak), diferentes habilidades de memoria, habilidades visuales (ensayo de Rey), coordinación visual-motora (ensayo Beery), habilidades visuo-espaciales (ensayo Khos, imagen Rey), habilidades ejecutivas (ensayo del laberinto Porthus y/o de la torre de Londres del NEPSY), habilidad de atención visuo-espacial, velocidad de escritura y habilidades de lenguaje.

Para la evaluación oftalmológica, se determinan varios criterios. Para niños menores de 6 años, se determinan el electroretinograma (ERG) fotópico y los potenciales evocados visuales (PEV). Para niños de más de 6 años, se realizan EERG de conos, ERG de Flash Único, PEV y electro-oculografía sensorial.

La hipotonía sólo tiene que ser establecida en pacientes que tienen una mutación de Kir6.2.

8 de los 9 pacientes tienen un tratamiento de cambio exitoso para la diabetes.

3 de los 9 pacientes han sido evaluados después de un tratamiento de cambio, y todos ellos mostraron una clara mejora oftalmológica o neuropsicológica.

En particular, un niño de 15 meses y que tenía una mutación de Kir6.2 mostró VEP (potenciales evocados visuales) alargados (>150 ms). Después de 6 meses de tratamiento de cambio, mostró una clara mejoría para VEP de 20 ms.

Otro niño que tenía 5 meses y que tenía una mutación Kir6.2 mostró una hipotonía del axis, y un significativo retraso en el desarrollo de 1 mes. Después de 6 meses de tratamiento de cambio, ya no mostró hipotonía del axis ni retraso en el desarrollo. Por lo tanto, este paciente permite la demostración de una mejora del tono y el desarrollo.

Finalmente, un niño que tenía una mutación de SUR1 L213R y que tenía siete años mostró después de 18 meses de tratamiento de cambio una mejor planificación, una mejora del trastorno de atención, una mejora en el lenguaje y una disminución de la angustia.

Conclusiones generales

En conclusión, los canales K_{ATP} tienen un papel central en la respuesta celular a cambios metabólicos en muchos órganos, y especialmente en la célula β pancreática. Los avances en la comprensión de la función fisiológica de estos canales, y en particular de las subunidades Kir6.2 y SUR1, han encontrado una aplicación clínica importante para pacientes que tienen diabetes neonatal permanente y recurrente o diabetes de comienzo tardío debido a mutaciones de KCNJ11 y ABCC8. El cambio de inyecciones de insulina a terapia con glibenclamida oral es sumamente eficaz para la mayoría de los pacientes y para la seguridad.

Esto ilumina cómo el entendimiento molecular de alguna forma monogénica de diabetes puede conducir a un cambio inesperado del tratamiento en niños. Este es un ejemplo espectacular por el que una estrategia farmacogenómica mejora de una manera extraordinaria la calidad de vida de nuestros pacientes jóvenes.

Tabla 2

Mutaciones del gen KCNJ11 identificadas en diabetes neonatal permanente y características fenotípicas asociadas

Mutación	Sexo	Edad de diabetes	Características clínicas	Referencia
R201C De novo	M	37 días	Normales	Vaxillaire et al Diabetes 53:2719-2722, 2004
R201H De novo	M	17 días	Normales	
V59M De novo	M	127 días	Leucodistrofia Retraso en el desarrollo Esofagia	
E322K De novo	F	3 días	Normales	
R201C De novo	F	1,25 meses	Normales	Edghill et al Diabetes 53:2998-3001, 2004
R176C Hermanas y madre con mutación pero sin diabetes	F	17 meses	Normales	
R201H Hijo debajo	F	6 semanas	Normales	Gloyn et al [14]
R201H	M	Nacimiento	Normales	
R201H	F	6 semanas	Normales	
R201C	M	4 semanas	Normales	
V59M	M	Nacimiento	Normales	
R201H Padre de 2 debajo	M	12 semanas	Normales	
R201H	M	< 4 semanas	Normales	
R201H	M	< 3 semanas	Normales	
V59M	M	5 semanas	Debilidad muscular Retraso en el desarrollo	
V59G	M	1 semana	Debilidad muscular Retraso en el desarrollo	

ES 2 589 953 T3

Mutación	Sexo	Edad de diabetes	Características clínicas	Referencia
R201C De novo	M	37 días	Normales	Vaxillaire et al Diabetes 53:2719-2722, 2004
R201H De novo	M	17 días	Normales	
V59M De novo	M	127 días	Leucodistrofia Retraso en el desarrollo Esofagia	
E322K De novo	F	3 días	Normales	
R201C De novo	F	1,25 meses	Normales	Edghill et al Diabetes 53:2998-3001, 2004
R176C Hermanas y madre con mutación pero sin diabetes	F	17 meses	Normales	
			Epilepsia Características dismórficas	
Q52R	M	5 semanas	Debilidad muscular Retraso en el desarrollo Epilepsia Características dismórficas	
I296L	F	26 semanas	Debilidad muscular Retraso en el desarrollo Epilepsia Características dismórficas	
R201H	M	68 días	Normales	Zung et al [73]
F35V		12 semanas	Normales	Sagen et al [74]
V59M		1 semana	Síntomas dismórficos	
V59M		6 semanas	Características dismórficas	
V59M		6 semanas	Características dismórficas	

ES 2 589 953 T3

Mutación	Sexo	Edad de diabetes	Características clínicas	Referencia
R201C De novo	M	37 días	Normales	Vaxillaire et al Diabetes 53:2719-2722, 2004
R201H De novo	M	17 días	Normales	
V59M De novo	M	127 días	Leucodistrofia Retraso en el desarrollo Esofagia	
E322K De novo	F	3 días	Normales	
R201C De novo	F	1,25 meses	Normales	Edghill et al Diabetes 53:2998-3001, 2004
R176C Hermanas y madre con mutación pero sin diabetes	F	17 meses	Normales	
R201H Madre del de debajo	F	24 semanas	Normales	
R201H		2 semanas	Normales	
Y330C Padre del de debajo	M	< 1 semana	Síntomas neurológicos	
Y330C		6 semanas	Normales	
F333I		10 semanas	Normales	
R201H	M	3 semanas	Normales	Klupa et al Diabetologia 48:1029-31, 2005
R201L	F	4,1 meses		Codner et al [75]
V59M	M	3 días		Massa et al [65]
K170R	M	40 días		
R201C	M	49 días	Debilidad muscular Retraso en el desarrollo	

ES 2 589 953 T3

Mutación	Sexo	Edad de diabetes	Características clínicas	Referencia
R201C De novo	M	37 días	Normales	Vaxillaire et al Diabetes 53:2719-2722, 2004
R201H De novo	M	17 días	Normales	
V59M De novo	M	127 días	Leucodistrofia Retraso en el desarrollo Esofagia	
E322K De novo	F	3 días	Normales	
R201C De novo	F	1,25 meses	Normales	Edghill et al Diabetes 53:2998-3001, 2004
R176C Hermanas y madre con mutación pero sin diabetes	F	17 meses	Normales	
V59M	M	58 días	Retraso en el desarrollo	
V59M	F	60 días	Debilidad muscular Retraso en el desarrollo	
K170N	F	63 días	Retraso en el desarrollo	
R50P	M	87 días	Retraso en el desarrollo	
V59M	M	182 días		
C42R	M	6 semanas a 12 meses	Normales	
C42R padre de probando	M	22 años	Normales	
C42R Abuelo de probando	M	3 años Sulfonilurea a los 23 años	Normales	
C42R Tía paterna de probando	F	28 años Sulfonilurea después de 4	Normales	Yorifuji et al JCEM 90:3174-78, 2005

ES 2 589 953 T3

Mutación	Sexo	Edad de diabetes	Características clínicas	Referencia
R201C De novo	M	37 días	Normales	Vaxillaire et al Diabetes 53:2719-2722, 2004
R201H De novo	M	17 días	Normales	
V59M De novo	M	127 días	Leucodistrofia Retraso en el desarrollo Esofagia	
E322K De novo	F	3 días	Normales	
R201C De novo	F	1,25 meses	Normales	Edghill et al Diabetes 53:2998-3001, 2004
R176C Hermanas y madre con mutación pero sin diabetes	F	17 meses	Normales	
		meses		
H46Y, R50Q, G53D, L164P, C166Y, K170T, Y330S				Flanagan et al Diabetologia 49:1190-97, 2006
F35L				Proks et al Diabetes 55:1731-1737, 2006
R50Q			Normales	Shimomura et al Diabetes 55:1705-12, 2006
C166F	F	3 meses	Retraso en el desarrollo Epilepsia grave Hipotonía	Bahi-buisson et al Am J Hum Genet Suppl 1 : 323, 2004

Tabla 3

Lista de ligandos de canales de potasio (incluyendo las sulfonilureas) disponibles en Francia, (Source Vidal)

Sulfamidas hipoglicémicas

Carbotamida = Glucidoral

5 Glibenclamida (gliburida EE.UU.) = Daonil et Daonil faible, Euglucan, Hemi-Daonil, Miglucan

Glibornurida = Glutril

Glicazida = Diamicron

Glimepirida = Amarel

Glipizida = Glibénèse, Minidiab, Ozidia

10 **Glinidas (se unen al canal de potasio)**

Repaglinida = NovoNorm

Asociaciones

Metformina + glibenclamida = Glucovance

Referencias

1. Bryan, J., et al., Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. *Curr Pharm Des*, 2005. 11(21): p. 2699-716
- 5 2. Mikhailov, M.V., et al., 3-D Structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *Embo J*, 2005. 24(23): p. 4166-75.
3. Bond, C.T., et al., Cloning and functional expression of the cDNA encoding an inwardly-rectifying potassium channel expressed in pancreatic beta-cells and in the brain. *FEBS Lett*, 1995. 367(1): p. 61-6.
4. Clement, J.P.t., et al., Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron*, 1997, 18(5): p. 827-38.
- 10 5. Inagaki, N., et al., A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*, 1996. 16(5): p. 1011-7.
6. Isomoto, S., et al., A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem*, 1996. 271(40): p. 24321-4.
7. Inagaki, N., et al., Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 1995. 270(5239): p. 1166-70.
- 15 8. Gopel, S.O., et al., Regulation of glucagon release in mouse β -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na⁺ channels. *J Physiol*, 2000. 528 (Pt 3): p. 509-20.
9. Gopel, S.O., et al., Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting β cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol*, 2000. 528 (Pt 3): p. 497-507.
- 20 10. Gribble, F.M., et al., A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes*, 2003. 52(5): p. 1147-54.
11. Cook, D.L., et al., ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes*, 1988. 37(5): p. 495-8.
12. Aguilar-Bryan, L., et al., Cloning of the beta cell high affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*, 1995. 268(5209): p. 423-6.
- 25 13. Gribble, F.M., et al., Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 1997. 498 (Pt 1): p. 87-98.
14. Gloyn, A.L., et al., Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*, 2004. 350(18): p. 1838-49.
- 30 15. Winarto, A., et al., Morphological changes in pancreatic islets of KATP channel-deficient mice: the involvement of KATP channels in the survival of insulin cells and the maintenance of islet architecture. *Arch Histol Cytol*, 2001. 64(1): p. 59-67.
16. Miki, T., et al., Roles of ATP-sensitive K⁺ channels in cell survival and differentiation in the endocrine pancreas. *Diabetes*, 2001. 50 Suppl 1: p. S48-51.
17. Proks, P., et al., Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*, 2002. 51 Suppl 3: p. S368-76.
- 35 18. Seino, S. y T. Miki, Gene targeting approach to clarification of ion channel function: studies of Kir6.x null mice. *J Physiol*, 2004. 554 (Pt 2): p. 295-300.
19. Dunn-Meynell, A.A., N.E. Rawson, y B.E. Levin, Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain res*, 1998. 814(1-2): p. 41-54.
20. Yamada, K. y N. Inagaki, Neuroprotection by KATP channels. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. 38(6): p. 945-9.
- 40 21. Heron-Milhavet, L., et al., Protection against hypoxic-ischemic injury in transgenic mice overexpressing Kir6.2 channel pore in forebrain. *Mol Cell Neurosci*, 2004. 25(4): p. 585-93.
22. Yamada, K. y N. Inagaki, ATP-sensitive K(+) channels in the brain: sensors of hypoxic conditions. *News Physiol Sci*, 2002. 17: p. 127-30.
- 45 23. Miki, T., et al., ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci*, 2001. 4(5): p. 507-12.
24. Deacon, R.M., et al., Behavioral phenotyping of mice lacking the K ATP channel subunit Kir6.2. *Physiol Behav*,

2006. 87(4): p. 723-33.
25. Gong, B., et al., KATP channels depress force by reducing action potential amplitude in mouse EDL and soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 285(6): p. C1464-74.
- 5 26. Zingman, L.V., et al., Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. 99(20): p. 13278-83.
27. Hodgson, D.M., et al., Cellular remodeling in heart failure disrupts K(ATP) channel-dependent stress tolerance. *Embo J*, 2003. 22(8): p. 1732-42.
28. Kane, G.C., et al., ATP-sensitive K⁺ channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits. *Diabetes*, 2004. 53 Suppl 3: p. S169-75.
- 10 29. Terzic, A., A. Jahangir, y Y. Kurachi, Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels: regulation by intracellular nucleotides and K⁺ channel-opening drugs. *Am J Physiol*, 1995. 369(3 Pt 1): p. C525-45.
30. Nichols, C.G. y W.J. Lederer, Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol*, 1991. 261(6 Pt 2): p. H1675-86.
- 15 31. Liu, X.K., et al., Genetic disruption of Kir6.2, the pore-forming subunit of ATP-sensitive K⁺ channel, predisposes to catecholamine-induced ventricular dysrhythmia. *Diabetes*, 2004. 53 Suppl 3: p. S165-8.
32. Suzuki, M., et al., Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*, 2002. 109(4): p. 509-16.
33. Bienengraeber, M., et al., ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet*, 2004. 36(4): p. 382-7.
- 20 34. Quayle, J.M., M.T. Nelson, y N.B. Standen, ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*, 1997. 77(4): p. 1165-232.
35. Kleppisch, T. y M.T. Nelson, ATP-sensitive K⁺ currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation. *Am J Physiol*, 1995. 269(5 Pt 2): p. H1634-40.
- 25 36. Rahier, J., et al., The basic structural lesion of persistent neonatal hypoglycaemia with hyperinsulinism: deficiency of pancreatic D cells or hyperactivity of B cells? *Diabetologia*, 1984. 26(4): p. 282-9.
37. Rahier, J., et al., Partial or near-total pancreatectomy for persistent neonatal hyperinsulinaemic hypoglycaemia: the pathologist's role. *Histopathology*, 1998. 32(1): p. 15-9.
38. Sempoux, C., et al., neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia: heterogeneity of the syndrome and keys for differential diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(5): p. 1455-61.
- 30 39. de Lonlay, P., et al., Somatic deletion of the imprinted 11p15 region in sporadic persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy is specific of focal adenomatous hyperplasia and endorses partial pancreatectomy. *J Clin Invest*, 1997. 100(4): p. 802-7.
- 35 40. Verkarre, V., et al., Paternal mutation of the sulfonylurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J Clin Invest*, 1998. 102(7): p. 1286-91.
41. Dunne, M.J., et al., Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev*, 2004. 84(1): p. 239-75.
42. Glaser, B., et al., Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med*, 1998. 338(4): p. 226-30.
- 40 43. Stanley, C.A., et al., Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med*, 1998. 338(19): p. 1352-7.
44. Zammarchi, E., et al., Biochemical evaluation of a patient with a familial form of leucine-sensitive hypoglycemia and concomitant hyperammonemia. *Metabolism*, 1996. 45(8): p. 957-60.
- 45 45. Clayton, P.T., et al., Hyperinsulinism in short chain L-3-hydroxiacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest*, 2001. 108(3): p. 457-65.
46. Hojlund, K., et al., A novel syndrome of autosomal-dominant hyperinsulinemic hypoglycemia linked to a mutation in the human insulin receptor gene. *Diabetes*, 2004. 53(6): p. 1592-8.

47. Thomas, P.M., et al., Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science*, 1995. 268(5209): p. 426-9.
48. Thomas, P., Y. Ye, y E. Lightner, Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet*, 1996. 5(11): p. 1809-12.
- 5 49. Kane, C., et al., Loss of functional KATP channels in pancreatic beta-cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Nat Med*, 1996. 2(12): p. 1344-7.
50. Nestorowicz, A., et al., Mutations in the sulfonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews. *Hum Mol Genet*, 1996. 5(11): p. 1813-22.
- 10 51. Nestorowicz, A., et al., A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism. *Diabetes*, 1997. 46(11): p. 1743-6.
52. Huopio, H., et al., A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulfonylurea receptor 1. *Lancet*, 2003. 361(9354): p. 301-7.
53. Koster, J.C., et al., Targeted overactivity of beta cell K(ATP) channels induces profound neonatal diabetes. *Cell*, 2000. 100(6): p. 645-54.
- 15 54. Hani, E.H., et al., A missense mutation in hepatocyte nuclear factor-4 alpha, resulting in a reduced transactivation activity, in human late-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1998. 101(3): p. 521-6.
55. Gloyn, A.L., et al., Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003. 52(2): p. 568-72.
- 20 56. Florez, J.C., et al., Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes*, 2004. 53(5): p. 1360-8.
57. Tschritter, O., et al., The prevalent Glu23Lys polymorphism in the potassium inward rectifier 6.2 (KIR6.2) gene is associated with impaired glucagon suppression in response to hyperglycemia. *Diabetes*, 2002. 51(9): p. 2854-60.
58. lafusco, D., et al., Permanent diabetes mellitus in the first year of life. *Diabetologia*, 2002. 45(6): p. 798-804.
- 25 59. Polak, M. y J. Shield, Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. *Semin neonatol*, 2004. 9(1): p. 59-65.
60. Metz, C., et al., neonatal diabetes mellitus: chromosomal analysis in transient and permanent cases. *J Pediatr*, 2002. 141(4): p. 483-9.
61. Njolstad, P.R., et al., Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med*, 2001. 344(21): p. 1588-92.
- 30 62. Njostad, P.R., et al., Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway. *Diabetes*, 2003. 52(11): p. 2854-60.
63. Edghill, E.L., et al., Activating mutations in the KCNJ11 gene encoding the ATP-sensitive K⁺ channel subunit Kir6.2 are rare in clinically defined type 1 diabetes diagnosed before 2 years. *Diabetes*, 2004. 53(11): p. 2998-3001.
64. Vaxillaire, M., et al., Kir6.2 mutations are a common cause of permanent neonatal diabetes in a large cohort of French patients. *Diabetes*, 2004. 53(10): p. 2719-22.
- 35 65. Massa, O., et al., KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Hum mutat*, 2005. 25(1): p. 22-7.
66. Gloyn, A.L., et al., Relapsing diabetes can result from moderately activating mutations in KCNJ11. *Hum Mol Genet*, 2005. 14(7): p. 925-34.
- 40 67. Proks, P., et al., Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004. 101(50): p. 17539-44.
68. Antcliff, J.F., et al., Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *Embo J*, 2005. 24(2): p. 229-39.
69. John, S.A., et al., Molecular mechanism for ATP-dependent closure of the K⁺ channel Kir6.2. *J Physiol*, 2003. 552(Pt 1): p. 23-34.
- 45 70. Ribalet, B., S.A. John, y J.N. Weiss, Molecular basis for Kir6.2 channel inhibition by adenine nucleotides. *Biophys J*, 2003. 84(1): p. 266-76.

71. Tammaro, P., P. Proks, y F.M. Ashcroft, Functional effects of naturally occurring KCNJ11 mutations causing neonatal diabetes on cloned cardiac KATP channels. *J Physiol*, 2006. 571 (Pt 1): p. 3-14.
72. Gribble, F.M., et al., Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K(ATP) channels. *Diabetes*, 1998. 47(9): p. 1412-8.
- 5 73. Zung, A., et. al., Glibenclamide treatment in permanent neonatal diabetes mellitus due to an activating mutation in Kir6.2. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(11): p. 5504-7.
74. Sagen, J.V., et al., Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes*, 2004. 53(10): p. 2713-8.
- 10 75. Codner, E., et al., High-dose glibenclamide can replace insulin therapy despite transitory diarrhea in early-onset diabetes caused by a novel R201L Kir6.2 mutation. *Diabetes Care*, 2005. 28(3): p. 758-9.
76. Henquin, J.C., Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes*, 2004. 53 Suppl 3: p. S48-58.
77. Gribble, F.M. y F.M. Ashcroft, Differential sensitivity of beta-cell and extrapancreatic K(ATP) channels to gliclazide. *Diabetologia*, 1999. 42(7): p. 845-8.
- 15 78. Gribble, F.M., S.J. Tucker, y F.M. Ashcroft, The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channels currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol*, 1997. 504(Pt 1): p. 35-45.
79. Nagashima, K., et al., Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res Clin Pract*, 2004. 66 Suppl 1: p. S75-8.
- 20 80. Maedler, K., et al., Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(1): p. 501-6.
81. Rustenbeck, I., et al., Beta-cell toxicity of ATP-sensitive K⁺ channel-blocking insulin secretagogues. *Biochem Pharmacol*, 2004. 67(9): p. 1733-41.
- 25 82. Pearson et al, Switching from insulin to Oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations, *New England Journal of Medicine*, in Publication.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ligando del canal de potasio sensible al ATP seleccionado de sulfamidas y glinidas, o cualquier combinación de las mismas, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la diabetes mellitus y/o un trastorno neuropsicológico, muscular y/o neurológico en un sujeto que tiene un polipéptido SUR1 mutado, defectivo, en donde el polipéptido SUR1 mutado exhibe al menos una de las siguientes mutaciones de aminoácidos: L213R, I1424V, C435R, L582V, H1023Y, R1182Q y R1379C.
- 5
2. El uso de la reivindicación 1, en donde el ligando se selecciona de Carbutamida (Glucidoral); Glibenclamida; gliburida; Glibornurida (Glutril); Glicazida (Diamicron); Glimepirida (Amarel); Glipizida (Glibénèse, Minidiab, Ozidia); Repaglinida (NovoNorm), solos o bien en combinaciones.
- 10
3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto es un niño o un adulto.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el trastorno neuropsicológico y/o muscular y/o neurológico se selecciona de epilepsia, retraso en el desarrollo, debilidad muscular, dispraxia, dislexia, distonía, disfasia, y trastornos oculares que incluyen trastornos coriorretinales.

FIGURA 1

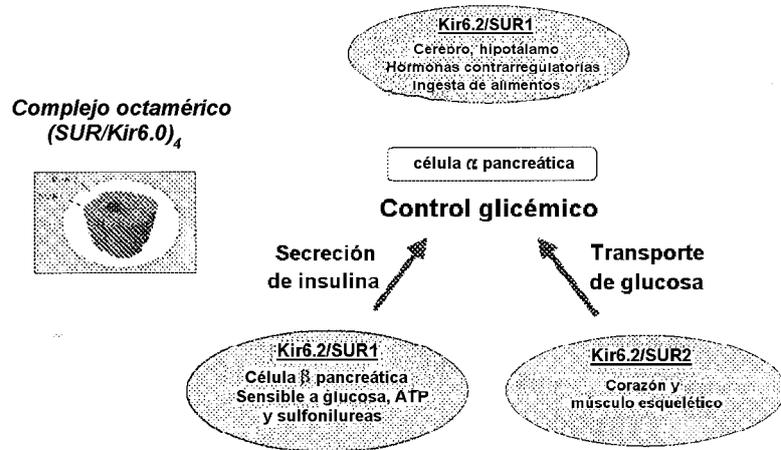


FIGURA 2

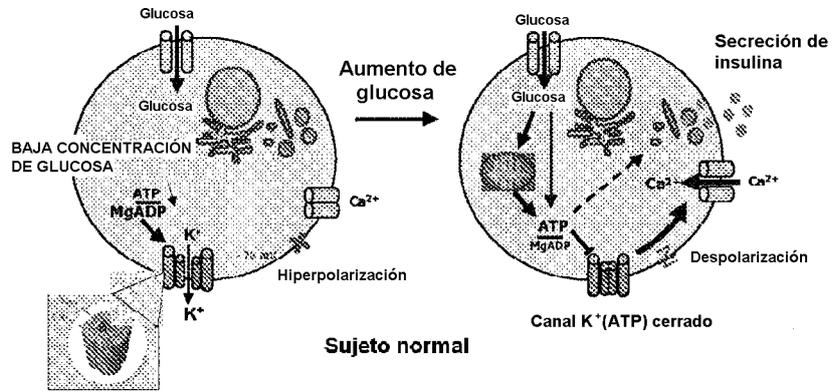


FIGURA 3

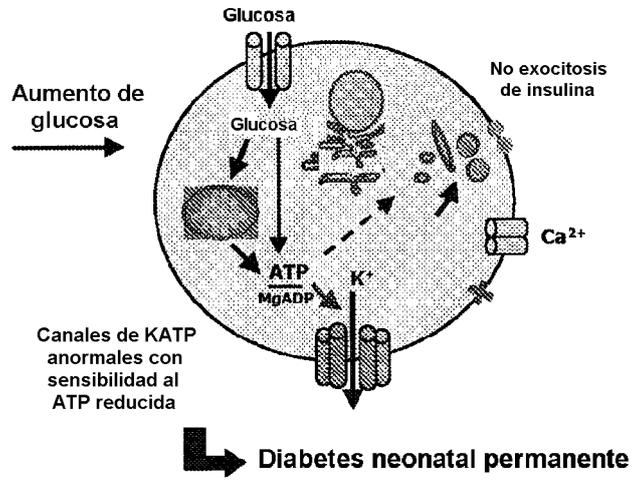


FIGURA 4

