

Campo técnico

La solicitud se refiere en general a medicamentos y al tratamiento de, por ejemplo, condiciones asociadas a hiperinsulinemia. Los trastornos relacionados con secreción de insulina son una variedad de condiciones severas caracterizadas habitualmente por la falta de tratamientos y la grave carga para los pacientes. Se necesitan con urgencia nuevas estrategias terapéuticas para resolver las necesidades insatisfechas habituales de los trastornos relacionados con la secreción de insulina. Un enfoque prometedor se basa en el uso de péptidos para dirigirse a vías pertinentes específicas. Las secuencias derivadas de péptido C se han mostrado prometedoras para modular la secreción de insulina y otros procesos, tal como angiogénesis. La solicitud también se refiere a sustancias y métodos para tratar o prevenir la hipoglucemia en hiperinsulinemia, en particular en la mayoría de las causas de la hipoglucemia persistente en hiperinsulinemia congénita en niños.

Antecedentes

Los trastornos relacionados con secreción de insulina (ISRД) son un grupo heterogéneo de condiciones caracterizadas por secreción alterada de insulina, dando por resultado graves condiciones debilitantes. Los ISRД son un problema global de rápido crecimiento que afecta colectivamente a más de 6 % de la población adulta mundial (con pacientes con T1DM que representan 5-15 % de estos números) y números crecientes en las últimas décadas. Debido a la gran población de pacientes y a la elevada carga de enfermedad, los ISRД representan un inmenso impacto económico social y sanitario a nivel mundial. La insulina es fundamental en estos trastornos, una hormona peptídica que mantiene niveles normales de glucosa en sangre al facilitar la captación celular de glucosa. Las células β pancreáticas se ajustan finamente para secretar insulina de tal forma que los niveles de glucosa en plasma se mantengan dentro de un intervalo fisiológico estrecho (3,5-5,5 mmol/L). La hipoglucemia hiperinsulinémica (HH) es la secreción inapropiada de insulina en presencia de niveles bajos de glucosa en plasma y conduce a hipoglucemia severa y persistente en neonatos y niños. Se ha descrito que las mutaciones en 12 genes clave diferentes (ABCC8, KCNJ11, GLUD1, GCK, HADH, SLC16A1, UCP2, HNF4A, HNF1A, HK1, PGM1 y PMM2) que están implicados en la regulación de la secreción de insulina de células β pancreáticas son responsables de los mecanismos moleculares subyacentes que conducen a HH

congénita.

Cuando la insulina se secreta en exceso, como por ejemplo se observa en el hiperinsulinismo congénito (ICC), puede dar por resultado una patología severa caracterizada por hipoglucemia aguda. En tanto que la secreción deficiente de insulina, como en la diabetes tipo 1 (T1DM), puede conducir a hiperglucemia severa. Ambas condiciones pueden conducir potencialmente a situaciones que ponen en peligro la vida. En el caso de la T1DM, el descubrimiento del reemplazo de insulina representó un gran avance para el tratamiento del que se benefician millones de pacientes hasta la fecha. Sin embargo, a pesar del reemplazo de insulina, los pacientes con diabetes aún enfrentan una carga de enfermedad significativa, que se manifiesta, entre otros, por una desregulación metabólica que conduce a complicaciones asociadas a la enfermedad, tal como vasculopatías. La insulina es la hormona más importante para controlar la concentración de glucosa en la sangre. Conforme se comen alimentos, la glucosa en sangre aumenta y el páncreas secreta insulina para mantener la glucosa en sangre en el intervalo normal. La insulina actúa al conducir la glucosa a las células del cuerpo. Esta acción de la insulina tiene dos efectos: 1) mantener los niveles de glucosa en sangre y 2) almacenar glucosa particularmente como glucógeno en el hígado. Una vez que se completa la alimentación y los niveles de glucosa caen, se apaga la secreción de insulina, lo que permite que las reservas de glucosa en glucógeno se liberen en el torrente sanguíneo para mantener la glucosa en sangre normal. Además, con la desactivación de la secreción de insulina, las reservas de proteínas y grasas se vuelven accesibles y se pueden usar en lugar de glucosa como fuentes de combustible. De esta manera, ya sea que uno coma o esté en ayunas, los niveles de glucosa en sangre permanecen en el intervalo normal y el cuerpo tiene acceso a energía en todo momento.

En los ISRD hiperinsulinémicos menos comunes, tal como CHI (Therapies and outcomes of congenital hyperinsulinism-induced hypoglycemia. Diabet Med. 2019 Jan;36(1):9-21), el objetivo inmediato de tratamiento es estabilizar los niveles de glucosa en plasma y lograr la normoglucemia. Esto usualmente se logra mediante la administración adicional de dextrosa. La dextrosa oral rara vez es capaz de prevenir la hipoglucemia severa; en muchos casos se requiere dextrosa de alta concentración a través de un catéter venoso central. Para incrementar la glucosa en sangre, el glucagón promueve la producción de glucosa hepática al incrementar la glucogenólisis y gluconeogénesis y al disminuir la glucogénesis y glucólisis de manera concertada mediante múltiples mecanismos. Los niños con CHI responden fácilmente al tratamiento con glucagón, lo que permite la glucogénesis

de-novo; las infusiones continuas de glucagón, administradas de manera intravenosa, pueden reducir la dependencia de grandes volúmenes de líquido, particularmente si el acceso al catéter venoso central es difícil. Por lo tanto, se recomienda el uso temprano de glucagón para asegurar el logro rápido de la normoglucemia sin inducir sobrecarga de líquidos y complicaciones tal como edema pulmonar, insuficiencia cardíaca y desequilibrio electrolítico. El glucagón se ha usado en infusiones subcutáneas continuas en el tratamiento a largo plazo de CHI; sin embargo, la oclusión de catéter comúnmente se presenta como resultado de la fibrilación de glucagón nativo en soluciones de movimiento lento que hacen que el tratamiento sea inseguro e ineficaz. Las formulaciones de glucagón más nuevas que son solubles y estables en solución salina pueden proporcionar opciones de tratamiento a largo plazo. En tanto que el glucagón es en general efectivo en CHI, se necesitan monitorear los efectos secundarios, incluida la posibilidad de eritema migratorio necrolítico.

El primer paso en la acción de la insulina es la unión de las hormonas al receptor de insulina (INSR), una glucoproteína de membrana integral, también llamada CD220 o HHF5. INSR pertenece a la superfamilia de receptores de factor de crecimiento de tirosina cinasa y consiste en dos subunidades α extracelulares que se unen a insulina y dos subunidades β transmembrana con actividad tirosina cinasa intrínseca. Una secuencia de aminoácidos de INSR se describe en la patente de Estados Unidos 4,761,371 y como secuencia de referencia NCBI NP_000199.2. INSR se expresa como dos isoformas, INSR-A e INSR-B. Las isoformas de INSR también forman INSR-A / INSR-B y heterodímeros híbridos de receptor INSR / IGF-1R, pero su papel en la fisiología y enfermedad aún no se comprende completamente.

Cuando la insulina se une al INSR, el receptor se activa por autofosforilación de tirosina, y la tirosina cinasa de INSR fosforila diferentes moléculas efectoras que incluyen el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1), dando por resultado acción hormonal (Ullrich et al., *Nature* 313: 756-761, 1985; Goldfine et al., *Endocrine Reviews* 8: 235-255, 1987; White and Kahn, *Journal Bio*26. 1-4, 1994). La unión al IRS-1 y la fosforilación incrementan en última instancia la molécula transportadora de glucosa de alta afinidad (Glut4) en la membrana exterior de tejidos sensibles a insulina, incluidas células musculares y tejido adiposo, dando por resultado captación incrementada de glucosa de la sangre. Glut4 se transfiere de vesículas intracelulares a la superficie celular donde puede mediar el transporte de glucosa a la célula. La señalización incrementada de INSR conduce a captación incrementada de glucosa por las células, hipoglucemia (glucosa circulante disminuida) y todas las secuelas resultantes.

La hiperinsulinemia endógena (HI) es una condición clínica anormal que implica una secreción excesiva de insulina. Se relaciona en 55 % de los casos con insulinoma. Otras causas de hiperinsulinemia endógena son posibles tal como hiperplasia de células de islotes, nesidioblastosis o anticuerpos contra insulina o contra receptor de insulina. La diferenciación entre estas diferentes etiologías puede ser difícil, especialmente en los casos donde los exámenes morfológicos son negativos. Aproximadamente 1 de cada 50.000 bebés nace con la enfermedad hiperinsulinemia congénita (CHI). Un defecto supuestamente genético significa que las células beta en el páncreas de estos niños producen demasiada insulina. Como resultado, los niños tienen un riesgo constante de un nivel bajo de glucosa en sangre (hipoglucemia), que puede conducir a daño cerebral grave. Sin intervención rápida, la mayoría de los niños morirían.

El hiperinsulinismo congénito (*Horm Res Paediatr* 2018;89:82-89) se caracteriza por hipoglucemia persistente debido a una secreción de insulina desregulada y en exceso. Comprende un grupo heterogéneo de trastornos, con la etiología genética subyacente identificada en aproximadamente 40 % de los pacientes. Hasta ahora, se han descrito 11 mutaciones causales diferentes. Estas mutaciones parecen estar relacionadas principalmente con el canal K⁺ sensible a ATP (canal KATP) que detecta cambios metabólicos en la célula β pancreática, acoplando de este modo el metabolismo a la actividad eléctrica y en última instancia, a la secreción de insulina. Cuando los canales KATP se abren, las células β se hiperpolarizan y se suprime la secreción de insulina. En CHI, la apertura de estos canales parece estar comprometida, dando por resultado una secreción continua de insulina, incluso en condiciones de hipoglucemia (persistente). El hiperinsulinismo congénito es un trastorno genético raro, 1 de cada 50.000 nacimientos, provocado por mutaciones en genes responsables de producir insulina. Los pacientes con CHI se caracterizan por una secreción de insulina anormalmente alta por las células β en el páncreas, lo que conduce a padecer episodios frecuentes de bajo nivel de azúcar en sangre (hipoglucemia). Como el cerebro de los recién nacidos y bebés requiere un mayor consumo de glucosa en comparación con los adultos, los recién nacidos son particularmente vulnerables a CHI. El objetivo del tratamiento de emergencia para la hipoglucemia hiperinsulinémica (HH) es lograr la normoglucemia de inmediato y mantener los niveles de glucosa en plasma en un intervalo seguro (>3,5 mmol/L) en tanto que se identifica la etiología subyacente y se determina el tratamiento a largo plazo.

Si la hipoglucemia no responde a la alimentación oral, la glucosa se debe administrar de manera intravenosa. Los pacientes con HH usualmente requieren una velocidad de

infusión de glucosa muy alta para lograr y mantener la normoglucemia. El glucagón también se puede administrar de emergencia para mantener niveles adecuados de glucosa en sangre.

Los episodios repetidos de hipoglucemia debido a la CHI no diagnosticada y/o no tratada en bebés se pueden traducir en complicaciones potencialmente mortales con lesión cerebral hipoglucémica y riesgo elevado de daño cerebral severo y permanente, que frecuentemente conduce a trastornos irreversibles de neurodesarrollo. Las formas difusas de CHI afectan a todos los islotes en el páncreas, en tanto que las formas focales afectan solo a una región determinada. El tratamiento para las formas focales de CHI se basa en la escisión quirúrgica del área afectada, en tanto que los pacientes con formas difusas dependen de la ingesta permanente de glucosa y de una farmacoterapia estrictamente controlada. Sin embargo, los efectos secundarios pueden ser severos y el tratamiento no siempre es efectivo para los pacientes. Como resultado, la única solución existente para estos pacientes es la remoción quirúrgica del páncreas, que conduce a una amplia gama de efectos secundarios, entre ellos problemas digestivos y hormonales asociados, y diabetes, que requieren una medicación estricta de por vida y una calidad de vida general reducida. Por lo tanto, se necesitan con urgencia estrategias de tratamiento más efectivas y menos agresivas para pacientes con CHI. El hiperinsulinismo en bebés es uno de los problemas más difíciles de manejar en endocrinología pediátrica contemporánea. El reconocimiento temprano y manejo preciso de CHI es de gran importancia a fin de prevenir el daño cerebral y los consiguientes problemas de neurodesarrollo. Aunque el diagnóstico usualmente se puede lograr sin dificultad, presenta al pediatra problemas formidables de manejo diario. A pesar de los avances recientes en la comprensión de la fisiopatología del hiperinsulinismo, el resultado neurológico sigue siendo deficiente y, frecuentemente, existe una opción de tratamientos insatisfactorios, con secuelas de por vida para el niño y su familia. En la forma focal de CHI, las células β pancreáticas hiperfuncionantes se localizan en una región solitaria del páncreas, como una entidad focal que se puede detectar por [F18]FDOPA-PET/CT. El tratamiento de elección para la forma focal es la escisión quirúrgica de la lesión. En cambio, en pacientes con la forma difusa de CHI, el tratamiento de elección consiste en glucosa suplementaria y farmacoterapia. Pero incluso cuando el tratamiento está disponible y a tiempo, no siempre es la solución perfecta. Más de tres cuartas partes de los pacientes no responden a la medicación, por lo que la remoción quirúrgica del páncreas completo es la única opción. Este procedimiento importante puede salvar sus vidas. Sin embargo, causa diabetes de por vida y problemas digestivos crónicos

y conlleva el riesgo habitual de posibles complicaciones para los niños muy pequeños que se someten a una cirugía mayor.

La hiperinsulinemia congénita con hipoglucemia también se ha conocido bajo una variedad de nombres descriptivos diferentes, incluidos hipoglucemia “idiopática” de la infancia, hipoglucemia sensible a leucina, insulinoma neonatal, microadenomatosis pancreática, nesidioblastosis, hiperinsulinemia persistente, hipoglucemia de la infancia e hiperinsulinismo congénito. Se reconocen tanto las formas esporádicas como las familiares de la enfermedad, teniendo las primeras una incidencia estimada en Europa occidental de uno de cada 50 000 nacimientos. En las comunidades europeas aisladas, incluidas partes de Finlandia, la incidencia de enfermedad es mucho mayor; la mayor incidencia se encuentra en sociedades con altas tasas de consanguinidad. En estas culturas, particularmente en la Península Arábiga, la incidencia puede ser tan alta como uno de cada 2500 nacimientos. La mayoría de los bebés con CHI están presentes durante los primeros días posnatales, con otros durante el primer año. En raras ocasiones, los niños mayores presentan de novo síntomas de hipoglucemia. Sin embargo, la hipoglucemia hiperinsulinémica posprandial después de la cirugía bariátrica (hipoglucemia de derivación posgástrica) se ha descrito como una nueva entidad que se caracteriza por síntomas neuroglicopénicos severos tal como coma y convulsiones que pueden ser incapacitantes para el paciente (J Clin Endocrinol Metab 2007;92:4678-4685)

El tratamiento oportuno de la hipoglucemia debido al hiperinsulinismo (HI) es esencial para prevenir el daño cerebral. A diferencia de otras condiciones que provocan hipoglucemia en las que los combustibles alternativos, tal como cetonas o lactato, pueden estar disponibles para el cerebro durante los períodos de hipoglucemia, HI previene la producción de estos combustibles y deja al cerebro sin una fuente de energía. La hipoglucemia se puede tratar al administrar una bebida que contiene carbohidratos de acción rápida por vía oral o, si es severa, al administrar glucosa a través de la vena o al inyectar glucagón. A un niño con una sonda de alimentación se le puede administrar glucosa a través de la sonda. El objetivo del tratamiento es prevenir la hipoglucemia en tanto que el niño tiene un patrón de alimentación normal para la edad con un poco de seguridad adicional incorporada, por ejemplo, un niño de un año que normalmente no comería durante la noche durante 10-12 horas debería ser capaz de ayunar durante al menos 14 -15 horas en un régimen médico exitoso.

El tratamiento farmacológico de la CHI es de elección limitada y frecuentemente se

complica por ineficacia y eventos adversos. Los medicamentos actuales en uso no están autorizados en niños con CHI. Las pautas para terapia médica varían entre los centros con la mayoría de las decisiones de tratamiento que se basan principalmente en la opinión de expertos. El tratamiento farmacológico de primera línea recomendado consiste en diazóxido en combinación con el diurético clorotiazida. El diazóxido actúa sobre el canal de K⁺ sensible a ATP (K-ATP) para reducir la despolarización celular, reduciendo de este modo la secreción de insulina. Sin embargo, no todos los pacientes responden a este tratamiento, particularmente aquellos con mutaciones en los genes de canal K-ATP (ABCC8, KCNJ11). La terapia con diazóxido frecuentemente se complica por efectos secundarios, tal como retención de líquidos, trombocitopenia, hipertriosis y dismotilidad gastrointestinal, que puede conducir a la interrupción del tratamiento. La nifedipina, un antagonista de calcio, se ha prescrito en el pasado como tratamiento de segunda línea si los niños no responden al diazóxido. Sin embargo, la nifedipina rara vez se usa en la práctica clínica, ya que la respuesta clínica a este fármaco es en general insatisfactoria. El glucagón subcutáneo continuo es otra opción de terapia y se ha usado no solo en la terapia inicial de hipoglucemia sino también en el tratamiento a largo plazo de CHI. Sin embargo, la preparación comercialmente disponible de glucagón precipita en soluciones de movimiento lento dentro de los catéteres permanentes que provocan obstrucción y administración de fármacos poco confiable. Por lo tanto, actualmente no se prevé glucagón continuo para el tratamiento a largo plazo de CHI.

La somatostatina es una hormona que conserva la estabilidad eléctrica de la membrana de células β pancreáticas y por lo tanto, inhibe la liberación de insulina. La octreotida, un análogo de somatostatina de acción corta, se usa comúnmente como tratamiento de segunda línea de CHI, con preferencia sobre nifedipina o glucagón continuo. La semivida de octreotida es relativamente corta en alrededor de 100 min; por lo tanto, la octreotida se tiene que administrar por infusión intravenosa continua, inyecciones subcutáneas frecuentes o por terapia de bomba subcutánea continua. El tratamiento con octreotida subcutánea a largo plazo es exigente para el paciente y la familia; no siempre son factibles múltiples inyecciones diarias de administración domiciliaria o terapia con bomba. Los efectos secundarios del tratamiento con octreotida incluyen dismotilidad gastrointestinal y taquifilaxis, que requieren una dosis de fármaco creciente para mantener la eficacia.

Hay ensayos clínicos aleatorizados limitados de terapias novedosas en CHI, que se pueden deber a varios factores, incluido el número limitado de pacientes en todo el mundo

y la complejidad de la organización de ensayos multicéntricos. Un primer ensayo de fase 3 con un glucagón administrado de manera subcutánea de acción prolongada no cumplió con su criterio de valoración principal. En un estudio clínico de fase 1, una infusión individual de anticuerpo XOMA 358 (también conocido como RZ358) dio por resultado una reducción dependiente de dosis en la sensibilidad a la insulina en adultos sanos. (MAbs. 2018 Jul;10(5):796-802.), y los resultados presentados el 1 de mayo de 2022, en la reunión anual de 2022 de la sociedad de endocrinos pediátricos mostraron una reducción de la hipoglucemia en bebés >2 años de edad. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales se administran de manera intravenosa (inyectados en una vena). Los anticuerpos en sí mismos son proteínas, por lo que su administración algunas veces puede provocar una reacción alérgica o inmunológica. Los posibles efectos adversos pueden incluir reacciones de hipersensibilidad, reacciones de infusión e inmunogenicidad duradera y estos efectos se pueden agravar en bebés. Además de la medicación de CHI que intenta incrementar los niveles de glucosa en plasma (dextrosa, glucagón y análogos) o que intenta reducir la secreción o liberación de insulina de las betacélulas (diazóxido, análogos de receptores de somatostatina, nifedipina), actualmente no existen lugares terapéuticos aprobados adicionales excepto la remoción parcial o total del páncreas.

El hiperinsulinismo congénito (CHI) es la causa más frecuente de hipoglucemia severa y persistente (bajo nivel de glucosa, azúcar, en sangre) en recién nacidos y niños. La enfermedad se caracteriza por un alto nivel de insulina en sangre, que conduce a una disminución en la glucosa (azúcar). La hipoglucemia recurrente y severa puede afectar negativamente la función cerebral. A pesar de las terapias actualmente disponibles, CHI puede dar por resultado complicaciones neurológicas y de desarrollo graves, incluidas convulsiones recurrentes, discapacidades de aprendizaje y lesiones cerebrales focales. La condición se gestiona actualmente al alimentar a los pacientes con comidas regulares altas en carbohidratos y tratándolos con medicinas para reducir la secreción de insulina, tal como diazóxido, clorotiazida, nifedipina, glucagón y octreotida. El tratamiento puede incluir cirugía del páncreas (pancreatectomía). Sin embargo, estos tratamientos son difíciles debido a que estos pacientes requieren monitoreo constante y los fármacos tienen efectos adversos indeseables. Además, aunque es un trastorno raro, se ha encontrado que CHI es una carga económica sustancial en el NHS.

Para resumir, existe una importante necesidad médica insatisfecha de desarrollar una terapia, preferentemente oral, dirigida a prevenir la hipoglucemia en HI, en particular en la causa más común de hipoglucemia persistente en niños. En palabras de Congenital

Hyperinsulinism International (congenitalhi.org), se necesita comprender mejor el hiperinsulinismo congénito, identificar nuevas formas de mejorar las vidas de quienes viven con HI, reducir la incidencia de daño cerebral irreversible, detectar las causas genéticas de los tipos de HI que se desconocen actualmente; y encontrar curas para todos y cada uno de los tipos de HI. Se prefiere una terapia que anule las muchas y diversas causas genéticas de HI y apunte directamente a aliviar la hipoglucemia impulsada por hiperinsulinemia (también conocida como hipoglucemia hiperinsulinémica, HH, J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2017 Dec 30;9(Suppl 2):69-87.).

La invención

La invención describe hallazgos novedosos relacionados con la regulación de la glucosa en sangre mediante parásitos de malaria (*Plasmodium spp*) durante la etapa sanguínea del ciclo de infección por malaria. En esencia, (Binh et al., Glucose metabolism in severe malaria: minimal model analysis of the intravenous glucose tolerance test incorporating a stable glucose label. Metabolism. 1997 Dec;46(12):1435-40.), la glucosa en plasma basal usualmente se incrementa en la malaria no complicada, lo que implica resistencia a la insulina. Si la infección progresa, el riesgo de hipoglucemia incrementará conforme la producción de glucosa del hospedador se vuelva insuficiente para la demanda del hospedador/parásito. Estos datos de malaria demuestran que la utilización de glucosa en plasma basal se incrementa aproximadamente 50 % en malaria severa. La prevención y tratamiento de la hipoglucemia temprana se deben basar en un reemplazo adecuado de glucosa. Las estrategias que reducen la secreción o efectos de insulina parecen ser de menor importancia en la malaria. White et al (Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria. N Engl J Med. 1983 Jul 14;309(2):61-6) observan que en la malaria por falciparum la secreción de insulina inducida por quinina precipita la hipoglucemia, pero también contribuyen otros factores, incluidos los grandes requerimientos de glucosa de los parásitos de la malaria. Descubrimientos recientes (Kumar et al., Mol Microbiol. 2021 May;115(5):891-900) vinculan la detección de nutrientes y expresión génica en parásitos en etapa sanguínea de *Plasmodium falciparum*, específicamente de los merozoitos que pueblan los glóbulos rojos del hospedador infectado durante el ciclo de desarrollo intraeritocítico (IDC) del parásito. Habitualmente, el merozoito expresa la proteína de membrana de eritrocitos 1 (PfEMP1) en la superficie de eritrocitos infectados, acompañado con la producción incrementada de un conjunto de proteínas que pertenecen a la familia de antígenos ricos en serina (SERA), tal como SERA 5. Durante el IDC y para alojar el rápido crecimiento de parásito, los requisitos de glucosa de parásito son altos, lo que requiere la

manipulación de los niveles de glucosa en sangre del hospedador por el parásito.

Un análisis detallado de proteínas plasmodiales en etapa sanguínea (EMP1 y Sera 5; ver ejemplo 1 en la presente) mostró que estas proteínas imitan ampliamente repeticiones en tándem largas de péptidos que portan un motivo de unión XGXXPG de complejo de receptor de elastina (ERC) específico en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido. Muy específicamente, se encontró que *Plasmodia* que infecta a primates expresa específicamente largos tramos de repeticiones del dominio quimiotáctico VGVAPG, en tanto que se encontró que *Plasmodia* que infecta a roedores expresa específicamente largos tramos de repeticiones del dominio quimiotáctico PGAVPG. Cada uno de estos dominios, como muchos de los péptidos que portan el motivo XGXXPG (ver por ejemplo tabla 2 en Heinz et al, Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2020 Jun;55(3):252-273,) es capaz de activar el ERC y se cree que la repetición del motivo conduce a la formación de estructuras adicionales muy cercanas a un giro de tipo VIIIb que facilita las interacciones péptido-célula con el ERC si se presenta en la secuencia varias veces.

Con ello, la invención divulga un modulador peptídico de la señalización del receptor de insulina-insulina afectado por el ERC (para una descripción gráfica ver, por ejemplo, figura 1 en Haxho F, Alghamdi F, Neufeld RJ, Szewczuk MR (2014) Novel Insulin Receptor-Signaling Platform. Int J Diabetes Clin Res 1:005) con señalización de receptor de insulina reducida que permite la promoción de la resistencia a la insulina a través de la modulación del receptor de insulina (IR) para uso en el tratamiento de un mamífero, preferentemente un primate, más preferentemente humano, o de manera alternativa un sujeto roedor que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia. El mecanismo de acción de este péptido es crear resistencia a la insulina en pacientes hiperinsulinémicos, preferentemente en pacientes con HH, y con ello reducir la captación de glucosa (mediada por GLUT4) y promover niveles de glucosa en sangre incrementados. Blaise et al. han reportado que la administración crónica de péptidos derivados de elastina (EDP) en ratones promueve la resistencia a la insulina a través de la modulación del receptor de insulina (IR) por el complejo de receptor de elastina (ERC, Diabetes (2013) 62: 3807-16.). En ratones macho C57Bl/6J alimentados con pienso, las inyecciones intravenosas agudas o crónicas de EDP indujeron efectos hiperglucémicos asociados con la reducción de captación de glucosa y la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. Con base en enfoques *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, Blaise et al

proponen que esta resistencia a la insulina se debe a la interacción entre el receptor de insulina (IR) y la subunidad de neuraminidasa-1 del complejo de receptor de elastina desencadenada por péptidos derivados de elastina (EDP) tal como VGVAPG y K-elastina (kE o kappa-elastina). Esta interacción se correlacionó con los niveles disminuidos de ácido siálico en la cadena β del IR y la reducción de la señalización de IR. Este es el primer estudio que demuestra que los EDP, que se acumulan principalmente con el envejecimiento, se implican en el desarrollo insidioso de resistencia a la insulina que conduce a la diabetes tipo 2. Blaise et al., sin embargo, no se refiere al tratamiento de la hipoglucemia ni al tratamiento del hiperinsulinismo, y mucho menos se refiere al tratamiento de la hipoglucemia hiperinsulinémica que es el tema de la presente solicitud.

En una realización preferida, la invención divulga el modulador que tiene o se proporciona con una estructura de dominio quimiotáctico del complejo de receptor de elastina para usarse en el tratamiento de un sujeto primate, preferentemente humano, que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia, tal como se observa con hiperinsulinemia congénita (CHI) e hipoglucemia de derivación posgástrica, más preferentemente en bebés que demuestran síntomas de CHI, más preferentemente en bebés que tienen o que demuestran repetidamente síntomas de CHI o en adultos con hipoglucemia de derivación posgástrica y que presentan eventos de nivel de glucosa en plasma, de <4 mmol/L (< 72 mg/dL), más preferentemente $< 3,5$ mmol/L (< 63 mg/dL), más preferentemente <3 mmol/L (< 54 mg/dL), más preferentemente $<2,5$ mmol/L (< 45 mg/dL), más preferentemente < 2 mmol/L (< 36 mg/dL). La invención divulga un modulador de la señalización de receptor de insulina-insulina con señalización del receptor de insulina reducida que permite la promoción de la resistencia a la insulina y con ello capaz de reducir la captación de glucosa en sangre mediada por insulina por una célula de grasa o músculo del sujeto, dando por resultado niveles plasmáticos de glucosa más altos beneficiosos, con lo que se evita la patología neurológica temida y otras consecuencias negativas de CHI. Se prefiere que este modulador sea capaz de reducir la translocación inducida por insulina del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana plasmática de una célula de grasa o muscular de este sujeto, más preferentemente es capaz de inducir resistencia a la insulina de cuerpo entero (sistémica). En una realización preferida, la invención divulga un modulador de acuerdo con la invención que permite la promoción de la resistencia a la insulina, en donde el modulador se proporciona con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina (el motivo en la presente también se identifica como dominio quimiotáctico de elastina). Se prefiere que el modulador se proporcione con o tenga una

molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un péptido con motivo XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido. En una realización preferida, el modulador comprende un péptido o molécula peptidomimética que porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un péptido con motivo XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido. Se prefiere que este motivo se derive del grupo de primate, preferentemente humano, péptidos derivados de elastina, primate, preferentemente humano, péptido C, o primate, preferentemente humano, Galectina-3. En una realización preferida, el inventor divulga un modulador de péptidos de acuerdo con la invención que tiene un péptido de dominio PG retroinverso (todo D-aminoácido), tal como gagpggggl, gagpggal, agpggl, gpgggpa, gpggal, gpggg, gpgag, gpvagg, gpavgv, que se encontraron aptos en el modelo de EBP diseñado para acoplar el dominio quimiotáctico VGVAPG también.

Se señala que, a excepción de la glicina, todos los α -aminoácidos estándar pueden existir en cualquiera de los dos isómeros ópticos, que son la imagen especular entre sí; estos se llaman L- y D-aminoácidos. Como se usa en la presente, cuando se hace referencia a una secuencia de aminoácidos de un péptido en el código de una letra, las letras minúsculas indican D-aminoácidos, en tanto que las letras mayúsculas indican L-aminoácidos, con la notable excepción de glicina, en donde tanto g como G indican el aminoácido glicina del cual no existen isómeros ópticos y, por lo tanto, no existe diferencia entre las formas D o L. En general, todos los péptidos que contienen L-aminoácidos son funcionalmente equivalentes a sus contrapartes D, con la notable excepción de que todos los péptidos de aminoácidos D son en general más resistentes a la degradación proteolítica común tal como se encuentra en el sistema intestinal. Como se usa en la presente, las letras minúsculas indican D-aminoácidos, en tanto que las letras mayúsculas indican L-aminoácidos, con la notable excepción de glicina, en donde tanto g como G indican el aminoácido glicina del cual no existen isómeros ópticos y por lo tanto, no existe diferencia entre las formas D o L.

También, los péptidos de L-aminoácidos GGGPG y GAGPG también se ajustan al modelo. Se considera que la bioactividad asociada a EBP depende de si un péptido de dominio PG (que tiene un motivo GXXP o pxxg) puede adaptarse a una confirmación de giro beta tipo VIII en la prolina (P/p). En una realización, se prefiere que el péptido con el motivo sea al menos funcionalmente equivalente a un péptido VGVAPGVGVAPGVGVAPG, QVGQVELGGGPGAGSLQP o GAYPGAPGAYPGAPAPGV. También se prefiere que este

péptido con este motivo se derive del grupo de, preferentemente primate, preferentemente humano, péptidos derivados de elastina, tal como un péptido derivado de kappa-elastina que porta un motivo XGXXPG. En una realización preferida y con base en el modulador que imita el mimetismo de malaria del ejemplo 1, el péptido con el motivo es al menos funcionalmente equivalente a un péptido VGVAPGVGVAPGVGVAPG o AVPGAVPGAVPG. Habitualmente, se divulga el uso del modulador basado en VGVAPG en un sujeto primate, y el modulador basado en PGAVPG en un sujeto roedor, respectivamente, sin embargo, para propósitos comparativos también se proporciona lo contrario. En una realización adicional, el modulador comprende un péptido VGVAPG(n) o AVPG(n), en donde n indica la cantidad de apariciones repetidas del motivo y se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, preferentemente n se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, más preferentemente n se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4. En otra realización, este modulador comprende un péptido con motivo gpva (n) o gpavgv (n) en donde n indica la cantidad de apariciones (repetidas) de este motivo y se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, más preferentemente de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, preferentemente n se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, más preferentemente de 2, 3, 4, 5, 6, más preferentemente n se selecciona del grupo de 1, 2, 3, 4, más preferentemente de 2, 3, 4. Preferentemente, estas repeticiones comprenden al menos una repetición en tándem. La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el modulador de acuerdo con la invención. En una realización, la composición farmacéutica se proporciona para aplicación parenteral. En particular, la degradación rápida de todos los péptidos de L-aminoácidos tal como VGVAPGVGVAPGVGVAPG, AVPGAVPGAVPG, QVGQVELGGGPGAGSLQP o GAYPGAPGAYPGAPAPGV y AQGVAPG (n = 1 a 8), LQGVAPG (n = 1 a 8), VGVAPG (n = 1 a 8) o AVPG (n = 1 a 8) son los más adecuados para la aplicación parenteral, en donde n indica la cantidad de apariciones del motivo. En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica de este tipo para aplicación oral. Los requerimientos de dosificación preferidos para la aplicación parenteral (preferentemente aplicación intravenosa o intraperitoneal) de este modulador varían de 1 a 1000 mg/kg, preferentemente de 5 a 500 mg/kg, más preferentemente de 10 a 100 mg/kg. En particular, todos los péptidos de D-aminoácidos (retroinversos) en espejo estables tal como gpavgvgpavgvgpavgv, gpvagpvagpva, pqlsgagpggglevqgvq or vgpapagpyagpagpgpyag y gpavgqa (n=1-8), gpavgql (n=1-8), gpva (n=1-8) o gpavgv (n=1-8) son los más adecuados para la aplicación oral. Los requerimientos de dosificación preferidos para aplicación oral del modulador varían de 1 a 10000 mg/kg, preferentemente de 5 a 5000 mg/kg, más preferentemente de 10 a 1000 mg/kg. Los requerimientos de dosificación se pueden ajustar

con base en los niveles de glucosa en sangre resultantes del sujeto tratado. La invención también divulga un método para el tratamiento de un sujeto primate, preferentemente humano, que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia que comprende tratar al sujeto con el modulador o composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

La divulgación se refiere al, preferentemente, péptido, modulador y / o antagonista de complejos de señalización de receptor de insulina-insulina y métodos para seleccionar este modulador y / o antagonista. Este modulador y / o antagonista se puede usar para tratar un sujeto mamífero que padece un estado y condición de enfermedad, o para prevenir el inicio de la enfermedad en un sujeto en riesgo como se describió anteriormente. Una familia de transportadores de glucosa facilitadores (GLUT) se implica en la regulación de la captación de glucosa específica de tejido y el metabolismo en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo para asegurar el control homeostático de los niveles de glucosa en sangre. La actividad de transporte de glucosa da por resultado el uso aberrante de sustratos de energía y se asocia con la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Está bien establecido que GLUT2, el principal regulador del flujo de hexosa hepática, y GLUT4, la guía maestra en la captación de glucosa estimulada por insulina y contracción en el músculo esquelético, son contribuyentes críticos en el control de la glucemia de todo el cuerpo, ingesta de carbohidratos conduce a un incremento inmediato en los niveles de glucosa en sangre circulante después de la absorción de la glucosa del intestino. Como respuesta directa, las células beta pancreáticas detectan las concentraciones elevadas de glucosa en sangre mediante un proceso dependiente de GLUT2 e incrementan la secreción de insulina. En consecuencia, la unión de insulina a sus receptores conduce a transporte mejorado de glucosa al músculo esquelético, tejido adiposo y al corazón, facilitado principalmente por una translocación aguda de las vesículas transportadoras de GLUT4 a la membrana plasmática y además, a una inhibición de la gluconeogénesis hepática. Ambas vías reguladoras en combinación dan por resultado la depuración de glucosa del torrente sanguíneo (GLUT4 exocytosis J Cell Sci. 2011 Dec 15;124(Pt 24):4147-59.). GLUT4 es un transportador de glucosa regulado por insulina que es responsable de la captación de glucosa regulada por insulina en células de grasa y músculo. En ausencia de insulina, GLUT4 se encuentra principalmente en vesículas intracelulares referidas como vesículas de almacenamiento de GLUT4 (GSV). En respuesta a la estimulación con insulina, las GSV se translocan y se fusionan con la membrana plasmática en un estallido rápido y en presencia continua de insulina, las moléculas de GLUT4 se internalizan y reciclan de nuevo

a la membrana plasmática en vesículas que son distintas de las GSV y probablemente de origen endosómico. Sin desear que se limite a la teoría, la insulina estimula el transporte de glucosa al músculo y al tejido adiposo de 10 a 30 veces con un medio tiempo de 2-5 minutos. El principal transportador de glucosa expresado en estos tejidos es GLUT4. En ausencia de insulina, la mayoría de GLUT4 se almacena en pequeñas vesículas intracelulares [referidas como vesículas de almacenamiento de GLUT4 (GSV) o vesículas sensibles a insulina (IRV)]. Después de una comida, la insulina se secreta por el páncreas y se acopla a su receptor en la superficie de miocitos y adipocitos, activando de este modo la vía canónica PI3K-AKT. La activación de esta vía es necesaria y suficiente para desencadenar la exocitosis de GSV a la membrana plasmática. El tráfico de GLUT4 reducido se considera uno de los factores más tempranos que contribuyen a la resistencia a la insulina en primates, preferentemente humanos, la interrupción de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en tejido muscular o adiposo induce resistencia a la insulina con captación de glucosa reducida por los miocitos o adipocitos, aquí en la invención proporcionada como tratamiento para el beneficio de sujetos que tienen episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia. En particular, la translocación reducida de GLUT4 en tejido adiposo contribuye al desarrollo de resistencia a insulina de cuerpo entero.

La resistencia a la insulina representa un estado de falta de respuesta relativa de los tejidos periféricos para reaccionar en consecuencia a cantidades crecientes de insulina en la circulación, dando por resultado niveles de glucosa en sangre crónicamente elevados. La invención proporciona el uso del fenómeno de translocación de GLUT4 reducida a la membrana plasmática en tejido muscular o adiposo con resistencia a la insulina resultante en un nuevo lugar para tratar la hipoglucemia impulsada por hiperinsulinemia.

La divulgación proporciona un modulador y / o antagonista novedoso de complejos de señalización de receptor de insulina-insulina, métodos para seleccionar estos moduladores y / o antagonistas, y estados de enfermedad y condiciones caracterizadas por producción y / o utilización anormalmente incrementada de insulina. También se proporciona el uso del modulador y / o antagonista para el tratamiento o prevención de condiciones de hiperinsulinismo endógeno (HI), preferentemente hiperinsulinismo congénito (CHI).

Se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que tiene, se considera que tiene o se sospecha que tiene una condición con episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia (HI) que comprende tratar a este sujeto con un modulador o

composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina al menos funcionalmente equivalente a un péptido con motivo XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido. Este péptido como se proporciona en la presente preferentemente porta un motivo XGXXPG o gpXXgx canónico, que permite la formación de un giro P de tipo VIII requerido para unirse a su receptor cognado, el complejo de receptor de elastina (ERC; Blanchevoye et al., *J Biol Chem.* 2013 Jan 11; 288(2):1317-28). En la presente, una condición con episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia (en forma abreviada hipoglucemia hiperinsulinémica) describe la condición y los efectos de la glucosa baja en sangre provocados por el exceso de insulina. Esta condición se caracteriza bioquímicamente frecuentemente por la secreción no regulada de insulina de las células β pancreáticas en la presencia de niveles bajos de glucosa en sangre. Bajo condiciones fisiológicas normales, las células β sintetizan, almacenan y secretan insulina de una manera controlada con precisión para que el nivel de glucosa en sangre en ayunas en general se mantenga dentro de un intervalo estrecho de 3,5-5,5 mmol/L. Como los síntomas de hipoglucemia hiperinsulinémica habitualmente se desarrollan a una glucosa en plasma de 55 mg/dL (3,0 mmol/L) y menor en individuos por lo demás sanos. A niveles de glucosa de 55 mg/dL (3,0 mmol/L) e inferiores, la secreción de insulina normalmente se suprime casi por completo, la detección de insulina bajo aquellas circunstancias es altamente indicativa de hipoglucemia hiperinsulinémica.

En una realización preferida, se proporciona un método para el tratamiento de un mamífero, preferentemente un sujeto primate, más preferentemente humano, que tiene, se considera que tiene o se sospecha que tiene una condición con episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia (HI) y que tiene un nivel de glucosa en sangre 55 mg/dL (3,0 mmol/L), preferentemente por debajo de un nivel de 50 mg/dL (2,7 mmol/L), este sujeto preferentemente también tiene una relación de glucosa a insulina por debajo de 3, preferentemente por debajo de 2, que comprende tratar al sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina al menos funcionalmente equivalente a un péptido con motivo XGXXPG o gpXXgx en donde G/g representa el aminoácido glicina, P/p prolina y X/x cualquier L- o D-aminoácido, respectivamente.

En una realización preferida, se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto primate, preferentemente humano, que tiene, se considera que tiene o se sospecha que tiene una condición con episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia (HI)

y que tiene un nivel de glucosa en sangre de 55 mg/dL (3,0 mmol/L), preferentemente por debajo de un nivel de 50 mg/dL (2,7mmol/L), este sujeto preferentemente también tiene una relación de glucosa a insulina por debajo de 3, preferentemente por debajo de 2, que comprende tratar a este sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de una molécula peptídica es un péptido con motivo seleccionado del grupo al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de un péptido con motivo VGVAPG(n), vGVAPG(n), vGvAPG(n), vGVaPG(n), vGvaPG(n), gpavgv(n), PGAVPG(n), pGvAPG(n), pGVaPG(n), pGvaPG(n), gpavgp(n), LGGGPG(n), IGGGPG(n), gpgggI(n), PGAYPG(n), pGAYPG(n), pGaYPG(n), pGAyPG(n), pGayPG(n), pgyagp(n), AQGVAPG(n), gpavgqa(n), LQGVAPG(n) o gpavgql(n), en donde n indica el número de apariciones del motivo, en donde n varía de 1 a 8, preferentemente de 1 a 6, más preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 2 a 4, lo que permite dirigir el modulador al receptor de elastina en la superficie de las células.

En otra realización, el péptido se selecciona del grupo de VGVAPG(n), gpavgv(n), PGAVPG(n), gpvagp(n), LGGGPG(n), gpgggI(n), AQGVAPG(n), gpavgqa(n), LQGVAPG(n), gpavgql(n), PGAYPG(n) y gpyagp(n) y en donde n varía de 1 a 8, preferentemente de 1 a 6, más preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 2 a 4, lo que permite dirigir el modulador al receptor de elastina en la superficie de las células.

En otra realización, el péptido se selecciona del grupo de VGVAPG(n), gpavgv(n), PGAVPG(n), gpvagp(n), PGAYPG(n) y gpyagp(n) y en donde n varía de 1 a 8, preferentemente de 1 a 6, más preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 2 a 4, lo que permite dirigir el modulador al receptor de elastina en la superficie de las células.

En otra realización, el péptido se selecciona del grupo de VGVAPG(n), gpavgv(n), PGAVPG(n), gpvagp(n) y en donde n varía de 1 a 8, preferentemente de 1 a 6, más preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 2 a 4, lo que permite dirigir el modulador al receptor de elastina en la superficie de las células.

En otra realización, el péptido se selecciona del grupo de VGVAPG(n), gpavgv(n), PGAVPG(n) y gpvagp(n), AQGVAPG(n), gpavgqa(n), LQGVAPG(n) y gpavgql(n), y en donde n varía de 1 a 8, preferentemente de 1 a 6, más preferentemente de 1 a 4, más preferentemente de 2 a 4, lo que permite dirigir el modulador al receptor de elastina en la superficie de las células.

Las proteínas y la mayoría de los péptidos que se presentan de manera natural en general se componen de aminoácidos en la configuración L. Sin embargo, se han detectado D-aminoácidos en una variedad de péptidos sintetizados en células animales. Los ejemplos incluyen péptidos opiáceos y antimicrobianos de piel de rana, neuropéptidos de caracoles, hormonas de crustáceos y veneno de arañas. Estos D-aminoácidos se forman cuando los L-aminoácidos experimentan alteraciones post-traduccionales. Muchas proteínas o péptidos compuestos de aminoácidos en la configuración L se degradan o etiquetan fácilmente para destrucción selectiva en células o tracto intestinal. Los péptidos que están al menos parcialmente elaborados de D-aminoácidos han mostrado una fuerte resistencia a la degradación proteolítica y han mejorado la captación intestinal, lo que hace que los péptidos sean adecuados para administración oral.

En otra realización preferida, se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto primate, preferentemente humano, que tiene, se considera que tiene o se sospecha que tiene una condición con episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia (HI) y que tiene un nivel de glucosa en sangre de 55 mg/dL (3,0 mmol/L), preferentemente por debajo de un nivel de 50 mg/dL (2,7 mmol/L), este sujeto preferentemente también tiene una relación de glucosa a insulina por debajo de 3, preferentemente por debajo de 2, que comprende tratar al sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de una molécula de péptido es un péptido con motivo seleccionado del grupo al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de un péptido con motivo gpavgv, gpavgV, gpaVgV, gpAvgV, gpAVgV, gpvggl, gpvggL, gpyagp, gpaygP, gpaYgP, gpAygP o gpAYgP. Ser equivalente funcional en la presente preferentemente es tener reactividad o bioactividad de ERC equivalente funcional.

Los niveles más bajos de glucosa en plasma se presentan en individuos sanos sin síntomas o signos durante el ayuno prolongado cuando hay uso de combustibles alternativos tal como cetonas. Debido a esta variabilidad, no hay una sola concentración de glucosa en plasma que defina la hipoglucemia. La hipoglucemia recurrente en recién nacidos, bebés y niños no es normal. Los recién nacidos sanos que experimentan una caída de nivel de azúcar en la sangre habitualmente no caen por debajo de un nivel de 50 mg/dL (2,7 mmol/L). Los recién nacidos y bebés con niveles de azúcar en sangre inferiores a 50 (2,7 mmol/L) o aquellos cuyos niveles de azúcar en sangre caen más allá del nadir neonatal de transición habitual se deben evaluar y manejarse de acuerdo con las pautas de hipoglucemia. Una relación de glucosa a insulina por debajo de 3, preferentemente por

debajo de 2 y bajas concentraciones de ácidos grasos libres y cetonas durante la hipoglucemia son altamente sugerentes de hipoglucemia hiperinsulinémica.

La hipoglucemia debido al exceso de insulina es el tipo más común de hipoglucemia grave. Se puede deber a insulina endógena o inyectada. Las manifestaciones de hipoglucemia hiperinsulinémica varían según la edad y severidad de la hipoglucemia. En general, la mayoría de los signos y síntomas se pueden atribuir a (1) los efectos en el cerebro de la glucosa insuficiente (neuroglucopenia) o (2) a la respuesta adrenérgica del sistema nervioso autónomo a la hipoglucemia. Algunos síntomas diversos son más difíciles de atribuir a cualquiera de estas causas. En la mayoría de los casos, todos los efectos se revierten cuando se restauran los niveles normales de glucosa.

Existen casos poco comunes de daño más persistente, y rara vez incluso la muerte debido a hipoglucemia severa de este tipo. Una razón por la que la hipoglucemia debido a insulina excesiva (exógena) puede ser más peligrosa es que la insulina reduce las cantidades disponibles de la mayoría de los combustibles cerebrales alternativos, tal como cetonas. Puede presentarse daño cerebral de diferentes tipos que varían desde efectos focales tipo accidente cerebrovascular hasta deterioro de la memoria y pensamiento. Los niños que tienen hipoglucemia hiperinsulinémica prolongada o recurrente en la infancia pueden sufrir daños en el cerebro y pueden tener un retraso en el desarrollo. La hipoglucemia debido a insulina endógena puede ser congénita o adquirida, aparente en el período de recién nacido, o muchos años después. La hipoglucemia puede ser severa y potencialmente mortal o una molestia menor y ocasional. Con mucho, el tipo más común de hipoglucemia hiperinsulinémica severa pero transitoria se presenta accidentalmente en personas con diabetes tipo 1 que toman (demasiada) insulina, una condición que también puede ocurrir cuando las personas con diabetes tipo 2 ejecen la dosis de insulina. Las personas que tienen hipoglucemia hiperinsulinémica por insulina excesiva o sobredosis, o sobredosis de fármacos que provocan hiperinsulinismo fármacos pueden responder bien a la glucosa oral.

Existen muchos casos de hipoglucemia debido a la insulina endógena. En primer lugar, el hiperinsulinismo congénito puede ser hiperinsulinismo neonatal transitorio (mecanismo desconocido). También puede ser hiperinsulinismo focal (debido a trastornos de canal KATP), tal como mutación SUR1 paterna con pérdida clonal de heterocigosidad de 11p15 o mutación Kir6.2 paterna con pérdida clonal de heterocigosidad de 11p15. También puede manifestarse como hiperinsulinismo difuso debido a trastornos de canal KATP,

mutaciones SUR1, mutaciones Kir6.2, mutaciones de ganancia de función de glucocinasa, hiperinsulinismo hiperamonémico (mutaciones de ganancia de función de glutamato deshidrogenasa), deficiencia de acil coenzima A deshidrogenasa de cadena corta, síndrome de glucoproteína deficiente en carbohidratos (enfermedad de Jaeken) y síndrome de Beckwith-Wiedemann (se sospecha debido al hiperinsulinismo pero la fisiopatología es incierta: mutación 11p15 o exceso de IGF2).

En una realización preferida, se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto primate, preferentemente humano, que tiene, se considera que tiene o se sospecha que tiene un HI congénita, un trastorno endocrino genético ultra raro que aparece en 1 en 2500 a 1 en 50000 nacidos vivos en diferentes poblaciones. HI congénita (CHI) se caracteriza por un exceso de secreción de insulina, que provoca episodios repetidos de bajo nivel de azúcar en sangre o hipoglucemia. La condición frecuentemente pasa desapercibida en bebés, poniéndolos en riesgo de complicaciones de eventos hipoglucémicos recurrentes, incluidos retrasos en el desarrollo, convulsiones, coma y muerte.

La resistencia a la insulina se refiere a una condición donde una cantidad fisiológica de insulina es insuficiente para obtener una respuesta normal a la insulina de las células o tejidos. La resistencia a insulina extrema se asocia con diabetes tipo 2, en tanto que la resistencia a insulina más leve también se asocia con muchos estados de enfermedad (tal como inflamación aguda o aterosclerosis) y condiciones fisiológicas (tal como embarazo o pubertad) que están presentes en muchos individuos diabéticos no tipo 2 (Woods, et al., End, Metab & Immuno Disorders-Drug Targets 9: 187-198, 2009).

Leyendas de las figuras

Figura 1a y 1b

Se detectaron preferencias de motivo xGxxPG en proteínas plasmodiales relacionadas con proteínas de etapa sanguínea de merozoíto asociadas con la aparición de resistencia a insulina en etapa sanguínea. Resultados iniciales después de agrupar las apariciones internas de dipéptido-preferencia en la posición X₁X₂ en Gx₁X₂P motivo de complejo de receptor de elastina (ERC) en proteínas de superficie de merozoito Plasmodial y/o proteínas SERA5 detectadas en

A) Proteínas plasmodiales derivadas de plasmodios infectantes de PRIMATE *P. vivax* (n=13) o *P. falciparum* (n=11) como están presentes en la base de datos Uniprot revisada

en octubre de 2022.

B) Proteínas plasmodiales derivadas de plasmodios infectantes de ROEDOR *P. yoelii* ($n=4$) o *P. berghei* ($n=3$) como presentes en la base de datos Uniprot revisada en octubre de 2022.

De las 400 secuencias de dipéptidos analizadas, la agrupación muestra una preferencia por el dipéptido VA en el motivo GVAP en las proteínas plasmodiales infectantes de PRIMATE analizadas (1A) y una preferencia por el dipéptido AV en el motivo GAVP en las proteínas plasmodiales infectantes de ROEDOR analizadas (1B).

Las entradas de proteína plasmodial de roedor y primate en Uniprot se sondaron entonces por búsqueda de péptidos con diferentes motivos peptídicos que portaban los motivos GVAP y GAVP encontrados. En particular, se encontró GVAP en el motivo VGVAPG que se encontró repetidamente presente en proteínas plasmodiales derivadas de plasmodios infectantes de PRIMATE, y también se encontró repetidamente en elastinas de primates (ver también las tablas 1 a 4).

Figura 2

Tomada de Blaise et al (Diabetes. 2013 Nov; 62(11): 3807-3816. Notablemente: Blaise et al. no se refieren al tratamiento de la hipoglucemia ni al tratamiento del hiperinsulinismo, y mucho menos se refiere al tratamiento de la hipoglucemia hiperinsulinémica que es el tema de la presente solicitud). A: Glucemia en sangre 30 min después de una inyección individual intravenosa de diferentes dosis de kE (una recolección de péptidos derivados de elastina y que tienen un motivo XGXXPG de unión a ERC, tal como péptidos con los motivos bioactivos PGAIPG, GAVPG, GVLPG, GGVPg y GVVPg, VGVAPG o VVGPGA ($n = 7$). B: Captación de glucosa medida en músculos sóleos aislados incubados con kE con (barras grises oscuras) o sin insulina (barras negras). Las barras blancas y grises claras corresponden a condiciones sin insulina kE en las concentraciones indicadas ($n = 5$ por grupo). C: Estudio de curso de tiempo de glucosa en sangre después de la inyección intravenosa de kE una vez a la semana en comparación con los ratones alimentados inyectados con PBS ($n = 10$ por grupo). D: Ingesta de alimentos obtenida a 1, 8 y 11 semanas ($n = 5$ por grupo). E: Estudio de curso de tiempo de glucosa en sangre después de la inyección intravenosa de kE una vez a la semana ($n = 5$ por grupo). F: Nivel de glucosa en sangre en ratones en ayunas 6 h y tratados durante 7 semanas con kE o PBS ($n = 9$ por grupo). G: Resultados de la prueba de tolerancia a glucosa (GTT) en la

séptima semana de inyecciones en ratones después de 6 h de ayuno (n = 10 por grupo). H: La gráfica de barras representa el área promedio bajo la curva (AUC) de los resultados de GTT. I: Cuantificación de glucógeno en ratones en ayunas 6 h y tratados durante 7 semanas con kE o PBS (n = 5 por grupo). J: Expresiones de glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa) y fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK) por PCR cuantitativa en tiempo real, en hígado de ratones en ayunas tratados o no con kE durante 7 semanas. Los niveles de ARNm objetivo se normalizaron a los niveles de ARNm de 36B4 (n = 6-9). Los resultados son la media $\pm$ SEM. Diferencias estadísticamente significativas (*P < 0,05, Mann-Whitney). Conversión de glucosa en sangre: mg/dL en mmol/L factor de conversión: 1 mg/dL = 0,0555 mmol/L

Figura 3

Tomada de WO2018/141969 y WO2018/141970. En particular: ni WO2018/141969 ni WO2018/141970 se refieren al tratamiento de la hipoglucemia ni al tratamiento del hiperinsulinismo, ni se refieren al tratamiento de la hipoglucemia hiperinsulinémica que es el tema de esta solicitud). Se acoplaron diferentes hexapéptidos GxxP en el sitio de unión a péptido de la proteína de unión a elastina (EBP) usando Vina/Autodock y PyMOL (1, 2, 3). La conformación de unión de cada péptido se eligió de las 20 mejores posturas de puntuación. Se usó un modelo de homología de EBP (4) como receptor en el procedimiento de acoplamiento. Los péptidos probados fueron:

VGVPAG (dominio PG de prototipo, ligando peptídico GXXP de EBP (4))

LGGPG (seleccionado de péptido C (5))

QGQLPG (péptido inmunomodulador proporcionado en la presente)

PGAYPG (seleccionado de galectina-3 (6))

QGVLP (seleccionado del bucle 2 de beta-hCG (7))

De manera similar, el péptido de dominio PG retroinverso (todo D-aminoácido) gagpggg, gagpggal, agpggl, gpgggpa, gpggal, gpggg, gpgag, gpvagp, gpavgv, se ajustan en el modelo de EBP diseñado para acoplar VGVPAG también. Además, los péptidos de L-aminoácidos GGGPG y GAGPG también se ajustan al modelo. Se considera que la bioactividad asociada a EBP y por lo tanto, la equivalencia funcional dependen de si el péptido con un dominio PG (que tiene un motivo GXXP o pxxg) puede adaptarse a una confirmación de giro beta tipo VIII en la prolina (P/p)(4).

Referencias a figura 3:

1 Trott, O & Olson, AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, J Comp Chem 31: 455-461.

2 Seeliger, D & de Groot, BL (2010) Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. J Comput-Aided Mol Des 24 :417-422.

3 www.pymol.org

4 Blanchevove, C et al. (2013) Interaction between the elastin peptide VGVAPG and human elastin binding protein, J Biol Chem 288:1317-28.

5 Ido, Y et al. (1997) Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide Science 277:563-6.

6 De Boer, R et al. (2011) Plasma Galectin-3 Is Associated with Near-Term Rehospitalization in Heart Failure: A Meta-Analysis Journal of Cardiac Failure Vol 17, Issue 8, S93.

7 Khan, NA et al. (2010) Mitigation of septic shock in mice and rhesus monkeys by human chorionic gonadotrophin-related oligopeptides, Clin Exp Immunol 160:466-478.

Figuras 4a - 4c

Figure 4a ERC es un complejo de receptor heterotrimérico de la proteína de unión a elastina humana (EBP), neuraminidasa-1 (Neu-1) y proteína protectora catépsina A (PPCA). EBP consiste en una variante de empalme alternativa de beta-galactosidasa. Se une a un motivo hexapéptido X-Gly-X-X-Pro-Gly (XGXXPG) en (fragmentos proteolíticos de) proteínas de matriz extracelular tal como elastina y fibrilina-1. El representante más conocido del motivo es el hexapéptido VGVAPG que se encuentra en (tropo)elastina, pero muchos otros péptidos biológicamente activos que se ajustan a la secuencia de signatura xGxxPG, en general llamados péptidos de elastina, se han reportado como agonistas. Una secuencia mínimamente esencial para la actividad biológica es GxxP, con el péptido en P que adopta un giro beta tipo VIII.

El ERC se une específicamente a péptidos con motivo XGXXPG (en la presente también identificado como péptidos GXXP-, a través de su sitio de unión a receptor ubicado en EBP. La secuencia mínimamente esencial para la actividad biológica de un péptido que porta el motivo de unión es GXXP, con el péptido en P adoptando un giro beta tipo VIII, una condición considerada siempre cumplida cuando el aminoácido después de la prolina (en su lado N-terminal) es glicina. El péptido v14 VVGSPSAQDEASPL que corresponde al sitio de unión a péptido en la porción EPB del receptor, se usa para antagonizar la unión del

péptido de elastina. Diferentes galactósidos, tal como lactosa y sulfato de condroitina, pueden antagonizar la señalización mediada por ERC a través de la unión al lado de unión a betagalactósido o dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) en EBP. Cabe destacar que las galectinas también comparten un lado de unión a galactosa con afinidad similar por los galactosucres. Las galectinas se subdividen en galectinas *tipo proto*, que contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y pueden formar homodímeros; galectinas de *repetición en tándem* que contienen dos CRD distintas en tándem conectadas por un ligador de hasta 70 aminoácidos; y la galectina-3 *tipo quimera* única, que consiste en repeticiones en tándem inusuales de tramos cortos ricos en prolina y glicina fusionados en la CRD, por lo que las repeticiones en tándem se caracterizan por motivos GXXP repetidos que son ligandos del ERC.

Figura 4b Tomada de Hinek et al., (sialidasa lisosomal (neuraminidasa-1) se dirige a la superficie celular en un complejo multiproteico que facilita el ensamblaje de fibra elástica. J Biol Chem. 2006 Feb 10;281(6): 3698-710, incorporada en la presente por referencia. Para ser claros: Hinek et al. no se refieren al tratamiento de la hipoglucemia ni al tratamiento del hiperinsulinismo, y mucho menos se refiere al tratamiento de la hipoglucemia hiperinsulinémica que es el tema de la presente solicitud). Panel superior, micrografía representativa de ASMC cultivadas inmunoteñidas con anticuerpo anti-tropoelastina que ilustra tres etapas de elastogénesis: acumulación de tropoelastina en los endosomas y el aparato de Golgi (A), transporte en pequeñas vesículas secretoras (B) y el montaje inicial en un andamio microfibrilar que se presenta en las ranuras en la superficie celular (C). Panel inferior, el modelo propuesto de elastogénesis en el que las tres subunidades del complejo multiproteico dirigido a la superficie celular (S-gal/EBP, Neu1 y PPCA) actúan en concierto en el proceso de montaje extracelular de fibras elásticas. En la vía secretora inicial, el componente principal de este complejo multiproteico se une a motivos XGXXPG en tropoelastina en el retículo endoplásmico (ER), y entonces todo el complejo se transporta a los compartimentos de Golgi y a la superficie celular, donde las acciones de otros dos componentes de este complejo aseguran la liberación adecuada de tropoelastina de su chaperona. Durante el montaje de tropoelastina en el andamio microfibrilar, Neu1 (activado por PPCA) remueve los residuos de ácido siálico terminales de las cadenas de carbohidratos que sobresalen de las glucoproteínas microfibrilares. Esto provoca el desenmascaramiento de los penúltimos galactosucres, que a su vez interactúan con el sitio de galectina de S-gal/EBP e inducen la liberación de la molécula de tropoelastina transportada de su chaperona a la proximidad cercana de los sitios

aceptores en el andamio microfibrilar. Esto garantiza el montaje apropiado y la orientación mutua de las múltiples moléculas de tropoelastina que son un requisito previo para su reticulación final (por lisil oxidasa) en la elastina polimerizada insoluble. En la vía secretora de reciclaje, las moléculas de S-gal/EBP que descargan su carga de tropoelastina y salen temporalmente de la membrana celular regresan a los compartimentos endosómicos después de su reinserción al complejo Neu1-PPCA anclado a membrana celular. Los fragmentos proteolíticos remanentes de péptidos de elastina con motivos XGXXPG pueden regresar unidos al ERC. Una vez en el endosoma de reciclaje, este complejo molecular liberó fragmentos de XGXXPG unidos, se une de nuevo a las nuevas moléculas de tropoelastina administradas desde el retículo endoplasmático y los chaperones a la superficie celular. MAGP, glucoproteínas asociadas a microfibrillas.

Figura 4c Actividades de EBP de superficie celular: Los péptidos XGXXPG se unen a EBP (Blanchevoy) e inician la endocitosis del complejo ERC completo (Hinek et al., ibid.), por lo tanto, también internalizan al menos temporalmente Neu-1 y PPCA, y con ello reducen las actividades superficiales fisiológicas normales de Neu-1 y PPCA. Eso en sí mismo puede ser un aspecto normal de la reparación vascular. Sin embargo, en el exceso crónico de fragmentos de péptido XGXXPG circulantes, tal como fragmentos de péptidos derivados de elastina circulantes, péptido C y péptidos de galectina-3, la internalización de Neu-1 y PPCA con EBP unida a XGXXPG y, por lo tanto, la reducción de las actividades de Neu-1 y PPCA asociadas a la superficie celular, conduce a provocar diferentes características del síndrome metabólico, como resistencia a la insulina, LDL incrementado, proliferación de células vasculares con engrosamiento de la íntima y vasoconstricción con presión arterial elevada (hipertensión).

Las actividades importantes de Neu-1 de superficie celular se inhiben por internalización de ERC: La unión del péptido GXXP a ERC y la posterior internalización de ERC conducen a la posterior reducción de los efectos dirigidos por Neu-1 sobre la maduración de receptor que pueden dar por resultado características de la enfermedad vascular humana en el síndrome metabólico: resistencia a la insulina incrementada debido a un receptor de insulina inactivo, de captación de LDL reducida y niveles incrementados de LDL en sangre debido a un receptor de LDL inactivo, y proliferación endotelial incrementada con engrosamiento íntimo debido a un receptor de factor de crecimiento activo.

En la superficie celular, Neu-1 se implica en la desialilación de receptores de

superficie celular y con ello regula la señalización de receptor de superficie celular (Pshezhetsky AV, Ashmarina LI. Desialilación de receptores de superficie como una nueva dimensión en la señalización celular. *Biochemistry (Mosc)*. 2013 Jul;78(7): 736-45) e incrementa, entre otros, la sensibilidad a insulina y la captación de LDL, en tanto que disminuye la proliferación inducida por el receptor de factor de crecimiento a través de la remoción de ácido siálico de diferentes receptores de factor de crecimiento.

Neu-1 regula, entre otros, la maduración y activación de receptor de insulina (Alghamdi et al., A novel insulin receptor-signaling platform and its link to insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell Signal*. 2014 Jun;26(6): 1355-68). El inhibidor de NEU1, DANA, bloquea tanto la interacción entre las subunidades como la activación del receptor de insulina (Zhang et al., *Lipids Health Dis*. 2019; 18: 173.).

Como glucoproteínas de membrana integrales, los receptores de LDL también portan residuos de ácido siálico terminales. Se observó una inhibición significativa en la internalización de LDL de fibroblastos humanos después del tratamiento con neuraminidasa de aquellos receptores, que se asoció con una disminución en el número de sitios de receptor de LDL de superficie celular activos (Sprague et al., Stimulation of receptor-mediated low density lipoprotein endocytosis in neuraminidase-treated bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1988 Nov;137(2):251-62.). Además, se encontró que la unión de EDP al ERC modula el nivel de sialilación de CD36 y regula la captación de LDL oxidada a través de Neu-1 (Kaweckie et al., Identification of CD36 as a new interaction partner of membrane NEU1: potential implication in the pro-atherogenic effects of the elastin receptor complex. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Feb;76(4):791-807).

En cuanto a las actividades de factor de crecimiento, NEU-1 induce la inactivación del receptor del factor de crecimiento (Hinek et al., Neuraminidase-1, a subunit of the cell surface elastin receptor, desialylates and functionally inactivates adjacent receptors interacting with the mitogenic growth factors PDGF-BB and IGF-2. *Am J Pathol*. 2008 Oct;173(4):1042-56).

De forma breve, la unión de péptido GXXP y los efectos posteriores dirigidos por Neu-1 sobre la maduración de receptor pueden dar por resultado resistencia a la insulina incrementada debido a un receptor de insulina inactivado, de captación de LDL reducida y niveles incrementados de LDL en sangre debido a un receptor de LDL inactivado y proliferación endotelial incrementada debido a un receptor de factor de crecimiento aún no inactivado (desialilado). Se conoce además (Lee et al., NEU1 sialidase regulates the

sialylation state of CD31 and disrupts CD31-driven capillary-like tube formation in human lung microvascular endothelia. J Biol Chem. 2014 Mar 28;289(13): 9121-35) que NEU-1 desialilada activa inhibe la angiogénesis y que la señalización angiogénica se puede intensificar cuando las actividades de NEU-1 se bloquean por tratamiento con DANA (como se reporta en la presente en la figura 4).

Otras actividades de PPCA de superficie celular se inhiben por internalización de ERC: La unión de péptido GXXP a ERC y la posterior internalización de ERC conducen a la posterior reducción de los efectos dirigidos por PPCA sobre la proteólisis de los péptidos vasoconstrictores circulantes, lo que conduce a más péptidos vasoconstrictores circulantes y por lo tanto, a una presión arterial elevada, otra marca distintiva del síndrome metabólico.

La PPCA expresada en superficie celular regula la presión arterial a través de la proteólisis de péptidos bioactivos tal como angiotensina (Timur et al., Lysosomal Cathepsin A Plays a Significant Role in the Processing of Endogenous Bioactive Peptides. Front Mol Biosci. 2016 Oct 25;3:68) y endotelina-1 (Seyrantepe et al., Enzymatic activity of lysosomal carboxypeptidase (cathepsin) A is required for proper elastic fiber formation and inactivation of endothelin-1. Circulation. 2008 Apr 15;117(15):1973-81).

Figura 5

La angiogénesis, la formación de capilares a partir de microvasos preexistentes, es importante en muchos procesos. Junto con la inducción de niveles elevados de glucosa en sangre (ver figura 1), la activación del complejo de receptor de elastina (ERC) acelera la angiogénesis (J Cell Sci. 2005 Jan 15;118(Pt 2): 343-56.), por lo que la glucosa en sangre elevada estimula el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que acomoda esta angiogénesis. Ensayo de angiogénesis microvascular de células endoteliales microvasculares pulmonares humanas cultivadas en Matrigel como determinante de la reactividad de ERC y en respuesta a concentraciones crecientes de péptidos de GXXP 3, 6 y 8, ((VGVPAGVGVPAGVGVPAG, QVGQVELGGPGAGSLQP y GAYPGAPGAYPGAPAPGV, tomadas de la región de exón 24 de elastina humana, de la porción media de péptido C humano, y de la porción N-terminal de galectina-3 humana, figuras 4a, 4b y 4c, respectivamente). Los datos mostrados son mediciones de longitud de tubo total y mediciones de longitud de rama total a t=24 h. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A 4 h aún no se observó actividad angiogénica de los diferentes péptidos. También, como se esperaba, DANA potenció significativamente los efectos angiogénicos del péptido 3, a t=16, 24 y 40 h (P = 0,48, 0,011 y 0,032, respectivamente).

Figura 6

Las gráficas de EC50 con perfiles farmacológicos de péptido 3, 6 y 8 como se probaron en el ensayo de la figura 4, que muestra perfiles de reactividad de ERC funcionalmente equivalentes de los péptidos 3, 6 y 8.

Figuras 7a y 7b

Figura 7a

Alineaciones de secuencias de aminoácidos de péptido C de ratón y rata humana y localización de dominio PG y dominio de pentapéptido en las mismas.

Figura 7b

Tomada de Ohtomo et al., (Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na⁺, K⁺-ATPase activity of renal tubule segments. *Diabetologia*. 1998 Mar;41(3):287-91. doi: 10.1007/s001250050905. PMID: 9541168, incorporada en la presente por referencia. Para ser claros: Ohtomo et al. no se refieren al tratamiento de la hipoglucemia ni al tratamiento del hiperinsulinismo, y mucho menos se refiere al tratamiento de la hipoglucemia hiperinsulinémica que es el tema de la presente solicitud como se describe entre otros más adelante y anteriormente).

El metabolismo de glucosa incrementa la relación ATP:ADP e inicia el acoplamiento de secreción de estímulo β -cell al cerrar los canales de potasio (K^{+}_{ATP})¹ regulados por ATP. Estos canales son los principales reguladores del potencial de membrana en reposo de células β , y su cierre iniciará la despolarización de membrana, la apertura de los canales de Ca²⁺ de tipo L activados por voltaje y por lo tanto, un incremento en la concentración de Ca²⁺ libre citoplasmática ($[Ca^{2+}]_i$) y la exocitosis de insulina (Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*. 1984 Nov 29-Dec 5;312(5993):446-8. doi: 10.1038/312446a0. PMID: 6095103.). Cuando los canales K ATP se abren, las células beta se hiperpolarizan y se suprime la secreción de insulina (Koster JC, Permutt MA, Nichols CG. Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K⁺ channel (K⁺ ATP) connection. *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3065-72. doi: 10.2337/diabetes.54.11.3065. PMID: 16249427.).

La Na⁺,K⁺-ATPasa está implicada en el mantenimiento de los gradientes de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana plasmática de célula β . Extruye tres iones Na⁺ a cambio de dos

iones K^+ , generando un flujo neto de salida de cationes a través de la membrana celular. Esto hace que la bomba sea electrógena y da por resultado un efecto hiperpolarizante sobre el potencial de membrana. En consecuencia, la inhibición de la actividad de Na^+,K^+ -ATPasa (por ejemplo, por ouabaína) conduce a la despolarización de membrana de célula β y al influjo de Ca^{2+} . Por lo tanto, se ha postulado que una disminución en los gradientes de iones mediados por Na^+, K^+ -ATPasa puede ser un mecanismo que contribuye a la secreción de insulina (Owada et al., Glucose decreases Na^+,K^+ -ATPase activity in pancreatic beta-cells. An effect mediated via Ca^{2+} -independent phospholipase A2 and protein kinase C-dependent phosphorylation of the alpha-subunit. J Biol Chem. 1999 Jan 22;274(4):2000-8. doi: 10.1074/jbc.274.4.2000. PMID: 9890957.).

Por lo tanto, el canal K^+ sensible a ATP (canal K ATP), así como el canal $Na^+ K^+$ ATPasa pueden detectar cambios metabólicos en la célula beta pancreática, acoplando de este modo el metabolismo a la actividad eléctrica y en última instancia, a la modulación de la secreción de insulina. En la presente se postula que los péptidos XGXXPG o gpxxgx de dominio PG, y variantes de D-/L-aminoácido mixtas de los mismos, tal como derivados de péptido C, péptido de elastina, Galectina-3, y en particular fragmentos de los mismos pueden contribuir a la activación de la actividad de canal de $Na^+ K^+$ ATPasa, y con ello restaurar la polarización de membrana de células β y ayudar a inhibir la secreción de insulina, siguiendo las observaciones realizadas anteriormente por Othomo et al., que observaron la estimulación de la actividad de Na^+, K^+ -ATPasa en segmentos de túbulo renal de rata por péptido C (y fragmentos).

La secuencia de aminoácidos del péptido C de rata 1 se indica en las figuras 7a y 7b. Se encontró que el péptido C de longitud completa provocó actividad de Na^+, K^+ -ATPasa como se probó en segmentos de túbulos renales de rata. La actividad de péptido C de longitud completa, como se probó a 5×10^{-7} mol/l. se estableció en 100 %. Los números en la figura 6 denotan el porcentaje de la actividad estimulante de toda la molécula que se retiene por los fragmentos respectivos como se indica por líneas. Todos los fragmentos peptídicos se probaron a 5×10^{-7} mol/l.

La posibilidad de que los fragmentos de péptido C tal como fragmentos de dominio PG o de dominio de pentapéptido pudieran ejercer una estimulación directa de Na^+, K^+ -ATPasa a diferencia de una activación intracelular mediada por membrana también se examinó por Othomo et al. Se incubó una preparación purificada de Na^+, K^+ -ATPasa con péptido C de rata 1, y sus fragmentos de dominio de pentapéptido EVARQ o péptido de

dominio PG ELGGGPEAG. No se encontró activación medible con ninguno de estos péptidos con ATPasa aislada, que demuestra que no es probable que el efecto se ejerza sobre la ATPasa directamente, sino indirectamente y presumiblemente mediante un receptor.

Zhong et al., (C-peptide stimulates Na^+ , K^+ -ATPase via activation of ERK1/2 MAP kinases in human renal tubular cells. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2782-2790 (2004).) determinaron el mecanismo molecular por el cual el péptido C estimula Na^+ , K^+ -ATPasa en células tubulares renales humanas primarias (HRTC). La incubación de las células con péptido C humano 5 nM a 37 °C durante 10 min estimuló la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ por 40 % ($p < 0,01$). Se encontró que el pentapéptido humano carboxi-terminal EGSLQ provocaba 57 % de la actividad de la molécula intacta. En paralelo con la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ sensible a ouabaína, el péptido C incrementó la fosforilación de subunidad y la abundancia de membrana basolateral (BLM) de las subunidades Na^+ , K^+ -ATPasa α_1 y β_1 . El incremento en la abundancia de BLM de las subunidades α_1 y β_1 de Na^+ , K^+ -ATPasa se acompañó por el agotamiento de las subunidades α_1 y β_1 de los compartimentos endosómicos. La acción de péptido C en Na^+ , K^+ -ATPasa fue dependiente de ERK1/2 en HRTC. La activación de Na^+ , K^+ -ATPasa estimulada por péptido C, la fosforilación de subunidad α_1 y la translocación de subunidades α_1 y β_1 a la BLM se abolieron por un inhibidor de MEK1/2 (PD98059 20 μM). La estimulación de péptido C de la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ también se abolió por preincubación de HRTC con un inhibidor de PKC (GF109203X 1 μM). El péptido C estimuló la fosforilación de la subunidad α de Na^+ , K^+ -ATPasa humana en motivos de aminoácido Thr-Pro, que forman sustratos de ERK específicos. En conclusión, el péptido C y su pentapéptido EGSLQ estimulan la actividad de bombeo de sodio a través de la fosforilación inducida por ERK1/2 de residuos de Thr en la subunidad α de Na^+ , K^+ -ATPasa.

Como se muestra que el péptido C y algunos de sus fragmentos son un ligando del ERC, en la presente se divulga que la activación mediada por ERC de Na^+ , K^+ -ATPasa por péptido C y dominio PG o dominio de pentapéptido relacionado, o péptidos relacionados que tienen tanto fragmentos de dominio PG como de dominio de pentapéptido, proporciona un mecanismo de retroalimentación para reducir la exocitosis de insulina y la secreción de insulina de células beta.

Descripción detallada

Ejemplo 1

Empleo de patrones de mimetismo molecular plasmodial existentes para identificar motivos de unión a receptor de hospedador esenciales *in silico*.

Aquí, la invención divulga un enfoque bioinformático *in silico* del proteoma de la malaria, de diferentes proteínas en etapa sanguínea codificadas por familias multigénicas, usando herramientas y bases de datos públicamente disponibles, para identificar el motivo de aminoácidos que mejor se ajusta del complejo de receptor de elastina humano (ERC), que actualmente resiste la expresión funcional y los estudios de caracterización molecular. En esencia, la invención divulga un método para identificar un motivo de aminoácido que se une a un receptor celular de un mamífero (tal motivo en la presente también identificado como dominio quimiotáctico), en donde el método comprende los siguientes pasos en orden consecutivo:

(i) seleccionar motivos de aminoácidos candidatos;

(ii) determinar la frecuencia de aparición de cada uno de los motivos de aminoácidos candidatos en el proteoma de un patógeno; en donde el patógeno es un patógeno que puede infectar al mamífero;

y

iii) identificar el motivo de aminoácido candidato con la mayor frecuencia de aparición en el proteoma del patógeno como el motivo de aminoácido que se une al receptor celular del mamífero.

El motivo de unión de ERC reside en un motivo peptídico corto con secuencia xGxxPx, preferentemente xGxxPG, y su motivo prototipo VGVAPG se encuentra aquí expresado repetidamente en especies de *Plasmodium* que infectan a primates. Estas secuencias tienen patogenicidad vascular distinta en humanos. La invención divulga mapas de cúmulos del dipéptido interno, que requieren pruebas *in silico* de 400 dipéptidos contenidos en xGxxPG, para ilustrar el mejor ajuste a ERC, como se encuentra en proteínas en estadio sanguíneo de *Plasmodium*.

Contexto

Se ha observado la adquisición de proteínas tipo hospedador, y por lo tanto la capacidad de imitar molecularmente su función, en muchos patógenos bacterianos y virales (Cell. 2006 Feb 24;124(4):767-82). En protozoos parásitos hay casos donde tramos de aminoácidos presentes en una proteína de superficie celular codificada por parásito coinciden con regiones de proteínas hospedadoras (Mol Biochem Parasitol. 1998 Aug

1;94(2):185-96). En estos y otros casos, los emparejamientos corresponden a una repetición de aminoácido común que se comparte entre ellos (Nature. 1988 Sep 1;335(6185):82-5; Mol Biochem Parasitol. 1992 Jul;53(1-2):105-12).

Los parásitos de malaria (*Plasmodium spp.*) invaden tanto las células hepáticas como los glóbulos rojos (RBC) en hospedador vertebrado. Habitualmente, *Plasmodium spp.* varía el perfil de expresión de sus genes dependiendo del hospedador en el que reside y su etapa de desarrollo. En la llamada etapa sanguínea, remodelan activamente los RBC infectados (iRBC) por exportación y tráfico de diferentes proteínas codificadas por familias multigénicas a la membrana plasmática de RBC (PLoS Pathog. 2016 Nov 16;12(11):e1005917).

Se conoce que estas proteínas tienen un papel inmunomodulador potencial ya sea como homólogos funcionales de moléculas hospedadoras o por unión a células presentadoras de antígeno hospedadoras (Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Sep 11;98(19):10829-32; Nature. 1999 Jul 1;400(6739):73). Paine et al. (Nature. 2008 Oct 9;455(7214):799-803), proporcionan una primera observación de su tipo en una proteína de malaria que muestra la adquisición de secuencias peptídicas de hospedador que es probable que estén en la superficie celular infectada y por lo tanto pueden interactuar con el hospedador. Considerando el repertorio genómico muy diverso de *Plasmodium spp.* (Genes (Basel). 2021 May 30;12(6):843), es probable que se puedan encontrar muchas más de estas secuencias de proteínas tipo hospedador adquiridas. Además, considerando que distintas *Plasmodium spp.* han tenido millones de años para coevolucionar con su hospedador respectivamente preferido, es probable que las secuencias mínimamente esenciales también como las que mejor se ajustan para unirse a distintos hospedadores-receptores de este hospedador preferido estén enriquecidas en este repertorio. Estudiar ese repertorio para los motivos xGxxPG preferidos en Plasmodia infectantes de primates dilucidaría las preferencias de ERC-humanas. Los estudios de control con Plasmodia que infectan roedores necesariamente darían por resultado un resultado diferente, roedores que tienen una proteína de unión a elastina truncada en su ERC (no publicado). Mapeo de péptidos agonistas preferidos de complejo de receptor de elastina relacionados con resistencia a insulina.

Resultados

Se detectaron preferencias de motivo xGxxPG en proteínas plasmodiales relacionadas con proteínas de etapa sanguínea de merozoíto asociadas con la aparición

de resistencia a insulina en etapa sanguínea. Resultados iniciales después de agrupar las apariciones internas de dipéptido-preferencia en la posición XiX₂ en Gx₁X₂P motivo de complejo de receptor de elastina (ERC) en proteínas de superficie de merozoito Plasmodial y/o proteínas SERA5 detectadas en

A) Proteínas plasmodiales derivadas de plasmodios infectantes de PRIMATE *P. vivax* (n=13) o *P. falciparum* (n=11) como están presentes en la base de datos Uniprot revisada en octubre de 2022.

B) Proteínas plasmodiales derivadas de plasmodios infectantes de ROEDOR *P. yoelii* (n=4) o *P. berghei* (n=3) como presentes en la base de datos Uniprot revisada en octubre de 2022.

Como se muestra en la figura 1, de las 400 secuencias de dipéptidos analizadas, la agrupación muestra una preferencia por el dipéptido VA en el motivo GVAP en el dominio quimiotáctico preferido de unión al ERC en las proteínas plasmodiales infectantes de primate analizadas (1A) y una preferencia por el dipéptido AV en el motivo GAVP en las proteínas plasmodiales infectantes de ROEDOR analizadas (1B).

Las entradas de proteína plasmodiales infectantes de roedor e infectantes de primate en Uniprot se sondaron entonces por búsqueda de péptidos con diferentes motivos peptídicos que portaban los motivos GVAP y GAVP encontrados. En particular, se encontró GVAP en los motivos VGVAPG que se encontró repetidamente presente en proteínas plasmodiales derivadas de plasmodios infectantes de PRIMATE, y también se encontró repetidamente en elastinas de primates (ver también las tablas 1 y 2).

Tabla 1	
Exón 24 de elastina humana	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGV
Exón 24 de elastina de mono Rhesus	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGIGPGGVAGVG
Exón 24 de elastina de ratón	GLGPGVGGVPGGVGVGGIPGGVGVGGVPGGVPGGVPGGVGTGIGAGPGLGGAG
Exón 24 de elastina de rata CDR	GLGPGVGGVPGGVGVGGIPGGVGVGGVPGGVPGGVGTGIGTGPGLGLVP
Exón 22 de elastina humana	no expresado

Exón 22 de elastina de mono Rhesus	no expresado
Exón 22 de elastina de ratón	GAGGAGALGGLVPGAVPGALPGAVPAVPGAGGVPAGATP
Exón 22 de elastina de rata CDR	GAGGAGTLGGLVPGAVPGALPGAVPGALPGAVPGALPGAVP GVPGTGGVPAGAT

El péptido VGVAPG se considera habitualmente el péptido de unión a ERC prototipo y está comercialmente disponible (número de producto de Bachem 4010536; descrito como: *Dominio quimiotáctico de elastina; VGVAPG estimuló la proliferación de fibroblastos de piel humana y fue quimiotáctico para fibroblastos y monocitos. La forma palmitoilada se comercializa como ingrediente cosmético*).

El dominio peptídico VGVAPG se codifica y expresado por el exón 24 de elastinas de primate en general. Por el contrario, el exón 24 de las elastinas de roedor no codifica ni expresa VGVAPG (ver tabla 1), y además habitualmente carece de la presencia (múltiple) de la alanina (A) y el péptido agrupado preferido con motivo GAVP como se muestra en la figura 1B. Se encontraron varios motivos peptídicos xGxxPG en la secuencia de exón 24 de ratón que juntos se encontraron en 1143 entradas de Uniprot, de las cuales 420 entradas de proteína de elastina (de primates a roedores, y de peces y reptiles a aves), y en 24 entradas de proteína de *Plasmodium*, sin embargo, ninguna de esas 24 fueron proteínas de *Plasmodium* infectantes de roedores (ver para más detalles la tabla 2). Además, las secuencias de repetición en tándem más largas que VGVAPG₍₂₎, tal como VGVAPG₍₃₎ y VGVAPG₍₆₎ (respectivamente VGVAPGVGVAPG, VGVAPGVGVAPGVGVAPG y VGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPG se encontraron abundantemente en elastinas de primate y proteínas plasmodiales infectantes de primate, lo que permite la conclusión de que las especies de *Plasmodium* de primate imitan específicamente el dominio quimiotáctico de la elastina: VGVAPG

A partir de los descubrimientos anteriores, se concluyó que la secuencia del exón 24 de ratón (contrariamente a la secuencia del exón 24 de primate con VGVAPG) no especificó un dominio quimiotáctico de elastina que está disponible en proteínas plasmodiales que infectan ROEDOR.

Los requerimientos estructurales para el ERC con la proteína de unión a elastina EBP se describen bien en humanos (ver por ejemplo entrada Uniprot P16278 isoforma 2 y Hinek et al., Am J Hum Genet. 2000 Jul;67(1):23-36; y también ver Blanchevove et al (2013)

Interaction between the elastin peptide VGVAPG and human elastin binding protein, J Biol Chern 288:1317-28).

Sin embargo, se conoce poco acerca de los requerimientos estructurales del ERC con la proteína de unión a elastina EBP en roedores. Aquí se comparte información no publicada de que la EBP de roedor se trunca considerablemente en el extremo N en la EBP de roedor, en comparación con la EBP humana, con consecuencias para el dominio quimiotáctico preferido de la proteína de roedor. En particular, la EBP de roedor pierde los primeros ~80 aminoácidos N-terminales de la versión humana, pero aún contiene un sitio de unión VVGSPSAQDEASPL habitual para péptidos de motivo XGXXPG. Es probable que estos cambios tengan algún efecto de unión del péptido XGXXPG a la EBP de roedor en comparación con la EBP humana. Además, el gen de elastina humana tiene dos exones menos que el ratón, atribuible a la pérdida secuencial de los exones 34 y 35 durante la evolución del primate (Szabo et al., (1999) Sequential loss of two neighbor exons of the tropoelastin gene during primate evolution. J. Mol. Evol. 49, 664-671), y además, aunque todavía está contenido en el gen humano, el exón 22 nunca se incluye en el transcrito de elastina humana, sino que se encuentra en el transcrito de ratón.

Al buscar el motivo GAVP predicho que se encontró que se agrupaba en las proteínas plasmodiales de roedor en las secuencias de ratón y rata, fue el exón 22 (y no 34 o 35) el que contenía el motivo GAVP en el dominio quimiotáctico preferido de unión al ERC (tabla 2).

En particular, se encontró GAVP en los motivos PGAVPG que se encontró repetidamente presente en proteínas plasmodiales derivadas de plasmodios infectantes de roedores, y también se encontró repetidamente en elastinas de roedores (ver también tablas 1 y 2), en tanto que los análisis cruzados no mostraron apariciones de una repetición en tándem de PGVAPG en primates ni de una repetición en tándem de VGAVPG en roedores. Además, las secuencias de repetición en tándem más largas AVPG₍₂₎, tal como AVPG₍₃₎ y AVPG₍₆₎ (respectivamente AVPGAVPG, AVPGAVPGAVPG y AVPGAVPGAVPGAVPGAVPGAVPGAVPGAVPG se encontraron abundantemente en elastinas de roedor y proteínas plasmodiales de roedor, lo que permite la conclusión de que las especies de *Plasmodium* de roedor preferían e imitan específicamente otro dominio quimiotáctico de elastina: PGAVPG

Tabla 2	Secuencias buscadas	Entradas de proteínas Uniprot			Nota:
		Todos	Elastina	Plasmodial	Con acceso 07-/5-7/2023
motivos derivados de EXÓN 24 humano/macaco	VGAPG(2)	339	170	51	Solo elastinas de primate y solo proteínas plasmodiales infectantes de primate
	VGAPG(3)	307	167	41	
	VGAPG(6)	113	45	10	
	PGVGLAPG	234	11	0	Solo elastinas humanas
Cruce	PGVAPG(2)	72	33	0	Sin elastinas de roedores
motivos derivados de EXÓN 24 de ratón/rata	GVGLPGG	223	60	0	Tanto las elastinas de primate como de roedor y solo las proteínas plasmodiales infectantes de primate
	GVGGIPGG	78	23	0	
	PGVGGVPG	792	336	24	plasmodiales infectantes de primate
	VGGVPG(2)	166	155	24	Sin elastinas de roedores
motivos derivados de EXÓN 22 de ratón/rata	AVPG(2)	588	133	18	Sin elastinas de primate y solo proteínas plasmodiales infectantes de roedores
	AVPG(3)	109	18	14	
	AVPG(6)	24	6	7	
	ALPG(2)	431	0	0	
	ALPGAVPG	167	11	0	Solo elastinas de roedores
	AVPGALPG	282	12	0	
	GVAPGGVAPG	9	0	0	
Cruce	VGAVPG(2)	4	3	0	Todas elastinas de aves

Tabla 3	Ilustración de los resultados de búsqueda de péptidos con VGAPG ₍₃₎ específico de plasmodial infectante de primate		
Entrada Uniprot	Nombre de proteína	Organismo en el que se encontró	Apariciones de VGAPG
<u>P15502</u>	ELASTINA	<u>Homo sapiens (humano)</u>	6
<u>A0A1D5QE80</u>	ELASTINA	<u>Macaca mulatta (macaco Rhesus)</u>	7

<u>A0A2I2YC63</u>	ELASTINA	<u>Gorilla gorilla gorilla (gorilla lowland occidental)</u>	9
<u>A0A2I3H867</u>	ELASTINA	<u>Nomascus leucogenys (gibón de mejillas blancas del norte) (Hylobates leucogenys)</u>	7
<u>A0A2BRX20</u>	ELASTINA	<u>Pan paniscus (Chimpancé pigmeo) (Bonobo)</u>	8
<u>A0A2J8Q8F5</u>	ELASTINA	<u>Pan troglodytes (chimpancé)</u>	9
<u>A0A2J8XUS5</u>	ELASTINA	<u>Pongo abelii (orangután de Sumantran) (Pongo pygmaeus abelii)</u>	9
<u>A0A2K5DV67</u>	ELASTINA	<u>Aotus nancymae (Mono nocturno de Nancy Ma)</u>	3
<u>A0A2K5JW24</u>	ELASTINA	<u>Colobus angolensis palliatus (colobo angoleño de Peters)</u>	6
<u>A0A2K5JWC6</u>	ELASTINA	<u>Cercocebus atys (mangabey gris) (Cercocebus torquatus atys)</u>	7
<u>AQA2K5R675</u>	ELASTINA	<u>Cebus imitator (capuchino panameño de cara blanca) Cebus capucinus imitator)</u>	9
<u>A0A2K5XQM6</u>	ELASTINA	<u>Mandrillus leucophaeus (Drill) (Papio leucophaeus)</u>	7
<u>AQA5F7ZFJ4</u>	ELASTINA	<u>Macaca mulata (macaco Rhesus)</u>	7
<u>A0A2K63HI2</u>	ELASTINA	<u>Macaca nemestrina (macaco de cola de cerdo)</u>	7
<u>A0A2K6MP22</u>	ELASTINA	<u>Rhinopithecus bieti (mono negro de nariz chata) (Pygathrix bieti)</u>	5
<u>A0A2K6NWE2</u>	ELASTINA	<u>Rhinopithecus roxellana (mono dorado de nariz chata) (Pygathrix roxellana)</u>	7
<u>A0A2K6UXV2</u>	ELASTINA	<u>Saimiri boliviensis boliviensis (mono ardilla boliviano)</u>	4
<u>A0A6J3FYD0</u>	ELASTINA	<u>Sapajus apella (Capuchino de cabeza marrón) (Cebus apella)</u>	5
<u>A0A7N9CKC2</u>	ELASTINA	<u>Macaca fascicularis (macaco cangrejero) (mono Cynomolgus)</u>	7

<u>A0A480HHP7</u>	ELASTINA	<u>Sus scrofa (cerdo)</u>	4
<u>A0A5N4CXR5</u>	ELASTINA	<u>Camelus dromedarius (dromedario)</u> <u>(camello árabe)</u>	3
<u>A0A6J3BAI6</u>	ELASTINA	<u>Vucugna Pacos (Alpaca) (Lama pacos)</u>	3
<u>A0A8B7K7S4</u>	ELASTINA	<u>Camelus ferus (camello bactriano</u> <u>silvestre) (Camelus bactrianus ferus)</u>	5
<u>A0A8C2RQD4</u>	ELASTINA	<u>Capra hircus (cabra)</u>	3
<u>A0A8C3YJF1</u>	ELASTINA	<u>Catagonus wagneri (pecarí de Chaco)</u>	5
<u>A0A8C6FHG8</u>	ELASTINA	<u>Moschus moschiferus (ciervo</u> <u>almizclero siberiano) (Moschus</u> <u>sibiricus)</u>	4
<u>A0A060RP03</u>	Proteína 1 de membrana de eritrocitos, EMP1	<u>Plasmodium reichenowi</u>	8
<u>A0A2P9C6H4</u>	Proteína 1 de membrana de eritrocitos, EMP1	<u>Plasmodium sp. Gorilla dade G2</u>	4
<u>A0A2P9GE15</u>	Proteína 1 de membrana de eritrocitos, EMP1	<u>Plasmodium sp. DRC-Itaito</u>	6
<u>A0A0E4FHZ7</u>	Antígeno 5 de repetición de serina (SERA)	<u>Plasmodium vivax (parásito de malaria</u> <u>P. vivax)</u>	4
<u>A0A0J9THX3</u>	Antígeno 5 de repetición de serina (SERA)	<u>Plasmodium vivax Mauritania I</u>	3
<u>A0A1A8WTK7</u>	Proteína tipo MSP7 (MSRP2)	<u>Plasmodium ovale curtisi</u>	5
<u>A0A1A8X783</u>	Antígeno de repetición de serina	<u>Plasmodium malariae</u>	7
<u>A0A5P1A111</u>	Proteína 1 de membrana de eritrocitos, EMP1	<u>Plasmodium falciparum (parásito de</u> <u>malaria P. falciparum)</u>	4
<u>W7K0V8</u>	Proteína 1 de	<u>Plasmodium falciparum UGT5.1</u>	8

	membrana de eritrocitos, EMP1		
<u>A0A1A8ZAZ8</u>	Proteína tipo MSP7 (MSRP2)	<i>Plasmodium</i> <u>ovale wallikeri</u>	9
<u>A0A1B1DWS5</u>	Proteína KIR	<i>Plasmodium</i> <u>coatneyi</u>	10
<u>A0A1B1DWU8</u>	Proteína de superficie de merozoito 1	<i>Plasmodium</i> <u>coatneyi</u>	5
<u>A0A1Y1JAI5</u>	Antígeno 3 de repetición de serina	<i>Plasmodium</i> <u>gonderi</u>	15

Tabla 4	Ilustración de los resultados de búsqueda de péptidos con AVPG ⁽³⁾ específico de plasmodial infectante de primate		
Entrada Uniprot	Nombre de proteína	Organismo en el que se encontró	Apariciones de VGVAPG
<u>A0A8B7ERH7</u>	ELASTINA	<u>Microcebus murinus (lémur ratón gris)</u> (<u>Lemur murinus</u>)	6
<u>A0A6P5LS00</u>	ELASTINA	<u>Phascolarctos cinereus (Koala)</u>	3
<u>A0A6P6ECR2</u>	ELASTINA	<u>Octodon degus (Degu) (Sciurus degus)</u>	3
<u>A0A8C5KN57</u>	ELASTINA	<u>Jaculus jaculus (lerboa egipcio menor)</u>	3
<u>A0A286XYG7</u>	ELASTINA	<u>Cavia porcellus (conejillo de indias)</u>	3
<u>A0A673UG76</u>	ELASTINA	<u>Suricata suricatta (suricata)</u>	4
<u>P13828</u>	Proteína de superficie de merozoito 1	<i>Plasmodium</i> <u>yoelii yoelii</u>	6
<u>V7PP57</u>	Proteína de superficie de merozoito 1 Transcripción de unión a CCAT	<i>Plasmodium</i> <u>yoelii 17X</u>	4
<u>A0A081ICC6</u>	Proteína tipo factor Transcripción de unión a CCAT	<i>Plasmodium</i> <u>vinckei vinckei</u>	3
<u>A0A6V7SK24</u>	Proteína tipo factor Transcripción de unión	<i>Plasmodium</i> <u>vinckei vinckei</u>	5

	a CCAT		
<u>A0A6V7RXG9</u>	Proteína tipo factor Transcripción de unión a CCAT	<i>Plasmodium vinckei lentum</i>	7
<u>W7AU5</u>	Proteína tipo factor Transcripción de unión a CCAT	<i>Plasmodium vinckei petteri</i>	4
<u>A0A1C6X986</u>	Proteína tipo factor	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>	7
<u>A0A1D3LBQ3</u>	Antígeno rico en asparagina Transcripción de unión a CCAT	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>	3
<u>A0A1C6XH03</u>	Proteína tipo factor, putativa	<i>Plasmodium chabaudi adami</i>	8

Ejemplo 2

Síntesis de péptidos y péptidos adecuados con el dominio quimiotáctico requerido.

En la descripción de la composición, estructura y función de proteínas o péptidos en la presente, se hace referencia a los aminoácidos. En la presente especificación, los residuos de aminoácidos se expresan al usar las siguientes abreviaturas. También, a menos que se indique explícitamente lo contrario, las secuencias de aminoácidos de péptidos y proteínas se identifican de extremo N-terminal a extremo C-terminal, de extremo izquierdo a extremo derecho, el extremo N-terminal que se identifica como un primer residuo. Ala: residuo de alanina; Asp: residuo de aspartato; Glu: residuo de glutamato; Phe: residuo de fenilalanina; Gly: residuo de glicina; His: residuo de histidina; Ile: residuo de isoleucina; Lys: residuo de lisina; Leu: residuo de leucina; Met: residuo de metionina; Asn: residuo de asparagina; Pro: residuo de prolina; Gln: residuo de glutamina; Arg: residuo de arginina; Ser: residuo de serina; Thr: residuo de treonina; Val: residuo de valina; Trp: residuo de triptófano; Tyr: residuo de tirosina; Cys: residuo de cisteína. También se puede hacer referencia a los aminoácidos por sus abreviaturas de código de una letra convencionales; A=Ala; T=Thr; V=Val; C=Cys; L=Leu; Y=Tyr; I=Ile; N=Asn; P=Pro; Q=Gln; F=Phe; D=Asp; W=Trp; E=Glu; M=Met; K=Lys; G=Gly; R=Arg; S=Ser; y H=His.

Los péptidos moduladores para el tratamiento de trastornos relacionados con la

secreción de insulina (ISRD) como se proporcionan en la presente tienen preferentemente un motivo seleccionado del grupo al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de un péptido con motivo VGVAPG, vGVAPG, vGvAPG, vGVaPG, vGvaPG, LGGGPG, IGGGPG, PGAYPG, pGAYPG, pGaYPG, pGAyPG o pGayPG, lo que permite dirigirse al receptor de elastina en la superficie de las células. Los ejemplos habituales son péptidos tal como RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR, PGAIPG, GAVPG, GVLPG, GGVPg, GVVPG, VGVAPG, VVGPGA, VGVAPG, LGGGPG, QGQLPG, PGAYPG, QGVLPA, AQGVAPG, LQGVAPG, AQGVLPg, LQGVLPg, AQGVAPGQ, LQGVAPGQ, AQGVLPgQ, LQGVLPgQ, VGVAPGVGVAPG, LGGGPGAGSLQP y PGAYPGAPAPGV, VGVAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPG, QVGQVELGGGPG y GAYPGAPGAYPG, VGVAPGVGVAPGVGVAPG, QVGQVELGGGPGAGSLQP y GAYPGAPGAYPGAPAPGV, VGVAPG, GVAPGV, VAPGVG, APGVGV, PGVGVA, GVGVAp, PGAIPG, LGTIPG, LGGGPGAG, GGGPGAG, GGGP, GGGPG, GAGPG, GGGPE, GAIPG, GGVPg, GVAPG, YTTGKLPGYGYPGG, YGARPGVGVGIP, PGFGAVPGA, GVYPg, GFGPG, GVLPG, GAIPG, PGAIPG, PGAVPG, VGAMPg, VGS LPG, VGMAPG, VPGVG, IPGVG, VGS LPG, VGVAPG, VGVPg, AGAIPG, VPGV, LGITPG, GDNp, GAIP, GKVP, GVQP, GVGP, GFGP, GGIP, GVAP, GIGP, GAGP, GGIPP, GQFP, GLSP, GGPQP, GPQPG, GGPQPG, GIPP, GGIPP, GIPPA, GGIPPA, EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPL, DLQVGQVELGGGPGAGSLQP, LVGQVELGGGPGAGSLQPL, QVGQVELGGGPGAGSLQPL, ELGGGPGAGSLQPL, DLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, LGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, LVGQVELGGGPGAGSLQPL, LGGGPGAGSLQPL, y LQVGQVELGGGPG, LQVGQVELGG y/o GGPAGSLQPL, PQGWPGAWGNQPAGAGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAP APGVYPGPPSGPGAYPSS GQPSATGAYPATGPY GAPAGPLIVPYNLPLPGGVPRM, AGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYP, MMRVLQAVLPPLPQVVCTYR, GAPGAYPGAPAPGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPATGPY y GAPAGPLIVPYNLPLPGGVVP, GAYPGAPGAYPGAPAPGV y PGAYPG, PGAYPGQAPPGAYPG, PGAYPGQA y GQAPPGAYPG, vGVAPGVGVAPGVGVApG, vGVAPGVGVAPGEGSLQa, qVGQVELGGGPGAGSLQp, qVGQVELGGGPGEGSLQa, GaYPGAPGAYPGEGSLQav, GaYPGAPGAYPGAPAPGv, vGvAPGVGVAPGVGVApG, qvGQVELGGGPGAGSLqp, GayPGAPGAYPGAPApGv vGvaPGVGVApGVGvApG, qvGqVELGGGPGAGSLqp y GaypGAPGAYPGAPApGv, gpavgvpgpavgvpgpavgv, pqlsgagpggglevqgvq, vgpapagpyagpagpyay, aqlsgegpavgvpgpavgv, aqlsgepggglevqgvq, aqlsgegpypagpagpyay, vGVAPGVGVApG, vGVAPGEGSLQa, qGGGPGAGSLQp,

qGGGPGEGLQa, GaAYPGEGSLQav, GaYPGAAPAPGv, vGvAPGVGVapG, qvGGGPAGSLqp, GayPGAAPApGv vGvaPGVGVapG, qvGqVELGGPGqp y GaypGAAPapGv, gpavgvgpavgv, pqlsgepgggglvq, vgpapgpapgyay, aqlsgegpavgv, aqlsgepgggqgvq, aqlsgegpapgyay o un equivalente funcional de los mismos.

Se señala que, a excepción de la glicina, todos los α -aminoácidos estándar pueden existir en cualquiera de los dos isómeros ópticos, que son la imagen especular entre sí; estos se llaman L- y D-aminoácidos. En la presente, cuando se define a una secuencia de aminoácidos de un péptido en el código de una letra, las letras minúsculas indican D-aminoácidos, en tanto que las letras mayúsculas indican L-aminoácidos, con la notable excepción de glicina, en donde tanto g como G indican el aminoácido glicina del cual no existen isómeros ópticos y, por lo tanto, no existe diferencia entre las formas D o L.

Péptidos con motivo GxxP que comprenden motivos de unión a ERC de dominio PG tal como VGVAPG, GVAPGV, VAPGVG, APGVGV, PGVGVA, GVGvAP, PGAIPG, LGTIPG, LGGPGAG, GGGPGAG, GGGP, GGGPG, GAGPG, GGGPE, GAI PG, GGVPg, GVAPG, YTTGKLPGYGPgG, YGARPGVGVGIP, PGFGAVPGA, GVYPG, GFGPG, GVLPG, GAI PG, PGAIPG, PGAVPG, VGAMPg, VGSLPG, VGMAPG, VPGVG, IPGVG, VGSLPG, VGVAPG, VGVPg, AGAIPG, VPGV, LGITPG, GDNP, GAIP, GKVP, GVQ.P, GVGP, GFGP, GGIP, GVAP, GIGP, GAGP, GGIPP, GQFP, GLSP, GGPQP, GPQPG, GGPQPG, GIPP, GGIPP, GIPPA, GGIPPA, AQGVAPG, LQGVAPG, AQGVLPg, LQGVLPg, AQGVAPGQ, LQGVAPGQ, AQGVLPgQ, LQGVLPgQ, o variantes de dominio quimiotáctico retro- o inverso- o retro- inverso- o mixto L-/D- de los mismos se sintetizan de acuerdo con la síntesis clásica en fase sólida o por métodos alternativos conocidos en la técnica. El péptido v14, un péptido que reproduce la secuencia de S-Gal que interactúa con péptidos de elastina que portan el motivo GxxP, se obtiene de Neosystem (Estrasburgo, Francia). De manera alternativa, el péptido v14 y las variantes del mismo se sintetizan como se describe en la presente. La pureza de los péptidos se confirma por cromatografía líquida de alto rendimiento y por espectrometría de masas de bombardeo de átomos rápidos.

De forma habitual, los péptidos se definen como moléculas que consisten en entre 2 y 50 aminoácidos, en tanto que las proteínas se componen de 50 o más aminoácidos. Además, los péptidos tienden a estar menos bien definidos en estructura que las proteínas, que pueden adoptar conformaciones complejas conocidas como estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias. También se pueden hacer distinciones funcionales entre péptidos y proteínas. Los péptidos, sin embargo, se pueden subdividir en péptidos, que tienen pocos

aminoácidos (por ejemplo, 2 a 30-50), y polipéptidos, que tienen muchos aminoácidos (>50). Las proteínas se forman a partir de uno o más polipéptidos unidos. Por lo tanto, las proteínas son esencialmente péptidos muy grandes. De hecho, la mayoría de los investigadores, así como esta solicitud, usan el término péptido para referirse específicamente a péptidos, o de otra manera cadenas de aminoácidos relativamente cortas (<51 aminoácidos), con el término polipéptido que se usa para describir proteínas, o cadenas de > 50 o mucho más aminoácidos.

Ejemplo 3

El complejo de receptor de elastina (ERC, en la presente también identificado como receptor de elastina)

El receptor de elastina se implica en quimiotaxis de leucocitos y activación de metaloproteinasas de matriz, en migración de células endoteliales y angiogénesis y en proliferación de fibroblastos y células de músculo liso vascular. El receptor se activa por fragmentos (proteolíticos) de matriz extracelular en tejido de granulación después de lesión o inflamación de tejido, cumpliendo trabajos manuales hacia reparación de tejido.

El receptor consiste en una variante de empalme alternativa de beta-galactosidasa. Es bien conocido ofertar a cualquier péptido que tenga un motivo hexapéptido X-Gly-X-X-Pro-Gly (XGXXPG) en (fragmentos proteolíticos de) proteínas de matriz extracelular tal como elastina y fibrilina-1 4. El representante más conocido del motivo es el hexapéptido VGVAPG que se encuentra en (tropo)elastina, pero muchos otros péptidos biológicamente activos que se ajustan a la secuencia de signatura XGXXPG, en general llamados péptidos de elastina, se han reportado como agonistas. WO2018141970 identifica otros péptidos y proteínas diferentes, tal como péptido C, notablemente su porción media, y galectina-3, notablemente su fragmento N-terminal, como ligandos del ERC. Una secuencia mínimamente esencial para la actividad biológica es GXXP, con el péptido en P adoptando un giro beta tipo VIII, una condición considerada siempre cumplida cuando el aminoácido después de la prolina (en su lado N-terminal) es glicina. La lactosa y/o el péptido v14 VVGSPSAQDEASPL que corresponde al sitio de unión a péptido del receptor, se usa para antagonizar la unión del péptido de elastina.

El receptor de elastina consiste en un complejo de la proteína de unión a elastina (EBP) con neuraminidasa (Neu-1) y proteína protectora-catepsina A (PPCA) en la superficie celular. Después de unirse a su ligando, el complejo se internaliza a compartimentos

endosómicos en la célula y desencadena numerosas respuestas celulares. En ratones, los péptidos de elastina exógenos con motivo GXXP potencian la aterosclerosis a través de Neu-1 y regulan la resistencia a la insulina debido a una interacción entre Neu-1 y el receptor de insulina. Además, en ratones, se requiere PPCA para el montaje de fibras elásticas y la inactivación de endotelina-1, alteración de la activación de endotelina-1 que resulta en hipertensión.

Estudio de prueba de concepto realizado en Aquilo BV para Resiliun BV para evaluar la eficacia del fragmento de elastina y los fragmentos de péptido GXXP relacionados del péptido C y Galectina-3 en la angiogénesis mediada por Neu-1 y la sensibilidad al receptor de insulina. NEU1 desialilada activa inhibe la angiogénesis (J Biol Chem. 2014 Mar 28;289(13):9121-35) y esta actividad se bloquea por tratamiento con DANA.

Las sialidasas, también conocidas como neuraminidasas (NEU), son una familia de enzimas responsables de la regulación de la expresión de ácido siálico en la superficie celular al remover ácido siálico de glucoconjugados endógenos (Xiao et al., Proc Natl Acad Sci usa. 2016 Sep 13; 113(37):10304-9.). Además, el ácido siálico terminal promueve la integridad de la barrera endotelial (Cioffi et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012 May 15; 302(10):L1067-77). La enzima más famosa de esta familia es la neuraminidasa de influenza, que se descubrió por primera vez en la década de 1950. Las neuraminidasas son una gran familia que se encuentra en muchos organismos, incluidos virus, bacterias, hongos, protozoarios, aves y mamíferos (Pshezhetsky and Ashmarina, Biochemistry (Mose). 2013 Jul; 78(7):736-45.). La neuraminidasa se encuentra en muchos órganos de mamíferos. NEU1 se expresa más alto en los riñones, páncreas, músculo esquelético, hígado, pulmones, placenta y cerebro; NEU2 se encuentra principalmente en el tejido muscular; NEU3 se expresa más alto en las glándulas suprarrenales, músculo esquelético, corazón, testículos y timo; NEU4 se expresa más alto en el cerebro, músculo esquelético, corazón, placenta e hígado (Pshezhetsky and Ashmarina, ibid). En células, NEU1 se localiza en lisosomas y en membranas plasmáticas para participar en exocitosis, respuesta inmunitaria, fagocitosis y ensamblaje de fibra elástica. Como la neuraminidasa 1 (NEU1) escinde los ácidos siálicos terminales de los glucoconjugados, también modula la estructura y actividad de los receptores de superficie celular que afectan a muchas y diversas vías, entre las cuales:

Dridi et al (Positive Regulation of Insulin Signaling by Neuraminidase 1, Diabetes 2013 Jul; 62(7): 2338-2346.) demostraron que NEU1 activa el receptor de insulina. La

señalización de la insulina es un evento clave en la regulación de la homeostasis de glucosa, la cascada de señalización comienza con la unión de la insulina a la cinasa receptora de insulina (IRK) de la superficie celular. El receptor se activa rápidamente, se autofosforila en residuos de tirosina específicos y se internaliza en endosomas. La IRK activada fosforila sustratos, incluido IRS-1 a -4, que se unen a moléculas efectoras tal como fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), dando por resultado su activación (revisado en Taniguchi et al., Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:85-96). Dridi et al muestran que Neu-1 desialila y activa la cinasa receptora de insulina (IRK) a través de la desialilación de las cadenas de glucano unidas a la cadena O- de IRK humana, proporcionando así un mecanismo de retroalimentación para la regulación de la absorción de glucosa. El pretratamiento con el inhibidor de Neu-1 ácido 2,3-deshidro-2-desoxi-N-acetilneuramínico (DANA) redujo significativamente la desialilación de la IRK, lo que confirma que Neu-1 de hecho remueve los residuos de ácido siálico de las cadenas de glucano de la subunidad β del receptor.

La angiogénesis es un proceso estrechamente orquestado en el que se liberan factores proangiogénicos y antiangiogénicos para unirse a sus receptores de superficie de células endoteliales (EC) cognados, como el complejo de receptores de elastina. Las interacciones receptor-ligando proangiogénicas se acoplan a la separación de EC de EC vecinas y la degradación mediada por proteasa de la matriz extracelular (ECM) de EC subyacente y la liberación de péptidos derivados de elastina de la ECM alterada. Estos eventos de señalización y proteolíticos permiten que las EC migren a través de la ECM hacia el estímulo proangiogénico generado a partir de los péptidos derivados de elastina, especialmente aquellos que tienen un motivo XGXXPG. Las señales proliferativas expanden la población de EC, lo que, junto con la remodelación de ECM, conduce a un nuevo acoplamiento de EC-EC con la formación de tubos de tipo capilar. Varios de estos procesos proangiogénicos implican patrones de glucosilación alterados y eventos de reconocimiento específicos mediados por carbohidratos.

La superficie de las células endoteliales está altamente sialilada y cambia en el estado de sialilación, lo que afecta la angiogénesis. La NEU1 humana es la sialidasa más abundante, que se encuentra en el sistema de gel de matriz para inhibir la angiogénesis (Lee et al., Biol Chern. 2014 Mar 28; 289(13):9121-35.). También es la primera sialidasa que se describe como un regulador de angiogénesis (Glanz et al., Eur J Pharmacol. 2019 Jan 5; 842():345-350.). La superficie endotelial vascular altamente sialilada sufre cambios en la sialilación al adoptar el fenotipo migratorio/angiogénico. Cross et al., establecieron la

expresión de superficie celular de células endoteliales (EC) de sialidasa NEU1 (2012; EUI and NEU3 sialidase activity expressed in human lung microvascular endothelia. NEU1 restrains endothelial cell migration whereas NEU3 does not. J. Biol. Chem. 287, 15966-15980). Se encontró además que NEU1 regula la formación de tubos de tipo capilar de EC en un sustrato de Matrigel en EC microvasculares pulmonares humanas (HPMEC). El silenciamiento previo de NEU1 no alteró la formación del tubo, lo que indica que en un estado de reposo Neu-1 no se implica.

La aterosclerosis inducida por elastina depende de la actividad de la sialidasa y del complejo EBP-Catepsina A-Neu-1 receptor de elastina (ERC). Por lo tanto, la elastina se puede usar como un potenciador de la aterosclerosis (Glanz et al., Eur J Pharmacol. 2019 Jan 5; 842():345-350.). El complejo receptor de elastina también es esencial para la capacidad de los fibroblastos para responder a la degradación de la elastina. La combinación de péptidos derivados de elastina y el complejo de receptor de elastina activa la cascada de señalización intracelular, que incluye la activación de proteínas cinasas reguladas extracelulares (ERK) 1/2 y la producción de pro-MMP-1 (Parker and Kohler, ACS Chem Biol. 2010 Jan 15; 5(1):35-46.). El contenido de ácido siálico en el glucocálix endotelial juega un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis y la regulación de la adhesión de leucocitos y plaquetas, transducción mecánica y absorción de células endoteliales de lipoproteína de baja densidad (Frontiers of Pharmacology 2020; 11: 590614).

Ejemplo 4

Como medir la resistencia a la insulina in vitro es una hazaña engorrosa, se valoró el efecto de tres péptidos de fragmento de elastina y péptidos GXXP relacionados en el brote de células endoteliales. Las células endoteliales (Hpmec, n=4) se privaron de suero durante 24 horas, se tripsinizaron y se sembraron en Matrigel reducido en factor de crecimiento. Las células se trataron con vehículo o concentración creciente de péptido y se adquirieron imágenes digitales después de 4 h de incubación con una segunda evaluación 24 h después de la incubación. La germinación por medio de la longitud media total de tubo y la longitud media total de rama por campo de visión se cuantificaron con el software ImageJ.

Métodos

Cultivo de células

Las células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (Hpmec) se

cultivaron en medio EBM-2 (Lonza, CC-3156) complementado con FBS al 10 % y todos los componentes presentes en el kit Bullet (Lonza, CC-4147) que contiene FGF-B recombinante humano, VEGF recombinante humano, R3-IGF-1 recombinante humano, ácido ascórbico, EGF recombinante humano y GA-1000 (sulfato de gentamicina-anfotericina). 24 horas antes del ensayo, HpmeC se privaron de alimento en medio EBM-2 que contiene 0,5 % de FBS en lugar de 10 % de FBS. Para la introducción en el ensayo de angiogénesis, las células endoteliales se lavaron 2 veces con PBS caliente, se tripsinizaron y se resuspendieron en medio EBM-2 libre de suero.

Ensayo de angiogénesis

Matrigel (Fisher Scientific, Landsmeer, Países Bajos #11523550) se diluyó 1:1 en medio EBM-2 libre de suero y se colocó en placas en una placa de 96 pozos (50 μ L). Después de la polimerización, las células se combinaron con los compuestos experimentales y se agregaron en la parte superior del Matrigel (100 μ L). Las imágenes de la red microvascular se tomaron después de 4 y 24 horas de incubación con un objetivo de 4x.

Análisis

Las imágenes se analizaron usando el analizador de angiogénesis enchufable en ImageJ. Para los análisis, se prueba la longitud total de tubo y longitud total de rama de los péptidos 3, 6 y 8; estos son fragmentos de péptido de GXXP 18-méricos (VGVPAGVGVPAGVGVPAG, QVGQVELGGGPGAGSLQP y GAYPGAPGAYPGAPAGV) tomados de la región de exón 24 de elastina humana, de la porción media de péptido C humano y de la porción N-terminal de galectina-3, respectivamente.

Resultados y análisis

Ver figura 4. Ensayo de angiogénesis microvascular de células endoteliales microvasculares pulmonares humanas cultivadas en Matrigel y en respuesta a concentraciones crecientes de péptidos de fragmentos de elastina 3, 6 y 8, (figuras 4a, 4b y 4c, respectivamente). Los datos mostrados son mediciones de longitud de tubo total y mediciones de longitud de rama total a t=24 h. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A 4 h no se obtuvieron resultados distintos. También, como se esperaba, DANA potenció significativamente los efectos angiogénicos del péptido 3, a t=16, 24 y 40 h (P = 0,48, 0,011 y 0,032, respectivamente).

De interés es que para estos péptidos biológicamente activos fue evidente una curva de respuesta de concentración bifásica, con un efecto máximo usualmente obtenido alrededor de 4.000 a 40.000 nM y la mayor concentración de 400.000 nM que es menos efectiva. Los análisis estadísticos respaldan esta conclusión. Tres posibles explicaciones vienen a la mente con tal naturaleza bifásica que son a) desensibilización/internalización del receptor objetivo a concentraciones más altas que conducen a la pérdida de efecto; b) la presencia de un segundo receptor con menor afinidad y efectos funcionalmente opuestos; c) toxicidad del péptido a las concentraciones más altas. La explicación A parece ser la más probable, ya que la naturaleza bifásica fue más fuerte para los péptidos con los efectos funcionales más fuertes. Se esperaría que los efectos de toxicidad estén presentes de manera más ubicua, en tanto que un efecto funcional de un segundo receptor es menos probable en vista de la naturaleza estructuralmente bastante diversa de los péptidos, lo que hace que sea menos probable un efecto fuera del objetivo común.

Na⁺,K⁺-ATPasa es una enzima de membrana ubicua que permite la extrusión de tres iones de sodio de la célula y dos iones de potasio del fluido extracelular. La actividad de Na⁺,K(+)-ATPasa disminuye en las membranas de glóbulos rojos de individuos diabéticos tipo 1, independientemente del grado de control diabético. Es menos deteriorada o incluso normal en pacientes diabéticos tipo 2. Vague et al., (Na⁺,K(+)-ATPase, and diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2004 Jan-Mar;5(1):37-50. doi: 10.1080/1543860049042.4514. PMID: 15198370; PMCID: PMC2478626.) han mostrado que en los glóbulos rojos de pacientes diabéticos tipo 2, la actividad de Na⁺,K(+)-ATPasa estaba fuertemente relacionada con los niveles de péptido C en sangre en pacientes no tratados con insulina (en quienes la concentración de péptido C refleja la de insulina), así como en pacientes tratados con insulina. La infusión de péptido C a corto plazo a pacientes diabéticos tipo 1 restaura la actividad normal de Na⁺,K(+)-ATPasa. El trasplante de islotes, que restaura la secreción endógena de péptido C, mejora la actividad de Na⁺,K(+)-ATPasa proporcionalmente al aumento del péptido C. Este efecto del péptido C no es indirecto. De hecho, la incubación de glóbulos rojos diabéticos con péptido C a concentración fisiológica conduce a un incremento de la actividad de Na⁺,K(+)-ATPasa. En túbulos proximales aislados de ratas o en la extremidad ascendente gruesa medular del riñón, el péptido C estimula de manera dependiente de la dosis la actividad de Na⁺,K(+)-ATPasa.

Ejemplo 5

El péptido C del dominio PG, un producto de escisión de la molécula de proinsulina,

se ha considerado durante mucho tiempo biológicamente inerte, que sirve simplemente como un marcador sustituto para la liberación de insulina. Los descubrimientos recientes demuestran un papel fisiológico y protector del péptido C cuando se administra a individuos con diabetes tipo I. Los datos indican que el péptido C parece unirse en concentraciones nanomolares a un receptor de superficie celular que es más probable que esté acoplado a proteína G. La unión del péptido C inicia múltiples efectos celulares, evocando un aumento en el calcio intracelular, actividad incrementada de PI-3-quinasa, estimulación de la Na⁺/K⁺ ATPasa, transcripción incrementada de eNOS y activación de la vía de señalización de MAPK. Estos efectos de señalización celular se han estudiado en múltiples tipos de células de múltiples tejidos. En general, estas observaciones plantean la posibilidad de que el péptido C pueda servir como un agente terapéutico potencial para el tratamiento o prevención de complicaciones a largo plazo asociadas con la diabetes. Claramente, si el péptido C del dominio PG tiene acciones similares a las hormonas peptídicas, es necesario postular la existencia de un receptor. De hecho, la unión específica y desplazable del péptido C etiquetado con ¹²⁵I se demostró por primera vez por Flatt et al. 42 (*Biosci Rep.* 1986 Feb; 6(2):193-9.) que derivó un gráfico de Scatchard curvilíneo de la unión específica del péptido C a las células β de los islotes pancreáticos.

Posteriormente, usando secuencia retro y enantiómeros de péptido C de todo D-aminoácido, Ido et al. (*Science.* 1997 Jul 25; 277(5325): 563-6.) sugirieron que las mejoras inducidas por el péptido C en la función nerviosa y el flujo sanguíneo de permeabilidad vascular en la diabetes a través de incrementos en la actividad de Na⁺,K⁺-ATPasa no resultaron de la unión del péptido C de una manera estereoespecífica a un receptor. En cambio, se planteó la hipótesis de que la actividad biológica del péptido C dependía de interacciones de membrana mal definidas que tuvieron lugar debido a características estructurales relacionadas con la secuencia de péptido C, pero independientes de su dirección o quiralidad. En esta actividad se implicó una secuencia de porción media de péptido C, en gran medida conservada y que comprende una alta proporción de aminoácidos no polares que flanquean una prolina C16.

Otros investigadores también han examinado la bioactividad del fragmento de péptido C usando actividad de Na⁺,K⁺-ATPasa en segmentos tubulares renales de rata como una lectura (*Diabetologia.* 1998 Mar; 41(3):287-91.) Dos segmentos de péptido C demostraron importancia funcional. El pentapéptido carboxi terminal de péptido C de rata, EVARQ, provocó 100 % de la actividad del péptido C intacto, en tanto que la porción restante de la molécula, que carecía de la secuencia terminal de 5 aminoácidos, estaba

totalmente inactiva. En este sistema de rata, el pentapéptido terminal del péptido C humano (EGSLQ) provocó 75 % de actividad; y notablemente el ácido glutámico en la posición 1 y la glutamina en la posición 5 se conservan en general en mamíferos. Secuencias funcionales C-terminales bien definidas similares también se encuentran en gastrina y colecistoquinina. En general, el comportamiento del pentapéptido C-terminal en estos estudios fue habitual de un ligando peptídico que interactúa con un receptor específico. Por el contrario, varias secuencias de región media de péptido C fueron capaces de recapitular parcialmente la actividad de la molécula intacta, pero exhibieron propiedades bastante diferentes. La actividad relacionada con esta región no se observó con el péptido des-(27-31)-C, y varias secuencias que contienen D-aminoácidos no naturales mostraron cierta actividad. La actividad de estos segmentos disminuyó si eran mayores de 9 aminoácidos de longitud. Se pensó anteriormente que este comportamiento no recordaba las interacciones péptido-receptor, sino que era similar a las interacciones de tipo no específico del péptido C con las membranas plasmáticas postuladas por Ido et al. (ibid).

Actualmente no se entiende bien cómo se manifiesta el equilibrio de actividad proporcionado por estas dos regiones de dominio de la molécula de péptido C in vivo. Un trabajo muy reciente sugiere que la activación eficiente de las vías de señalización requiere la presencia de residuos de ácido glutámico conservados en las posiciones 3, 11 y 27 del péptido C, y la presencia de residuos que promueven la hélice en el segmento N-terminal (*Henriksson et al., Cell Mol Life Sci. 2005 Aug; 62(15):1772-8*). Tomado junto con los datos aquí no revisados relacionados con su extremo N-terminal, la imagen general que ahora emerge de la relación estructura-actividad de la molécula de péptido C es una de una estructura tripartita donde las secciones terminales se implican en interacciones funcionales, con la región media del dominio PG formando un segmento de unión a ERC.

La invención proporciona con la presente el uso de una clase distinta y recientemente emergente de fármacos: moduladores peptídicos de mTOR que actúan como compuestos inhibidores de autofagia para usarse en la inducción de las actividades requeridas para establecer el control glucémico para combatir el hiperinsulinismo, que incluso ocurren en aquellos pacientes que de otro modo están bajo control glucémico adecuado. Cuando se inhibe la autofagia y con ello se activa mTOR después del consumo de aminoácidos por parte de células de grasa o musculares derivadas de estos moduladores de péptidos proporcionados en la presente, la simulación sostenida de S6K1 en la dirección 3' incrementa la fosforilación de IRS1 Ser307. Esto disminuye su actividad y capacidad de respuesta a la insulina, haciendo que la grasa o las células musculares sean resistentes a

la insulina. De manera similar, cuando las células endoteliales tal como las células beta de las células endoteliales vasculares se tratan con estos moduladores peptídicos de mTOR como se proporciona en la presente, la simulación sostenida de S6K1 en la dirección 3' incrementa la fosforilación de IRS1 Ser307 induce la proliferación celular. Esta proliferación se puede medir experimentalmente, por ejemplo, al detectar la actividad de Ki-67 en esas células. Se proporciona un modulador de péptido inhibidor de autofagia de mTOR para usarse en la inducción de glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). Para dirigir estoss moduladores de péptido a las células, los péptidos se pueden proporcionar con un motivo xGxxPG como se analizó anteriormente. En una realización preferida, se proporciona un modulador inhibidor de autofagia de mTOR para usarse en la inducción de glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P). En una realización preferida, se proporciona un modulador inhibidor de autofagia de mTOR para usarse en la inducción de glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L). En una realización preferida, se proporciona un modulador inhibidor de autofagia de mTOR para usarse en la inducción de glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más

preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). En una realización preferida, se proporciona un modulador inhibidor de autofagia de mTOR para usarse en la inducción de glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). En una realización preferida, se proporciona un modulador inhibidor de autofagia de mTOR para usarse en la inducción de glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), leucina (L) y prolina (P). En una realización preferida, se proporciona un modulador inhibidor de autofagia de mTOR para usarse en la inducción de glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). En particular, se prefiere que este modulador de péptido inhibidor de autofagia de mTOR de acuerdo con la invención se use cuando este sujeto también se trata para lograr o mantener el control glucémico, especialmente cuando este sujeto también se trata con una insulina para lograr o mantener el control glucémico. Se proporciona un método para identificar una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, preferentemente un péptido, capaz de inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células un péptido que comprende aminoácidos L-proteinogénicos, estos aminoácidos para menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N), y determinar la actividad angiogénica en un ensayo de brotación. La actividad angiogénica se puede determinar al valorar la formación de tubo capilar, así como al valorar la formación de rama

capilar, como se proporciona en la presente. Se prefiere que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de leucina (en código de una letra: L), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). La invención también proporciona un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, estos aminoácidos para al menos 50 %, más preferentemente para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más

preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N).). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de leucina (en código de una letra: L), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). La invención también proporciona un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, estos aminoácidos para al menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N), más preferentemente para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra:

A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de leucina (en código de una letra: L), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). La invención también proporciona un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, estos aminoácidos para al menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P).

Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de leucina (en código de una letra: L), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). La invención también proporciona un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, estos aminoácidos para al menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). La invención también proporciona un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células un péptido como una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, este péptido que consiste en aminoácidos que son para al menos 50 %, más preferentemente para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para

al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de leucina (en código de una letra: L), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). La invención también proporciona un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, estos aminoácidos para al menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más

preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de leucina (en código de una letra: L), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). Se prefiere más que estos aminoácidos se seleccionen para al menos 60 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). La invención también proporciona un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, estos aminoácidos para al menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). La invención también proporciona un método de tratamiento de acuerdo con la invención, en donde esta fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, preferentemente un péptido, es identificable con un método como se proporciona en la presente. La invención en particular proporciona un método de tratamiento de acuerdo con la invención en donde la fuente o péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de un péptido o proteína que se muestra o se sospecha que tiene actividades. Frecuentemente, en el proteoma de un organismo, estas secuencias angiogénicas en proteínas se ubican cerca de o entre más residuos de arginina (R) o lisina (K) ubicados en el extremo N-terminal y extremo C-terminal, lo que permite que enzimas tal como convertasas corten esta secuencia de aminoácidos capaz de inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto de tal forma que se pueda usar como un modulador de péptido

inhibidor de autofagia de mTOR. Se prefiere correlacionar el uso de péptidos con la especie de células en las que se usa. Por ejemplo, se prefiere que si los péptidos se usan en células humanas como un modulador de péptido inhibidor de autofagia de mTOR, estos péptidos se deriven del proteoma humano. Del mismo modo, en células de otra especie, tal como la especie X, se prefiere usar péptido que se deriva del proteoma de especie X. En una realización preferida, se proporciona este péptido inhibidor de autofagia que tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de una gonadotropina coriónica (CG), una proteína implicada en actividades en embarazos, preferentemente este péptido se deriva de una cadena beta de CG, preferentemente de un bucle 2 de esta cadena beta. CG humana (hCG) tiene una secuencia de aminoácidos capaz de inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto MTRVLQGVLPALPQVVCNRYR en donde la secuencia central se ubica entre residuos de arginina (R) ubicados en el extremo N-terminal y extremo C-terminal. Además, este núcleo comprende un motivo de unión a ERC xGxxPx. La división de este motivo facilita el uso de derivados de hCG LQGV, VLPALP AQGV, LAGV, LQAV, LQGA, ALPALP, VAPALP, VLAALP, VLPAAP y VLPALA como moduladores de péptidos inhibidores de autofagia en combinación con preparaciones de insulina de acción rápida y corta, en particular para ejercer tanto inducción glucémica como control glucémico. El péptido VLQGVLPALPQVV, por ejemplo, encuentra un mejor uso en combinación con preparaciones de insulina de acción intermedia y prolongada donde se libera más lentamente y más en línea con las velocidades de liberación de las insulinas. En otra realización preferida, se proporciona este péptido inhibidor de autofagia en donde este péptido tiene una secuencia de aminoácidos capaz de inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto que se deriva de un péptido C. En la molécula de pre-pro-insulina, el péptido C humano tiene la secuencia RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR, de hecho, la secuencia central se flanquea por residuos de arginina (R) o lisina (K). Además, este núcleo comprende un motivo de unión a ERC xGxxPG. Como los motivos de unión a ERC se implican en la coacervación a través de la oligomerización de péptidos que tienen estas secuencias, estos péptidos inhibidores de autofagia que tienen un motivo de unión a ERG habitualmente tienen una velocidad de liberación más lenta cuando se inyectan y habitualmente son más útiles y preferidos en circunstancias en donde se desea esta liberación lenta, tal como en formulaciones de combinación con insulinas de acción intermedia o, más preferentemente, de acción prolongada. La coacervación habitualmente implica la agregación de gotas coloidales de los péptidos mantenidos juntos por fuerzas de atracción electrostáticas, que

explica la naturaleza de liberación lenta de este motivo de ERC que comprende péptidos cuando se inyecta, al menos en comparación con péptidos sin motivo de ERC y que no muestran coacervación, que habitualmente tienen características de liberación más rápida. Los péptidos de fragmento de péptido C preferidos para usarse como modulador de péptido inhibidor de autofagia de mTOR en el tratamiento de la disfunción angiogénica, en particular en circunstancias de deficiencia de péptido C, son preferentemente aislados y/o sintéticos, preferentemente no pegilados, fragmentos de péptido C EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPL, DLQVGQVELGGGPGAGSLQP, LVGQVELGGGPGAGSLQPL, QVGQVELGGGPGAGSLQPL, ELGGGPGAGSLQPL, DLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, GQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, y LGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, LVGQVELGGGPGAGSLQPL, LGGGPGAGSLQPL y LQVGQVELGGGPG, y equivalentes funcionales que comprenden un motivo xGxxPG son, por lo tanto, los más adecuados y preferidos para inclusión en combinación con una insulina de acción intermedia o larga. Por lo tanto, LQVGQVELGG y/o GGGPGAGSLQPL y equivalentes funcionales que no comprenden un motivo xGxxPG son los más adecuados y preferidos para inclusión en o combinación con una insulina de acción rápida o corta.

En otra realización preferida, se proporciona este péptido inhibidor de autofagia en donde este péptido tiene una secuencia de aminoácidos capaz de inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto que se deriva de una galectina-3. El fragmento N-terminal maduro de galectina-3 humana PQGWPGAWGNQPAGAGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAP APGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPATGPYGPAGPLIVPYNLPLPGGVVPRM, se caracteriza habitualmente por múltiples motivos de unión a ERC xGxxPG, las secuencias centrales también se liberan por hidrólisis. Habitualmente (Pineda et al., *Trypanosoma cruzi cleaves galectin-3 N-terminal domain to suppress its innate microbicidal activity*. Clin Exp Immunol. 2020 Feb;199(2):216-229.), el patógeno humano *T. cruzi* no solo se une, sino que también hidroliza la galectina-3 N-terminal humana. De manera notable, este mecanismo previene la muerte del parásito mediada por galectina-3, que sugiere que *T. cruzi* puede haber desarrollado estrategias complejas para modular las funciones de galectina-3 para infectar, sobrevivir y prosperar con éxito dentro de sus huéspedes mamíferos. De hecho, *T. rangeli* no patógeno se une a galectina-3 pero no modifica la estructura de la proteína. Por lo tanto, *T. cruzi* escinde el dominio tipo colágeno N-terminal, lo que hace que la galectina-3 C-terminal no pueda oligomerizarse mediante coacervación y permite que los fragmentos N-terminales con motivo xGxxPG interactúen con el ERC y modulen mTOR para el bien del

parásito. Específicamente, las secuencias N-terminales de 3 fragmentos obtenidos a través de hidrolisis de parásitos fueron: banda 1: AGGYPGASYPG, banda 2: GAPGAYPGAP y banda 3: GAPAGPLIVP, que indica las características moduladoras de mTOR de los fragmentos peptídicos N-terminales de galectina-3 derivados de AGGYPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYP, GAPGAYPGAPAPGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPATGPY y GAPAGPLIVPYNLPLPGGVVP en hombre. Por ejemplo, los fragmentos GAYPGAPGAYPGAPAPGV y PGAYPG tienen actividades centrales, como se demuestra en la presente, lo que hace que PGAYPGQAPPGAYPG, PGAYPGQA y GQAPPGAYPG también sean péptidos inhibidores de autofagia útiles para usarse en el hombre, en particular cuando se incluyen en o con insulinas de acción intermedia o prolongada. La invención también proporciona un método de tratamiento y uso en el mismo de acuerdo con la invención en donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de una lutropina (LH), una proteína frecuentemente implicada mensualmente en actividades en mujeres, preferentemente el péptido se deriva de una cadena beta de LH, preferentemente de un bucle 2 de la cadena beta. Beta-2-bucle de LH humana (hLH) tiene una secuencia de aminoácidos capaz de inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto MMRVLQAVLPPLPQVVCTYR en donde la secuencia central se ubica entre residuos de arginina (R) ubicados en el extremo N-terminal y extremo C-terminal. Además, este núcleo no comprende un motivo de unión a ERC xGxxPx, lo que facilita el uso de secuencias derivadas de LH, tal como VLQAVLPPLPQVV, VLQAVLP, VLQA, LQAVLP, LQAV, PLPQVV y PPLQV, y derivados adicionales como modulador de mTOR en formulaciones de insulina de acción rápida y corta. La invención también proporciona un método de tratamiento y uso en el mismo de acuerdo con la invención en donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de una proteína de matriz extracelular (ECM). Las proteínas ECM comprenden una fuente abundante de aminoácidos inhibidores de autofagia y son útiles como moldes para el diseño de péptidos inhibidores de autofagia. La prolina como sustrato se almacena en elastina y colágeno en la matriz extracelular, tejido conectivo y hueso y se libera rápidamente de este depósito por la acción secuencial de metaloproteinasas de matriz, peptidasas, elastasas y prolidasa. Como el único aminoácido secundario proteinogénico, la prolina tiene efectos biológicos especiales, sirve como un regulador de todas las interacciones proteína-proteína y respuestas al estrés metabólico, e inicia una variedad de actividades metabólicas posteriores, incluida la autofagia (Kadowaki et al. Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. Mol Aspects Med. 2006 Oct-Dec;27(5-6):426-43). La invención también

proporciona un método de tratamiento y uso en el mismo de acuerdo con la invención en donde la proteína de matriz extracelular es una elastina. Se han demostrado actividades de núcleo habituales con los péptidos VGVAPG y VGVAPGVGVAPGVGVAPG en la presente, ambos derivados de la región de exón 24 de elastina humana. La invención también proporciona un método de tratamiento y uso en el mismo de acuerdo con la invención en donde la proteína de matriz extracelular es un colágeno, el colágeno está lleno de secuencias de PGP que pueden ser útiles. Habitual para algunos colágenos (aquí se muestran ejemplos de COL6A5 humano) que comprenden péptidos centrales flanqueados por R o K, tal como RRAQGV PQIAVLVTHR, que identifican la secuencia central AQGV PQIAVLV y derivados tal como AQGV PQ, AQGV PQI, AQGV PQIA, GVPQIAVLV, PQIAVLV, IAVLV y otros. Se pueden encontrar más de estas secuencias en tramos de colágeno tal como (en COL6A5 humano) RGAPGQYGEKGFPGDPGNPGQNNNIKGQKGSKEQGRQGRSGQLGVQGSPSSRGSRGREGQRGLRGVSGEPGNPGPTGTLGAEGLQGPGQSQGNPGRKGEKGSQGQKGPQGS PGLMGA KGSTGRPGLLGKKGEPGLPGDLGPVGQTGQRGRQGDSGIPGYGQMGRKGV KGPRGFPGDAGQK, que se encuentra que demuestran apariciones repetidas de secuencias peptídicas centrales flanqueadas por repeticiones R o K y a partir de las cuales se pueden seleccionar moduladores peptídicos deseables de mTOR. Otra proteína angiogénica de la cual se proporciona un péptido en la presente es alfa-fetoproteína humana en donde se observa un péptido con secuencia KDLCQAQGVALQTMK, que comprende un núcleo antigénico QAQGVALQ, y se encuentran derivados AQGV, AQGVA, AQGVAL, QGVALQ y GVALQ, todos útiles como modulador de péptido inhibidor de autofagia de mTOR, preferentemente en combinación con insulinas de acción rápida o corta. Habitualmente, la inhibición de la autofagia por el modulador de dipéptido de mTOR AQ se ha demostrado recientemente en lechones, que tienen características de modulación mejoradas sobre los aminoácidos A + Q (Zhang et al., Alanyl-glutamine supplementation regulates mTOR and ubiquitin proteasome proteolysis signaling pathways in piglets. Nutrition. 2016 Oct;32(10):1123-31.).

Por otro lado, se proporciona una formulación de factor de crecimiento (las formulaciones en la presente comprenden preferentemente formulaciones farmacéuticas o composiciones farmacéuticas), tal como una formulación de insulina, una formulación de IGF, una formulación de PDGF, una formulación de VEGF o una formulación de otro factor de crecimiento útil en el tratamiento de enfermedad vascular, en particular útil en el control glucémico, que se ha proporcionado con un modulador peptídico inhibidor de autofagia de

mTOR para los fines del control glucémico, como se proporciona en la presente. Se proporciona una formulación de un factor de crecimiento y un modulador inhibidor de autofagia de mTOR, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para al menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), arginina (R) y asparagina (N). En una realización preferida, se proporciona una formulación de insulina con un modulador inhibidor de autofagia de mTOR, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para al menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P). En una realización preferida, se proporciona una formulación de insulina con un modulador inhibidor de autofagia de mTOR, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para al menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L). En una realización preferida, se proporciona una formulación de insulina con un modulador inhibidor de autofagia de mTOR, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para al menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y valina (V). En una realización preferida, se proporciona una formulación de insulina con un modulador inhibidor de autofagia de mTOR, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para al menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G) y leucina (L). En una realización preferida, se proporciona una formulación de insulina con un modulador inhibidor de autofagia de mTOR, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos,

preferentemente un péptido, estos aminoácidos para al menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), leucina (L) y prolina (P). En una realización preferida, se proporciona una formulación de insulina con un modulador inhibidor de autofagia de mTOR, el modulador que comprende una fuente de aminoácidos, preferentemente un péptido, estos aminoácidos para al menos 50 %, preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 % seleccionado del grupo de alanina (en código de una letra: A), valina (V), leucina (L) y prolina (P). Estos moduladores peptídicos inhibidores de autofagia de mTOR y uso de los mismos en formulaciones de factor de crecimiento, como se proporciona en la presente, habitualmente comprenden péptidos y/o fuentes de aminoácidos que se dirigen al nutriente, en particular el sistema de detección de aminoácidos del objetivo mecanístico de rapamicina, mTOR, inhiben autofagia, y con esto inducen actividades en un paciente en necesidad del mismo. Habitualmente, en el caso del control glucémico a través del uso de formulaciones de insulina, los requerimientos de insulina (unidades/kg/día) se determinan con base en la edad, peso y actividad de insulina pancreática residual del paciente. Los pacientes habitualmente requerirán una dosis diaria total de insulina de 0,4 -1,0 unidades/kg/día y la dosis inicial habitual en pacientes metabólicamente estables es de 0,5 unidades/kg/día. Sin embargo, como se dijo, el control glucémico, incluso con insulina, no es un sustituto para la deficiencia de péptido C.

De forma habitual, en la presente se define que los péptidos tienen 50 o menos aminoácidos, para el propósito de esta divulgación, se define que las proteínas tienen >50 aminoácidos. Un modulador de péptido inhibidor de autofagia de mTOR en la presente se define como una cadena lineal, ramificada o circular de no más de 50 aminoácidos que comprende una secuencia de péptido con al menos 50 %, más preferentemente al menos 75 %, más preferentemente 100 % de aminoácidos seleccionados del grupo de aminoácidos inhibidores de autofagia alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), prolina (P), isoleucina (I), arginina (R) y asparagina (N). El modo de acción molecular (MoA) de este grupo de péptidos no depende de su secuencia exacta. En cambio, sus aminoácidos constituyentes proporcionan señales de inhibición de autofagia al sistema de detección de nutrientes de mTOR; lo que conduce a la inhibición de la autofagia y da por resultado la proteogénesis con resolución de enfermedad.

Como se revisó en Sciarretta et al (New Insights into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2018 Feb 2;122(3):489-505) la diana mecanicista (anteriormente llamada de mamífero) de rapamicina (mTOR) es una serina/treonina cinasa atípica, que pertenece a la familia de cinasas relacionadas con fosfoinosítido cinasa (PIKK). Es una proteína evolutivamente conservada que juega un papel central en la regulación de la fisiología celular, el metabolismo y las respuestas al estrés. Algunos la llaman el interruptor maestro celular. mTOR interactúa con proteínas adaptadoras específicas y forma dos complejos macromoleculares distintos, llamados complejo mTOR 1 (mTORC1) y complejo mTOR 2 (mTORC2). El paradigma anterior en biología de mTOR incluía la participación de mTOR en la regulación de la síntesis de proteínas, crecimiento celular y biogénesis ribosómica, y la detección e integración de diferentes entradas corriente arriba, como factores de crecimiento, nutrientes, aminoácidos, inanición e hipoxia. Sin embargo, ahora se sabe que la vía mTOR también controla otros procesos celulares importantes, que incluyen supervivencia celular, biogénesis y función mitocondrial, síntesis de lípidos y autofagia. La red de señalización de mTORC2 está menos caracterizada que la de mTORC1. Algunos estudios han sugerido que las actividades de mTORC1 y mTORC2 están fuertemente interconectadas, con mTORC2 que es menos sensible al tratamiento agudo con rapamicina que mTORC1. El trabajo anterior también indicó que mTORC2 se implica en la regulación de la supervivencia, crecimiento y proliferación celular, y controla la arquitectura y polaridad celular. Por lo general, los aminoácidos no solo son los componentes básicos de la proteína, sino que también son moléculas de señalización, así como reguladores de la expresión génica, procesos metabólicos y cambios de desarrollo en el cuerpo, con funciones cruciales de los aminoácidos y sus metabolitos en la salud y la enfermedad. La evidencia sustancial indica que los aminoácidos juegan un papel fundamental en el sistema vascular. En tanto que los aminoácidos sirven como bloques de construcción básicos para la síntesis de proteínas y constituyen una fuente de energía importante, se ha estudiado ampliamente un grupo selecto en el contexto de la enfermedad vascular. mTOR, en particular mTORC1, es una cinasa crítica que regula el crecimiento y la proliferación celular, al detectar nutrientes como aminoácidos y glucosa. La alanina y glutamina son los aminoácidos más abundantes que circulan en la sangre. Los aminoácidos no solo participan en el metabolismo intermedio, sino que también estimulan la diana mecanicista de la insulina de la transducción de señales mediada por rapamicina (mTOR) que controla las principales vías metabólicas. Entre estos se encuentra la vía de autofagia que se encarga de la degradación de proteínas de larga vida y de la eliminación de orgánulos dañados o funcionalmente redundantes. El funcionamiento adecuado de este

proceso es esencial para la supervivencia celular. La desregulación de la autofagia se ha implicado en la etiología de varias patologías. Claramente, solo ciertos aminoácidos son capaces de modular la autofagia, y sus funciones son altamente específicas de la célula.

Los descubrimiento de *Plasmodium* identifican el motivo VGVAPG(n) instrumental en la generación de resistencia a la insulina en primates, entre los cuales los humanos.

Como se analizó por Eze et al. (Asymptomatic *Plasmodium* infection and glycemic control in adults: Results from a population-based survey in south-central Côte d'Ivoire, Diabetes Research and Clinical Practice, Volume 156, 2019,107845), las respuestas inflamatorias a infecciones repetidas con parásitos de malaria (especies de *Plasmodium*) pueden conducir a cambios fisiológicos sostenidos en sensibilidad a la insulina que incrementan la susceptibilidad de diabetes. La infección por *Plasmodium* (PI) induce vías inflamatorias sistémicas que también son características de la diabetes tipo 2. Los marcadores sanguíneos proinflamatorios tal como la proteína C reactiva circulante, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 se asociaron tanto con la severidad de malaria como con la resistencia a la insulina. La IL-6 fue mayor en adultos de un entorno endémico de malaria que en sus contrapartes occidentales ajustadas por edad. Se cree que la malaria en el útero dirige las vías fisiológicas fetales hacia la resistencia a la insulina y el deterioro de la glucosa en ayunas (FG) en la adolescencia.

Abidha, C.A., Amoako, Y.A., Nyamekye, R.K. *et al.* (Fasting blood glucose in a Ghanaian adult is causally affected by malaria parasite load: a mechanistic case study using convergent cross mapping. *Malar J* 21, 93 (2022)), ejecutaron un estudio destinado a verificar la hipótesis de que la glucosa incrementada en sangre en ayunas (FG) promueve el crecimiento del parásito como se refleja en la densidad incrementada del parásito. Sin embargo, se encontró el recíproco. Se reclutaron siete adultos sin DIV en zonas rurales de Ghana para determinar las relaciones entre FG y la carga de parásitos de malaria. Los datos socioeconómicos se registraron en entrevistas basadas en cuestionarios. Durante un período de 6 semanas, se midieron la infección por FG y *Plasmodium* sp. en muestras de sangre periférica fotométricamente y por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), respectivamente. La actividad física diaria y los datos meteorológicos se documentaron mediante grabación de teléfonos inteligentes. Para los sistemas naturales complejos de control de glucosa homeostático y ciclo de vida de *Plasmodium* sp., se aplicó modelado dinámico empírico. Al inicio del estudio, cuatro hombres y tres mujeres (mediana de edad, 33 años; intervalo intercuartílico, 30-48) mostraron una mediana de FG de 5,5

(5,1-6,0 mmol/L): un participante tuvo una infección asintomática por *Plasmodium* sp. (densidad del parásito: 240/μl). En este participante, el mapeo cruzado convergente (CCM) durante 34 días consecutivos, mostró que FG (y, por lo tanto, resistencia a la insulina) se vio afectado causalmente por la densidad del parásito ($p < 0,02$), en tanto que la relación recíproca no fue discernible ($p > 0,05$).

Más allá de las realizaciones anteriores, se divulgan aquí realizaciones adicionales a continuación.

Realización adicional 1.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia que comprende tratar a este sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un péptido de dominio PG con motivo XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido.

Realización adicional 2.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia que comprende tratar a este sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de activación de Na⁺ K⁺ ATPasa que es al menos funcionalmente equivalente a un péptido de dominio de pentapéptido con motivo EXXXQ en donde E representa el aminoácido glutamato, G glutamina y X cualquier aminoácido.

Realización adicional 3.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia que comprende tratar a este sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un péptido de dominio PG con motivo XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido y además se proporciona con una molécula que porta un motivo de activación de Na⁺ K⁺ ATP-asa que es al menos funcionalmente equivalente al motivo de dominio de pentapéptido EXXXQ en donde E representa el aminoácido glutamato, G glutamina y X cualquier aminoácido.

Realización adicional 4.

Un método de acuerdo con realizaciones adicionales 1 o 3 en donde la molécula comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo XGXXPG, xGXXPG, xGxXPG, xGXxPG y xGxxPG.

Realización adicional 5.

Un método de acuerdo con la realización adicional 4 en donde la molécula comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo de péptidos al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de un motivo peptídico VGVAPG, vGVAPG, vGvAPG, vGVaPG, vGvaPG, LGGGPG, IGGGPG, PGAYPG, pGAYPG, pGaYPG, pGAyPG o pGayPG, AQGVAPG(n), gpavgqa(n), LQGVAPG(n), gpavgql(n),.

Realización adicional 6.

Un método de acuerdo con la realización adicional 5 en donde el péptido se selecciona del grupo VGVAPGVGVAPGVGVAPG, QVGQVELGGGPGAGSLQP y GAYPGAPGAYPGAPAPGV o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 7.

Un método de acuerdo con realizaciones adicionales 1 o 3 en donde la molécula comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo gpxxgx, gpxxgX, gpXxgX, gpXxgX y gpXXgX.

Realización adicional 8.

Un método de acuerdo con la realización adicional 7 en donde la molécula comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de un motivo peptídico gpavgv, gpavgV, gpaVgV, gpAvgV, gpAVgV, gpgggl, gpgggL, gpyagp, gpaygP, gpaYgP, gpAygP o gpAYgP.

Realización adicional 9.

Un método de acuerdo con la realización adicional 8 en donde el péptido se selecciona del grupo gpavgvgpavgvgpavgv, pqlsgagpggglevqgvq, vgpapagpyagpagpyay o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 10.

Un método de acuerdo con realizaciones adicionales 2 o 3 en donde la molécula comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo EXXXQ, ExXXQ, EXxXQ, EXXxQ, ExxXQ, EXxxQ, ExXxQ y ExxxQ.

Realización adicional 11.

Un método de acuerdo con la realización adicional 10 en donde el péptido se selecciona del grupo EGSLQ, EVPPQ, EGALQ, EGPLQ, EVAQQ, EGPPQ, EAPLQ, EMALQ, EVARQ o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 12.

Un método de acuerdo con realizaciones adicionales 2 o 3 en donde la molécula comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo qxxxe, qxxXe, qxXxe, qXxxe, qxXXq, qXXxe, qXxXe y qXXXe.

Realización adicional 13.

Un método de acuerdo con la realización adicional 12 en donde el péptido se selecciona del grupo qlsge, qppve, qlage, qlpge, qqave, qppge, qlpae, qlame, qgrave o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 14.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 4 a 13 en donde el péptido se proporciona con resistencia mejorada a la degradación proteolítica al proporcionar cada uno de los flancos N- y C-terminales del péptido con hasta tres D-aminoácidos.

Realización adicional 15.

Un método de acuerdo con la realización adicional 14 en donde el péptido se selecciona de la síntesis.

Realización adicional 16.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 1 a 15 en donde la hiperinsulinemia es hiperinsulinemia endógena.

Realización adicional 17.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 1 a 16 en donde la hiperinsulinemia comprende hiperinsulinemia congénita.

Realización adicional 18.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 1 a 17 en donde el tratamiento comprende modular la polarización de membrana de células beta.

Realización adicional 19.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 1 a 18 en donde el tratamiento comprende modular la actividad de $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$.

Realización adicional 20.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 1 a 19 en donde el tratamiento comprende modular la secreción de insulina.

Realización adicional 21.

Una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico de dominio PG XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido para usarse en el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia.

Realización adicional 22.

Una molécula que porta un motivo de activación de $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico de dominio de pentapéptido EXXXQ en donde E representa el aminoácido glutamato, G glutamina y X cualquier aminoácido para usarse en el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia.

Realización adicional 23.

Una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico de dominio PG XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido y que porta un motivo de activación de $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$ que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo

peptídico de dominio de pentapéptido EXXXQ en donde E representa el aminoácido glutamato, G glutamina y X cualquier aminoácido para usarse en el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia.

Realización adicional 24.

Una molécula de acuerdo con realizaciones adicionales 21 y 23 en donde la molécula es un péptido con un motivo seleccionado del grupo XGXXPG, xGXXPG, xGxXPG, xGXxPG y xGxxPG.

Realización adicional 25.

Una molécula de acuerdo con la realización adicional 24 en donde la molécula es un péptido con un motivo seleccionado del grupo al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de un motivo peptídico VGVAPG, vGVAPG, vGvAPG, vGVaPG, vGvaPG, LGGGPG, IGGGPG, PGAYPG, pGAYPG, pGaYPG, pGAyPG o pGayPG.

Realización adicional 26.

Una molécula de acuerdo con la realización adicional 24 en donde el péptido se selecciona del grupo VGVAPGVGVAPGVGVAPG, QVGQVELGGGPGAGSLQP y GAYPGAPGAYPGAPAPGV o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 27.

Una molécula de acuerdo con realizaciones adicionales 21 y 23 en donde la molécula es un péptido con un motivo seleccionado del grupo gpxxgx, gpxxgX, gpXxgX, gpXxgX y gpXXgX.

Realización adicional 28.

Una molécula de acuerdo con la realización adicional 27 en donde la molécula es un péptido con un motivo seleccionado del grupo al menos funcionalmente equivalente a cualquiera de un motivo peptídico gpavgv, gpavgV, gpaVgV, gpAvgV, gpAVgV, gpgggL, gpgggL, gpyagp, gpaygP, gpaYgP, gpAygP o gpAYgP.

Realización adicional 29.

Una molécula de acuerdo con realizaciones adicionales 22 y 23 en donde la molécula

comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo EXXXQ, ExXXQ, EXxXQ, EXXxQ, ExxXQ, EXxxQ, ExXxQ y ExxxQ.

Realización adicional 30.

Un método de acuerdo con la realización adicional 29 en donde el péptido se selecciona del grupo EGS LQ, EVPPQ, EGALQ, EGPLQ, EVAQQ, EGPPQ, EAPLQ, EMALQ, EVARQ o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 31.

Una molécula de acuerdo con realizaciones adicionales 22 y 23 en donde la molécula comprende un péptido con un motivo seleccionado del grupo qxxxe, qxxXe, qxXxe, qXxxe, qxXXq, qXXxe, qXxXe y qXXXe.

Realización adicional 32.

Un método de acuerdo con la realización adicional 31 en donde el péptido se selecciona del grupo qlsge, qppve, qlage, qlpge, qqave, qppge, qlpae, qlame, qgrave o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 33.

Una molécula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 24 a 32 en donde el péptido se proporciona con resistencia mejorada a la degradación proteolítica al proporcionar cada uno de los flancos N- y C-terminales del motivo con hasta tres D-aminoácidos.

Realización adicional 34.

Una molécula de acuerdo con la realización adicional 33 en donde el péptido se selecciona del grupo vGVAPGVGVAPGVGVApG, vGVAPGVGVAPGEGSLQa, qVGQVELGGGPGAGSLQp, qVGQVELGGGPGEGSLQa, GaYPGAPGAYPGEGSLQav, GaYPGAPGAYPGAPAPGv, vGvAPGVGVAPGVGVApG, qvGQVELGGGPGAGSLqp, GayPGAPGAYPGAPApGv vGvaPGVGVAPGVGVApG, qvGqVELGGGPGAGSLqp y GaypGAPGAYPGAPapGv, gpavgvgpavgvgpavgv, pqlsgagpggglevqgvq, vgpapagpyagpagpyay, aqlsgegpavgvgpavgv, aqlsgepggglevqgvq, aqlsgegpypagpagpyay, vGVAPGVGVApG, vGVAPGEGSLQa, qGGGPGAGSLQp, qGGGPGEGSLQa, GaAYPGEGSLQav, GaYPGAAPAPGv, vGvAPGVGVApG, qvGGGPGAGSLqp,

GayPGAAPApGv vGvaPGVGvapG, qvGqVELGGGPGqp y GaypGAAPapgV, gpavgvgpavgv, pqlsgegpggglvq, vgpapgpapgyay, aqlsgegpavgv, aqlsgegpggqgvq, aqlsgegpapgyay, o un equivalente funcional de los mismos.

Realización adicional 35.

Una molécula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 21 a 34 en donde la hiperinsulinemia es hiperinsulinemia endógena.

Realización adicional 36.

Una molécula de acuerdo con la realización adicional 35 en donde la hiperinsulinemia comprende hiperinsulinemia congénita.

Realización adicional 37.

Una molécula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 36 que se puede obtener por síntesis de péptidos. Realización adicional 38.

Una molécula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 37 que comprende al menos un D-aminoácido, preferentemente al menos 2, más preferentemente al menos 3 D-aminoácidos.

Realización adicional 39.

Un modulador o composición farmacéutica que comprende una molécula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38.

Realización adicional 40.

Una composición de acuerdo con la realización adicional 39 que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Realización adicional 41.

Una célula proporcionada con una molécula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21 a 38.

Realización adicional 42.

Una célula de acuerdo con la realización adicional 41 proporcionada con un complejo

de receptor de elastina (ERC).

Realización adicional 43.

Una célula de acuerdo con la realización adicional 41 o 42 proporcionada con una cinasa receptora de insulina (IRK).

Realización adicional 44.

Una célula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 41 a 43 proporcionada con DANA.

Realización adicional 45.

Un cultivo de células que comprende al menos una célula de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 41 a 44.

Realización adicional 46.

Uso de un cultivo de células de acuerdo con la realización adicional 45 para examinar una molécula y determinar el efecto de la molécula en la modulación de la actividad de Na^+ K^+ ATPasa.

Realización adicional 47.

Uso de un cultivo de células de acuerdo con la realización adicional 45 para examinar una molécula y determinar el efecto de la molécula sobre la polarización de membrana.

Realización adicional 48.

Uso de un cultivo de células de acuerdo con la realización adicional 45 para examinar una molécula y determinar el efecto de la molécula sobre la modulación de secreción de insulina.

Realización adicional 49.

Un método para identificar una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, preferentemente un péptido, capaz de inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células un péptido que comprende aminoácidos L-proteinogénicos, estos aminoácidos para menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra:

A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P) y arginina (R), y determinar la actividad angiogénica en un ensayo de brotación.

Realización adicional 50.

Un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células una fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, estos aminoácidos para al menos 50 % seleccionados del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P) y arginina (R).

Realización adicional 51.

Un método para inducir glucemia incrementada en la prevención o tratamiento de un hiperinsulinismo de un sujeto, que comprende proporcionar a las células un péptido como fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, donde este péptido consiste en aminoácidos que se seleccionan para al menos 50 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P) y arginina (R).

Realización adicional 52.

Un método de acuerdo con la realización adicional 50 o 51, en donde esta fuente de aminoácidos, preferentemente L-proteinogénicos, preferentemente un péptido, es identificable con un método de acuerdo con la realización adicional 49.

Realización adicional 53.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 49 a 52 en donde estos aminoácidos se seleccionan para al menos 50 % del grupo de alanina (en código de una letra: A), glutamina (Q), glicina (G), valina (V), leucina (L) y prolina (P).

Realización adicional 54.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 50 a 53 en donde la fuente o péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de un péptido o proteína que se muestra o se sospecha que tiene actividades.

Realización adicional 55.

Un método de acuerdo con la realización adicional 54 en donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de una gonadotropina coriónica.

Realización adicional 56.

Un método de acuerdo con la realización adicional 54 en donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de un péptido C.

Realización adicional 57.

Un método de acuerdo con la realización adicional 54 en donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de una galectina-3.

Realización adicional 58.

Un método de acuerdo con la realización adicional 54 en donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de una luteotropina.

Realización adicional 59.

Un método de acuerdo con la realización adicional 54 en donde el péptido tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de una proteína de matriz extracelular.

Realización adicional 60.

Un método de acuerdo con la realización adicional 59 en donde la proteína de matriz extracelular es una elastina o colágeno.

Realización adicional 61.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 49 a 60 en donde el péptido comprende menos de 31 aminoácidos, preferentemente menos de 26 aminoácidos, más preferentemente menos de 21 aminoácidos, más preferentemente menos de 16 aminoácidos, más preferentemente menos de 13 aminoácidos.

Realización adicional 62.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 49 a 61 en donde el péptido comprende más de 3 aminoácidos, preferentemente más de 5 aminoácidos, más preferentemente más de 7 aminoácidos, más preferentemente al menos 9 aminoácidos.

Realización adicional 63.

Un método de acuerdo con la realización adicional 62 en donde la fuente comprende un péptido que comprende más de 6 aminoácidos y menos de 26 aminoácidos.

Realización adicional 64.

Un método de acuerdo con la realización adicional 62 en donde la fuente comprende un péptido que comprende más de 7 aminoácidos y menos de 31 aminoácidos.

Realización adicional 65.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 49 a 64 en donde el péptido se proporciona como una sal de un ácido orgánico, preferentemente en donde el péptido se proporciona como una sal de ácido maleico, más preferentemente de ácido acético, más preferentemente de ácido tartárico y más preferentemente de ácido cítrico.

Realización adicional 66.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 49 a 65 en donde estas células son de origen humano.

Realización adicional 67.

Un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones adicionales 49 a 66 en donde el péptido es de origen humano.

Realización adicional 67.

Una realización adicional de acuerdo con las realizaciones 49 a 66 en donde el péptido se proporciona como una sal de un ácido orgánico, preferentemente en donde el péptido se proporciona como una sal de ácido maleico, más preferentemente de ácido acético, más preferentemente de ácido tartárico y más preferentemente de ácido cítrico.

Realización adicional 68.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia que comprende tratar a este sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que

porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido.

Realización adicional 69.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia que comprende tratar a este sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de activación de Na⁺ K⁺ ATPasa que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico de dominio de pentapéptido EXXXQ en donde E representa el aminoácido glutamato, G glutamina y X cualquier aminoácido.

Realización adicional 70.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia que comprende tratar a este sujeto con un modulador o composición farmacéutica proporcionada con una molécula que porta un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico de dominio PG XGXXPG en donde G representa el aminoácido glicina, P prolina y X cualquier aminoácido y además se proporciona con una molécula que porta un motivo de activación de Na⁺ K⁺ ATP-asa que es al menos funcionalmente equivalente al motivo de dominio de pentapéptido EXXXQ en donde E representa el aminoácido glutamato, G glutamina y X cualquier aminoácido.

Realización adicional 71.

Un método para tratar a un sujeto diagnosticado con episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia, el método que comprende:

- a. administrar al sujeto un modulador o composición farmacéutica que comprende una molécula que tiene un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico XGXXPG, en donde G representa glicina, P representa prolina y X representa cualquier aminoácido,
para reducir los episodios de hipoglucemia asociados a hiperinsulinemia.

Realización adicional 72.

Un método para tratar a un sujeto diagnosticado con episodios de hipoglucemia

asociados con hiperinsulinemia, el método que comprende:

b. administrar al sujeto un modulador o composición farmacéutica que comprende una molécula que tiene un motivo de activación de Na⁺ K⁺ ATPasa que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico de dominio de pentapéptido EXXXQ, en donde E representa glutamato, G representa glutamina y X representa cualquier aminoácido,

para reducir los episodios de hipoglucemia asociados a hiperinsulinemia.

Realización adicional 73.

Un método para tratar a un sujeto diagnosticado con episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia, el método que comprende:

c. administrar al sujeto un modulador o composición farmacéutica que comprende:

i. una molécula que tiene un motivo de unión a receptor de elastina que es al menos funcionalmente equivalente a un motivo peptídico de dominio PG XGXXPG, en donde G representa glicina, P representa prolina y X representa cualquier aminoácido, y

ii. una molécula que porta un motivo de activación de Na⁺ K⁺ ATP-asa que es al menos funcionalmente equivalente al motivo de dominio de peptapéptido EXXXQ, en donde E representa glutamato, G representa glutamina y X representa cualquier aminoácido, para reducir los episodios de hipoglucemia asociados con hiperinsulinemia.

iii.

Realización adicional 74.

Un método para identificar un motivo de aminoácido que se une a un receptor celular de un mamífero, en donde el método comprende los siguientes pasos en orden consecutivo:

(i) seleccionar motivos de aminoácidos candidatos;

(ii) determinar la frecuencia de aparición de cada uno de los motivos de aminoácidos candidatos en el proteoma de un patógeno; en donde el patógeno es un patógeno que puede infectar al mamífero;

y

iii) identificar el motivo de aminoácido candidato con la mayor frecuencia de aparición en el proteoma del patógeno como el motivo de aminoácido que se une al receptor celular del mamífero.

Realización adicional 75.

El método de acuerdo con la realización adicional 74, en donde el mamífero es un primate.

El método de acuerdo con realizaciones adicionales 74 o 75, en donde el mamífero es un humano.

Realización adicional 76.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 75, en donde el receptor celular es un receptor que se expresa en células inmunitarias.

Realización adicional 77.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 75, en donde el receptor celular es el complejo de receptor de elastina.

Realización adicional 78.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 77, en donde en el paso (i) los motivos de aminoácidos candidatos se seleccionan con base en características conocidas del motivo de aminoácidos que se une al receptor celular del mamífero.

Realización adicional 79.

El método de acuerdo con la realización 78, en donde las características conocidas son uno o más aminoácidos conocidos del motivo de aminoácido que se une al receptor celular del mamífero.

Realización adicional 80.

El método de acuerdo con la realización 78, en donde las características conocidas son una estructura secundaria conocida del motivo de aminoácido que se une al receptor celular del mamífero.

Realización adicional 81.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 80, en donde en el paso (i) se seleccionan al menos 100 motivos de aminoácidos candidatos, preferentemente en donde en el paso (i) se seleccionan al menos 200 motivos de aminoácidos candidatos.

Realización adicional 82.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 78 a 81, en donde el receptor celular es el complejo de receptor de elastina, y en donde los motivos de aminoácidos candidatos comprenden la secuencia de aminoácidos xGxxPx, en donde G es glicina, P es prolina y x es cualquier aminoácido natural.

Realización adicional 83.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 78 a 81, en donde el receptor celular es el complejo de receptor de elastina, y en donde los motivos de aminoácidos candidatos comprenden la secuencia de aminoácidos xGxxPG, en donde G es glicina, P es prolina y x es cualquier aminoácido natural.

Realización adicional 84.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 78 a 81, en donde el receptor celular es el complejo de receptor de elastina, y en donde los motivos de aminoácidos candidatos son todos los motivos de aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos XGXXPG, en donde G es glicina, P es prolina y X es cualquier aminoácido natural.

Realización adicional 85.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 85, en donde el patógeno es un virus, una bacteria o un protozoo.

Realización adicional 86.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 186, en donde el patógeno es un patógeno que adquiere proteínas de hospedador durante la infección natural.

Realización adicional 87.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 76, en donde el patógeno es *Plasmodium spp.*

Realización adicional 88.

El método de acuerdo con la realización 87, en donde el patógeno es *Plasmodium spp* infectante de primates o infectante de roedores.

Realización adicional 89.

El método de acuerdo con la realización 88, en donde el *Plasmodium spp.* infectante de primates es uno o más *Plasmodium spp.* seleccionados de la lista que consiste en *Plasmodium reichenowi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium gonderi*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium sp. DRC-Itaito*, y *Plasmodium sp.* Clado de gorilas.

Realización adicional 90.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 90, en donde el proteoma del patógeno es un proteoma parcial del patógeno.

Realización adicional 91.

El método de acuerdo con la realización 90, en donde el proteoma parcial del patógeno comprende las proteínas de membrana celular del patógeno y las proteínas secretadas del patógeno.

Realización adicional 92.

El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 73 a 91, en donde el patógeno es *Plasmodium spp.*, infectante de primates, y en donde el proteoma del patógeno es un proteoma parcial que comprende las proteínas de etapa sanguínea de *Plasmodium spp.*, infectante de primates.