



(51) МПК  
*A61K 33/04* (2006.01)  
*A61K 31/7076* (2006.01)  
*A61K 31/198* (2006.01)  
*A61P 3/00* (2006.01)  
*A61P 39/06* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 33/04* (2006.01); *A61K 31/7076* (2006.01); *A61K 31/198* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015139742, 14.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.03.2014

Дата регистрации:  
01.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
15.03.2013 US 61/788,133

(43) Дата публикации заявки: 21.04.2017 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 01.08.2018 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 15.10.2015

(86) Заявка РСТ:  
US 2014/029328 (14.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/144776 (18.09.2014)

Адрес для переписки:  
190000, Санкт-Петербург, BOX 1125,  
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ПАУЭР Ронан (US),  
ЭГАН Кейси (US),  
ЙАННИКУРИС Александр (US),  
ЛАНЬ Цзы-Цзянь (US),  
СЯО Жицзинь (US),  
ДЖЕКСОН Льюис Коллен (US),  
КВЯТКОВСКИ Стефан (US)

(73) Патентообладатель(и):  
ОЛТЕК, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: EP 1774972 B1, 29.02.2012. SNYDER  
J. L.R. "Genomic Analysis of the Influence of  
Selenium Sources in Broiler Chickens  
Challenged with an Enteric Avian Reovirus",  
MASTERS THESIS, 2009, p. 1-243. WO  
2012141316 A1, 18.10.2012. US 2007026090 A1,  
01.02.2007. US 2010247679 A1, 30.09.2010.  
PINTO ET AL. "Supranutritional selenium  
induces alterations in (см. прод.)

R U 2 6 6 3 1 2 7 C 2

R U 2 6 6 3 1 2 7 C 2

(54) СЕЛЕНСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И  
ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ИЛИ СОСТОЯНИЙ, СВЯЗАННЫХ С  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ

(57) Реферат:

Изобретения относятся к биотехнологии и  
медицине. Предложены способ и композиция для  
усиления функции митохондрий в клетке субъекта.  
Способ включает введение субъекту  
эффективного количества композиции,  
содержащей выделенный 5'-метилселенаденозин,  
селенаденозилгомоцистеин, лейцин-валин-  
селенметионин-аргинин или их комбинации.  
Причем указанную композицию вводят в дозе,  
обеспечивающей получение субъектом от 25 до  
800 мкг селена в день. Эффективное количество

усиливает функцию митохондрий в клетке по  
сравнению с клеткой, не подвергаемой  
воздействию композиции. Изобретения  
обеспечивают усиление активности и функции  
митохондрий, например, в скелетных мышцах и  
печени субъекта и пригодны в качестве  
терапевтического и/или профилактического  
средства для лечения диабета, ожирения и  
связанных с ними состояний. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 41  
ил., 8 табл., 9 пр.

R U 2 6 6 3 1 2 7 C 2

R U 2 6 6 3 1 2 7 C 2

(56) (продолжение):

molecular targets related to energy metabolism in skeletal muscle and visceral adipose tissue of pigs", J. INORG BIOCHEM., 2012, v. 114, p. 47-54. IWIG D. "Investigation of the Catalytic Mechanism of the Reaction Catalyzed by Escherichia coli Cyclopropane Fatty Acid Synthase.", DISSERTATION, 2006, pages 1-267, см. с. 42, 44, 47, 51-54, 208, 217. Найдено в Интернет [11.01.2018], URL: [http://pdfsecret.com/download/investigation-of-the-catalytic-mechanism-of-the-reaction-catalyzed-by-\\_59f70365d6](http://pdfsecret.com/download/investigation-of-the-catalytic-mechanism-of-the-reaction-catalyzed-by-_59f70365d6) MARSHALL J. R. et al. "Methyl Selenocysteine: Single-Dose Pharmacokinetics in Men", Cancer Prev Res., 2011, v. 4, p. 1938-1944. EP 1779858 B1, 09.01.2013. EA 17496 B1, 28.12.2012.

R U 2 6 6 3 1 2 7 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19)

RU

(11)

2 663 127

(13) C2

(51) Int. Cl.

*A61K 33/04* (2006.01)

*A61K 31/7076* (2006.01)

*A61K 31/198* (2006.01)

*A61P 3/00* (2006.01)

*A61P 39/06* (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

*A61K 33/04* (2006.01); *A61K 31/7076* (2006.01); *A61K 31/198* (2006.01)

(21)(22) Application: 2015139742, 14.03.2014

(24) Effective date for property rights:  
14.03.2014

Registration date:  
01.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:  
15.03.2013 US 61/788,133

(43) Application published: 21.04.2017 Bull. № 12

(45) Date of publication: 01.08.2018 Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: 15.10.2015

(86) PCT application:  
US 2014/029328 (14.03.2014)

(87) PCT publication:  
WO 2014/144776 (18.09.2014)

Mail address:  
190000, Sankt-Peterburg, BOX 1125, "PATENTIKA"

(72) Inventor(s):

PAUER Ronan (US),  
EGAN Kejsi (US),  
JANNIKURIS Aleksandr (US),  
LAN Tszy-Tszyan (US),  
SYAO Zhitszin (US),  
DZHEKSON Lyuis Kollen (US),  
KVYATKOVSKI Stefan (US)

(73) Proprietor(s):

OLTEK, INK. (US)

R U 2 6 6 3 1 2 7 C 2

(54) COMPOSITIONS COMPRISING SELENIUM AND USE OF SAME FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF DISEASE OR CONDITIONS ASSOCIATED WITH MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; medicine.

SUBSTANCE: method and a composition for enhancing the function of mitochondria in a subject's cell are proposed. Method comprises administering to the subject an effective amount of a composition comprising the isolated 5'-methylselenadenosine, selenadenosyl homocysteine, leucine-valine-selenomethionine-arginine, or combinations thereof. Said composition is administered in a dose providing the subject with 25 to 800 mcg of selenium per day.

Effective amount enhances the mitochondrial function in the cell as compared to a cell not exposed to the composition.

EFFECT: inventions provide for enhancing the activity and function of mitochondria, for example in the skeletal muscle and liver of a subject, and are useful as a therapeutic and / or prophylactic agent for the treatment of diabetes, obesity and related conditions.

9 cl, 41 dwg, 8 tbl, 9 ex

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ(ЫЕ) ЗАЯВКУ (И)

Настоящая заявка подана 14 марта 2014 г. как международная патентная заявка РСТ и испрашивает приоритет на основании заявки на патент США №61/788133, поданной 15 марта 2013 г., описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к композициям, содержащим селен (например, дрожжам, обогащенным селеном, и селенсодержащим соединениям) и способам их применения для лечения митохондриальной дисфункции. В частности, в настоящей заявке

10 предложены композиции, содержащие дрожжи, обогащенные селеном (например, дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена), селенсодержащие соединения, содержащиеся в них и/или получаемые из них, и способы их применения для лечения заболеваний и состояний, связанных с митохондриальной дисфункцией.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Митохондрии, которые являются органоидами, представляют собой основной источник энергии в клетках высших организмов. Митохондрии обеспечивают прямую и косвенную биохимическую регуляцию широкого спектра клеточных дыхательных, окислительных и метаболических процессов. К ним относится активность электрон-

20 транспортной цепи (ЭТЦ), которая управляет окислительным фосфорилированием, производя метаболическую энергию в форме аденоzinтрифосфата (АТФ), и которая также лежит в основе центральной функции митохондрий во внутриклеточном гомеостазе кальция.

Митохондриальное дыхание происходит на внутренней мемbrane митохондрий за счет потока электронов через электрон-транспортную систему, содержащую четыре комплекса (комплекс I, II, III и IV) и дополнительный комплекс (комплекс V), выступающие в качестве области для синтеза АТФ (АТФ-синтазы). Нарушение или снижение активности любого комплекса нарушает поток электронов и может вызвать дыхательную дисфункцию митохондрий (см, например, Schildgen et al., Exp Hematol 2011, 39:666-67510,11; Arthur et al., Mol Neurodegener 2009; 4:37). Анализ метаболической дисфункции митохондрий можно отслеживать посредством анализа с помощью кислородного электрода (см., например, Chance and Williams, J Biol Chem 1955; 217:383-393). Анализ позволил достичь глубокого понимания дыхательной функции митохондрий. Подробно описана связь между дыхательной дисфункцией митохондрий

35 (например, приводящей к гибели клеток, продукции реакционноспособных форм кислорода, усиленному окислительному повреждению ДНК, повышенной аутофагии, потере потенциала мембранны митохондрий (например, за счет нарушений экспрессии и/или активности комплекса I) и связанной с этим повышенной продукции АТФ) и множеством заболеваний или состояний (например, диабету, ожирению, возрастной

40 нейродегенерации, в том числе, болезни Альцгеймера, инсульту, инсулинрезистентности, атеросклерозу и т.д.) (см., например, Miquel et al., Exp Gerontol 1980; 15:575-591; McLean et al., Pharmacol Rev 2004; 56:163-184; Kujoth et al., Science 2005; 309:481-484; Guarente, Cell 2008; 132:171-176; Lopez-Lluch et al., Exp Gerontol 2008; 43:813-819; Shigenaga et al., Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:10771-10778; Schaefer et al., Biochim Biophys Acta 2004; 1659: 115-120).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящая заявка относится к композициям, содержащим селен (например, дрожжам, обогащенным селеном, и селенсодержащим соединениям, полученным или

происходящим из них) и способам их применения для лечения митохондриальной дисфункции. В частности, в настоящей заявке предложены композиции, содержащие дрожжи, обогащенные селеном (например, дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена), селенсодержащие соединения, содержащиеся в 5 них и/или получаемые из них, и способы их применения для лечения заболеваний и состояний, связанных с митохондриальной дисфункцией.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложена композиция, содержащая выделенное селенсодержащее соединение, причем указанное селенсодержащее соединение выбрано из 2,3-DHP-селенцистеинцистеина, N-

- 10 ацетилселенцистеинселенгомоцистеина, метилтиоселенглутатиона, 2,3-DHP-сelenцистеинселенцистеина, 2,3-DHP-селенцистеинцистеинилглицина, 2,3-DHP-сelenцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-сelenгомоцистеинцистеинилглицина, селенметилселенглутатиона, селенглутатионцистеина, 2,3-DHP-селенцистеин- $\gamma$ -глутамоилцистеина, ди-2,3-DHP-селенцистеина, N-ацетилцистеинселенглутатиона, 15 селенглутатионселенцистеина, 2,3-DHP-селенцистеин-2,3-DHP-селенгомоцистеина, глутатион-N-ацетилселенгомоцистеина, глутатионселенцистеинилглицина,  $\gamma$ -глутамоилселенцистеин- $\gamma$ -глутамоилцистеина,  $\gamma$ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-сelenцистеина, глутатион-2,3-DHP-селенцистеина, глутатион-2,3-DHP-селенгомоцистеина, 20 ди- $\gamma$ -глутамоилселенцистеина, селенглутатион- $\gamma$ -глутамоилцистеина, селенглутатион-2,3-DHP-селенцистеина, селенглутатион-2,3-DHP-селенгомоцистеина, селенглутатионтио-2,3-DHP-селенцистеина, селенглутатион- $\gamma$ -глутамоилселенцистеина, селенглутатионглутатиона, селенглутатиона, диселенглутатиона, тиодиселенглутатиона, метилдегидрогомоцистеина, селенметионина, 25 селенгомолантионина, N-ацетилселенцистациионина, дегидрокси-5'-метилселенаденозина, N-ацетилцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенлантионина, этилселенаденозина, N-пропионилселенцистациионина, 2,3-DHP-селенцистациионина, метилселенглутатиона,  $\gamma$ -глутамоилселенцистациионина и селенглутатиона.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки селенсодержащие соединения

- 30 включают селен-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозин), N-ацетилцистеинселенгомоцистеин, аллилселенаденозилгомоцистеин, селенаденозилгомоцистеин, селенгидроксиаденозилгомоцистеин, селенаденозин, селенаденозил-Se-(метил)-селеноксид, аденоэозилгидроксиселеноксид, этилселенаденозин, селен-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозин), аденоэозилгидроксиселеноксид, 35 селенаденозил-Se-(метил)-селеноксид и их комбинации, но не ограничиваются ими.

В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из метилселенаденозина, селен-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина), N-ацетилцистеинселенгомоцистеина, аллилселенаденозилгомоцистеина, селенаденозилгомоцистеина, селенгидроксиаденозилгомоцистеина, селенаденозина,

- 40 селенаденозил-Se-(метил)-селеноксида, аденоэозилгидроксиселеноксида, этилселенаденозина, селен-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина), аденоэозилгидроксиселеноксида, селенаденозил-Se-(метил)-селеноксида и их комбинаций.

В конкретном варианте реализации композиция содержит соединение метилселенаденозин. В вариантах реализации одно или несколько соединений являются 45 выделенными и/или очищенными. В вариантах реализации композиции пригодны для усиления функции митохондрий в клетке или повышения активности пируватдегидрогеназного комплекса.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки селенсодержащее соединение

включает селенсодержащий пептид. Примеры соединений, содержащих селенопептид, включают, но не ограничиваются ими, MVAEAEK, DYMGAAK, YMGAAK, ELQDIANPIMSK, NQAAMNPSNTVFDAK, NFTPEQISSMYLGK, NFTPEQISSMVLGK, MVSEAEK, PEVQGDMK, ELQDIANPIMSK, AMSSR, VQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGK, 5 AAAEGPMK, LTGMAFR, PFVSNDYAAVMVK, AFGIEEGLMTTVHSLTATQK, PFITNDYAAYMFK, PGMVVTFAPAGVTTEVK, VETGVIKPGMVVTFAPAGVTTEVK, AAATAAMTK, SIVPSGASTGVHEALEMR, WMGK, SIVPSGASTGVHEALEMR, AMPQK, AAMAK, HVGDMEIR, VIEEPITSETAMK, VLQALEEIGIVEISPK, LPAASLGDMVMATVK, AGMTTIVR, AGMTTIVR, MLMPK, TMGAK, MNAGR, TYENMK, MGHDQSGTK, 10 GEAIMAPK, Ac-MNVFGK, AMEVVVASER, IVMR, MA(I/L)R, AMXAK, DLETLMHTK, IVMR, VMR, LTGMAFR, SRPNVEVVALNDPFITNDYAAYMFK и VINDAFGIEEGLMTTVHSLTATQK, причем каждый пептидный фрагмент содержит молекулу селена, и их применение при производстве лекарственного средства для 15 лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с митохондриальной дисфункцией.

В настоящей заявке также предложен способ повышения митохондриальной активности у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества селенсодержащей композиции (например, описанной в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации повышение митохондриальной 20 активности включает увеличение продукции АТФ в митохондриях. В некоторых вариантах реализации повышение митохондриальной активности включает усиление метаболизма митохондрий. В некоторых вариантах реализации повышение митохондриальной активности приводит к снижению продукции реакционноспособных форм кислорода у субъекта (например, в скелетных мышцах, печени, наружном покрове 25 или ткани яичника субъекта). В некоторых вариантах реализации повышение митохондриальной активности приводит к увеличению метаболизма глюкозы у субъекта (например, в скелетных мышцах и/или ткани печени субъекта). В некоторых вариантах реализации повышение митохондриальной активности включает повышение активности комплекса I. В некоторых вариантах реализации усиленная функция митохондрий имеет 30 место в митохондриях скелетных мышц субъекта. В некоторых вариантах реализации усиленная функция митохондрий имеет место в митохондриях печени субъекта.

В некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция выбрана из дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, селеноэфира, конъюгата SeCys, содержащего ди- и/или трипептиды, селенола и 35 селеноксида. В некоторых вариантах реализации селенсодержащий компонент получен или выделен от дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена. В вариантах реализации селенсодержащий компонент выбран из группы, состоящей из SeCys- или SeMet-пептида, селенсодержащей аденоизильной молекулы и их комбинаций. В конкретном варианте реализации селенсодержащее 40 соединение является метилселенаденозином или лейцинвалинселенметионинаргинином.

В вариантах реализации способ усиления функции митохондрий в клетке включает введение эффективного количества композиции, содержащей выделенный 5'-метилселенаденозин, LVSe-MR или их комбинации, причем эффективное количество усиливает функцию митохондрий в клетке по сравнению с клеткой, не подвергаемой 45 воздействию композиции.

В других вариантах реализации способ повышения пируватдегидрогеназного комплекса в клетке включает введение эффективного количества композиции, содержащей 5'-метилселенаденозин, причем эффективное количество повышает

активность пируватдегидрогеназного комплекса в клетке по сравнению с клеткой, не подвергаемой воздействию композиции.

В некоторых вариантах реализации субъект страдает от или подвергается риску заболевания или состояния, связанного с митохондриальной дисфункцией. Настоящая

5 заявка не ограничена типом заболевания или состояния, связанного с митохондриальной дисфункцией. Фактически, композиции и способы согласно настоящей заявке находят применение при различных заболеваниях и состояниях (например, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации субъект страдает от кардиомиопатии. В некоторых вариантах реализации субъект страдает от саркопении.

10 В некоторых вариантах реализации у субъекта имеет место потеря белка в мышцах.

В настоящей заявке дополнительно предложен способ усиления метаболизма глюкозы у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества селенсодержащей композиции (например, описанной в настоящем документе), причем введение приводит к повышению митохондриальной активности 15 у субъекта. В некоторых вариантах реализации усиленный метаболизм глюкозы имеет место в скелетных мышцах субъекта. В некоторых вариантах реализации усиленный метаболизм глюкозы имеет место в печени.

20 В настоящей заявке предложен способ лечения субъекта с заболеванием или состоянием, связанным с измененной функцией митохондрий, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества селенсодержащей композиции (например, описанной в настоящем документе), причем введение приводит к повышению митохондриальной активности у субъекта, за счет чего происходит лечение заболевания или состояния у субъекта.

Настоящая заявка не ограничена вводимой селенсодержащей композицией. В

25 некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция содержит дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено применение и введение селенсодержащих фракций, полученных из дрожжей, обогащенных селеном (например, дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена).

30 Например, в некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция содержит водорастворимую фракцию дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена. В других вариантах реализации селенсодержащая композиция содержит нерастворимую в воде фракцию дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена. В некоторых вариантах реализации

35 селенсодержащая композиция, вводимая субъекту, содержит одиночную жидкую fazу, содержащую экстракт дрожжей, обогащенных селеном (например, растворимый в кислых условиях (например, фракцию растворимых селенсодержащих соединений (например, растворимых селеногликопротеинов), экстрагированную и/или осажденную при первом значении pH (например, pH 1,85), вторую фракцию, осажденную при втором 40 значении pH (например, pH 3,0), третью фракцию, осажденную при третьем значении pH (например, pH 4,0), и четвертую фракцию, осажденную при четвертом значении pH (например, pH 6,0))).

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено применение и введение селенсодержащих соединений (например, полученных или происходящих из

45 дрожжей, обогащенных селеном (например, дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена), или их производных. Настоящая заявка не ограничена одним или более применяемыми селенсодержащими соединениями. В некоторых вариантах реализации одно или более из селенсодержащих соединений

являются селеноэфирами, конъюгатами SeCys, содержащими ди- и трипептиды, селенолами или селеноксидами (или их производными), селенсодержащими белками и/или селенсодержащими пептидами, описанными в настоящем документе.

Например, в некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция,

- 5 содержащая компонент, вводимый субъекту (например, в способе согласно настоящей заявке), содержит одно или несколько из: 2,3-DHP-селенцистеинцистеина, N-ацетилселенцистеинселенгомоцистеина, метилтиоселенглутатиона, 2,3-DHP-селенцистеинселенцистеина, 2,3-DHP-селенцистеинцистеинилглицина, 2,3-DHP-селенцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-
- 10 селенгомоцистеинцистеинилглицина, селенметилселенглутатиона, селенглутатионцистеина, глутатионселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенцистеин- $\gamma$ -глутамоилцистеина, ди-2,3-DHP-селенцистеина, N-ацетилцистеинселенглутатиона, селенглутатионселенцистеина, 2,3-DHP-селенцистеин-2,3-DHP-селенгомоцистеина, глутатион-N-ацетилселенгомоцистеина, глутатионселенцистеинилглицина,  $\gamma$ -
- 15 глутамоилселенцистеин- $\gamma$ -глутамоилцистеина,  $\gamma$ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-селенцистеина, глутатион-2,3-DHP-селенцистеина, глутатион-2,3-DHP-селенгомоцистеина, ди- $\gamma$ -глутамоилселенцистеина, селенглутатион- $\gamma$ -глутамоилцистеина, селенглутатион-2,3-DHP-селенцистеина, селенглутатион-2,3-DHP-селенгомоцистеина, селенглутатионтио-2,3-DHP-селенцистеина, селенглутатион- $\gamma$ -глутамоилселенцистеина,
- 20 селенглутатионглутатиона, селендиглутатиона, диселенглутатиона, тиодиселенглутатиона, метилдегидрогомоцистеина, селенметионина, селенгомолантионина, N-ацетилселенцистацииона, N-ацетилцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенлантионина, N-пропионилселенцистацииона, 2,3-DHP-селенцистацииона, метилселенглутатиона,  $\gamma$ -глутамоилселенцистацииона или селенглутатиона.
- 25 В вариантах реализации селенсодержащее соединение содержит одно или более из 5'-метилселенаденозина, селен-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина), этилселенаденозина, аллилселенаденозилгомоцистеина, селенаденозилгомоцистеина, селенгидроксиаденозилгомоцистеина, селенаденозина, селенаденозил-Se-(метил)-селеноксида, аденоэтилгидроксиселеноксида, этилселенаденозина, селен-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина) или селенаденозил-Se-(метил)-селеноксида.

В некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту (например, в способе согласно настоящей заявке) содержит один или более из белков или пептидных фрагментов, где одна или более молекул серы, присутствующих в одном или нескольких аминокислотных остатках белка или пептида, замещена молекулой

- 35 селена. Настоящая заявка не ограничена конкретным селенсодержащим белком или пептидом. В некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту содержит один или более из пептидных фрагментов, где одна или более молекул серы, присутствующих в одном или нескольких аминокислотных остатках пептида, замещена молекулой селена из: MVAEAEK, DYMGAAK, YMGAAK, ELQDIANPIMSK, NQAAMNPSNTVFDAK, NFTPEQISSMVLGK, NFTPEQISSMVLGK, MVSEAEK, PEVQGDMK, ELQDIANPIMSK, AMSSR, VQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGK, AAAEGPMK, LTGMAFR, PFVSNDYAAVMVK, AFGIEEGLMTTVHSLTATQK, PFITNDYAAVMFK, PGMVVTFAPAGVTTEVK, VETGVIKPGMVVTFAPAGVTTEVK, AAATAAMTK, SIVPSGASTGVHEALEMR, WMGK, SIVPSGASTGVHEALEMR, AMPQK, AAMAK, HVGDMEIR, VIEEPITSETAMK, VLQALEEIGIVEISPK, LPAASLGDMVMATVK, AGMTTIVR, AGMTTIVR, MLMPK, TMGAK, MNAGR, TYENMK, MGHDQSGTK, GEAIMAPK, Ac-MNVFGK, AMEVVASER, IVMR, MA(I/L)R, AMXAK, DLETLMHTK, LVMR, VMR, LTGMAFR, SRPNVEVVALNDPFITNDYAAVMFK и

## VINDAFGIEEGLMTTVHSLTATQK.

В некоторых вариантах реализации композиции (например, фармацевтические композиции) содержат 2 или более (например, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более,

5 30 или более, 40 или более или 50 или более) отдельных селенсодержащих соединений (например, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложена композиция, содержащая комбинацию 2 или более (например, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более или 50 10 или более) селенсодержащих соединений (например, выделенных, химически синтезированных или рекомбинантных селенсодержащих соединений), предназначенных для конкретного применения (например, в комбинации демонстрирующих желательный уровень биологической активности (например, стимулирующей и/или ингибирующей активности)).

15 Например, в некоторых вариантах реализации первую композицию, содержащую комбинацию двух или более селенсодержащих соединений, используют для повышения митохондриальной активности (например, продукции АТФ и/или дыхания) в мышечной ткани, тогда как вторую композицию, содержащую комбинацию двух или более различных селенсодержащих соединений (например, проявляющую биологическую 20 активность, которая отличается от активности первой композиции), используют для изменения митохондриальной активности в ткани печени. В некоторых вариантах реализации композицию, содержащую два или более селенсодержащих соединения, настраивают в соответствии с конкретным генетическим профилем индивида (например, для адресного воздействия на определенный ген или белок).

25 Аналогичным образом для применения при лечении конкретного заболевания или состояния у индивида можно настроить дрожжевые экстракты или фракции. Таким образом разрабатывают индивидуализированные составы для отдельно взятого субъекта, нуждающегося в лечении. В некоторых вариантах реализации субъект, которому вводят селенсодержащую композицию согласно настоящей заявке, страдает 30 от или подвергается риску состояния или заболевания, связанного с митохондриальной дисфункцией. Настоящая заявка не ограничена типом субъекта, подвергающегося риску или страдающего митохондриальной дисфункцией. Действительно, в данной области техники хорошо известно, что различные субъекты, в том числе субъекты, генетически предрасположенные к митохондриальной дисфункции, но не ограничиваясь ими, 35 подвергаются риску или страдают митохондриальной дисфункцией.

В вариантах реализации субъект страдает состоянием или заболеванием, включая кардиомиопатию, саркопению или потерю белка в мышцах, но не ограничиваясь ими.

В варианте реализации способ увеличения содержания белка в мышечной клетке включает введение эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, 40 обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, в мышечную клетку, причем эффективное количество увеличивает содержание белка в мышечной клетке. В других вариантах реализации способ лечения саркопении включает введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, причем эффективное 45 количество облегчает симптомы саркопении.

В вариантах реализации способ лечения кардиомиопатии включает введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, причем эффективное количество

облегчает симптомы кардиомиопатии.

В еще одном аспекте настоящей заявки предложена модуляция (например, повышение или снижение) экспрессии генов в клетках сердечной мышцы, клетках скелетных мышц и/или клетках печени.

- 5 В других вариантах реализации способ модуляции транскрипционной активности в клетке сердечной мышцы включает введение эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, в клетку сердечной мышцы, причем эффективное количество эффективно регулирует транскрипционную активность NFATc2/c3 и/или Foxo3 в клетке сердечной мышцы.
- 10 В дополнительных вариантах реализации в клетке сердечной мышцы, приведенной в контакт с дрожжами, обогащенными селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена, происходит снижение транскрипционной активности NFATc2/c3 по сравнению с мышечной клеткой, не подвергавшейся воздействию композиции. В других вариантах реализации в клетке сердечной мышцы, приведенной
- 15 в контакт с дрожжами, обогащенными селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена, усиливается фосфорилирование NFATc2/c3 по сравнению с мышечной клеткой, не подвергавшейся воздействию композиции. В вариантах реализации в клетке сердечной мышцы, приведенной в контакт с дрожжами, обогащенными селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена,
- 20 происходит увеличение транскрипционной активности Foxo3 по сравнению с клеткой сердечной мышцы, не подвергавшейся воздействию композиции.

В вариантах реализации способ снижения экспрессии генов в клетке сердечной мышцы включает введение эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, в мышечную 25 клетку, причем эффективное количество снижает экспрессию Myh7, Ankrd1, Lcn2, pS6K1 и их комбинаций. В еще одном варианте реализации способ повышения экспрессии генов в клетке сердечной мышцы включает введение эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, в сердечную мышцу, причем эффективное количество повышает 30 экспрессию гена, выбранного из группы, состоящей из Arm, Gadd45g, Gsk3b, UCP2 и их комбинаций, в клетке сердечной мышцы, приведенной в контакт с дрожжами, обогащенными селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена, по сравнению с клеткой сердечной мышцы, не подвергавшейся воздействию композиции.

В других вариантах реализации способ снижения экспрессии одного или более генов 35 в клетке скелетной мышцы включает введение эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, в клетку скелетной мышцы, причем эффективное количество снижает экспрессию одного или более или всех из миостатина, Avcr2b, mTOR, S6K1, Gsk3b, Fxbo32, Trim 63 и Nr2f2 в клетке сердечной мышцы, приведенной в контакт с дрожжами, обогащенными 40 селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена, по сравнению с клеткой сердечной мышцы, не подвергавшейся воздействию композиции. В вариантах реализации способ повышения экспрессии одного или более генов в клетке скелетной мышцы включает введение эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, в клетку 45 скелетной мышцы, причем эффективное количество повышает экспрессию одного или более или всех из Prkaa2, Myf6, Des и PGC1a в клетке скелетной мышцы, приведенной в контакт с дрожжами, обогащенными селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена, по сравнению с клеткой мышцы, не подвергавшейся

воздействию композции.

В других вариантах реализации в клетках печени животного, получавшего корм с дрожжами, обогащенными селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена, происходит повышение экспрессии гена, выбранного из группы, состоящей из 5 Nr2F2, PGC1a и их комбинаций, по сравнению с экспрессией гена в клетках печени животного, получавшего корм с недостаточным количеством селена.

В других вариантах реализации способ усиления функции митохондрий в клетке включает введение эффективного количества композции, содержащей выделенный 5'-метилселенаденозин, LVSe-MR или их комбинации, причем эффективное количество 10 усиливает функцию митохондрий в клетке по сравнению с клеткой, не подвергаемой воздействию композции. Другие варианты реализации включают способ повышения пируватдегидрогеназного комплекса в клетке, включающий введение эффективного количества композции, содержащей выделенный 5'-метилселенаденозин, причем 15 эффективное количество повышает активность пируватдегидрогеназного комплекса в клетке по сравнению с клеткой, не подвергаемой воздействию композции.

В дополнительных вариантах реализации настоящей заявки предложена композиция, содержащая выделенное соединение, выбранное из группы, состоящей из метилселенаденозина, сelen-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина), N-ацетилцистеинселенгомоцистеина, аллилселенаденозилгомоцистеина, 20 селенаденозилгомоцистеина, селенгидроксиаденозилгомоцистеина, селенаденозина, селенаденозил-Se-(метил)-селеноксида, аденоэозилгидроксиселеноксида, этилселенаденозина, сelen-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина), аденоэозилгидроксиселеноксида, селенаденозил-Se-(метил)-селеноксида и их комбинаций. В вариантах реализации выделенное соединение является метилселенаденозином. В 25 других вариантах реализации композиции предназначены для применения с целью усиления функции митохондрий в клетке.

В некоторых вариантах реализации количество селенсодержащей композции, вводимое субъекту, является эффективным количеством для замедления, остановки или регрессии прогрессирования митохондриальной дисфункции и/или заболевания 30 или состояния, связанного с ней, у субъекта, нуждающегося в этом, при минимальном токсическом воздействии. В некоторых вариантах реализации селенсодержащую композицию согласно настоящей заявке (например, органический селен (например, селенизированные дрожжи (например, SEL-PLEX) или селенсодержащее соединение, присутствующее в них или получаемое из них)) вводят, в суточной дозе, обеспечивающей 35 получение субъектом от 25 до 800 мкг селена в день (например, SEL-PLEX вводят субъекту, обеспечивая получение субъектом от 25 до 800 мкг селена каждый день). Тем не менее, настоящая заявка не ограничена этим. Фактически в некоторых вариантах реализации селенсодержащую композицию согласно настоящей заявке вводят в суточной дозе, обеспечивающей получение субъектом от менее 25 (например, 24, 23, 22, 21, 20 40 или менее) до более 800 (например, 825, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100 или более) мкг селена в день. В некоторых вариантах реализации селен (например, органический селен (например, селенизированные дрожжи (например, SEL-PLEX))) вводят в суточной дозе от 200 до 500 мкг в день. В других вариантах реализации селен вводят в суточной дозе от 200 до 400 мкг в день. В некоторых вариантах реализации разовую дозу селена 45 (например, органического селена (например, селенизированных дрожжей (например, SEL-PLEX))) вводят раз в день. В других вариантах реализации каждый день вводят 2, 3, 4 или более доз. В некоторых вариантах реализации суточная доза составляет между 25-75 мкг/кг селена. В других вариантах реализации суточная доза составляет 200 мкг

селена (например, органического селена (например, селенизированных дрожжей (например, SEL-PLEX))).

В настоящей заявке также предложен способ лечения митохондриальной дисфункции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества

5 фармацевтической композиции, содержащей селенсодержащую композицию, выбранную из группы, состоящей из дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, водорастворимой фракции дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, и нерастворимой в воде фракции дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена;

10 и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящей заявке также предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с митохондриальной дисфункцией у субъекта, включающий этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена.

15 **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фигуре 1 показана процедура последовательной экстракции, обеспечивающая полное растворение образца и определение селенметионина в отдельных фракциях одного варианта реализации настоящей заявки.

На фигуре 2 показано определение селенметионина в дрожжах, обогащенных селеном (Se), посредством анионообменной ВЭЖХ-ИСП-МС. На вставке показана проверка полноты расщепления посредством SEC-ИСП-МС (без Se в высокомолекулярной фракции и с количественным выходом с колонки).

На фигуре 3 показан типичный способ получения и идентификации водорастворимых и нерастворимых в воде фракций, присутствующих в селенизированных дрожжах, в 25 соответствии с одним вариантом реализации настоящей заявки.

На фигуре 4 показан ВЭЖХ-ИСП-МС-анализ метаболитов селена, (а) эксклюзационная хроматография (SEC)-ИСП-МС; (б) ион-парная (HFBA) обращенно-фазовая ВЭЖХ-ИСП-МС.

На фигуре 5 показаны хроматограммы водных экстрактов, полученные посредством 30 эксклюзационной хроматографии-ИСП-МС (76Se - темно-серая линия, 77Se - черная линия, 78Se - светло-серая линия).

На фигуре 6 показаны хроматограммы водных экстрактов, полученные посредством эксклюзационной хроматографии-ИСП-МС, после пептидной колонки SUPERDEX (76Se - темно-серая линия, 77Se - черная линия, 78Se - светло-серая линия).

35 На фигуре 7 показана SEC-пептидная хроматограмма образцов: а) водного экстракта, б) отдельного пика I, с) пика I после расщепления трипсином, д) водного экстракта после расщепления протеазами; черная линия - 80Se, светло-серая линия - 78Se, темно-серая линия - 77Se.

На фигуре 8 показаны (А) пептидная хроматограмма водного экстракта с фигуры 40 7А и (Б) обращенно-фазовая (RP) хроматограмма элюирования пиков на 58 мин с колонки SEC, показанной на фигуре 7А

На фигуре 9 показана идентификация селеносоединения, элюирующегося на 58 мин с колонки SEC, показанного на фиг. 8В, с использованием масс-спектроскопии и обращенно-фазовой хроматографии в сочетании с Orbitrap

45 На фигуре 10 показана обращенно-фазовые ВЭЖХ-ИСП-МС-хроматограммы подфракций водорастворимого экстракта дрожжей, обогащенных селеном, представленные в порядке элюирования. Показаны подфракций 1-10.

На фигуре 11 показана масс-спектроскопия селенсодержащих пептидов, выявленных

в подфракций 8 образца.

На фигуре 12 показаны хроматограммы подфракций материала после расщепления трипсином. Показаны подфракций 1-10.

На фигуре 13 показан список селенсодержащих пептидов, обнаруженных в

5 трипсиновых гидролизатах подфракций водорастворимого экстракта дрожжей, обогащенных селеном (MW - молекулярная масса, Z - состояние ионизации).

На фигуре 14 показан профиль катионообменной ВЭЖХ-ИСП-МС селенсодержащих соединений, присутствующих в SELPLEX (A) всего образца и (B) обращенно-фазовая ИСП-МС хроматограмма отделенной фракции.

10 На фигуре 15 показан список селенсодержащих соединений, обнаруженных в SELPLEX с использованием масс-спектроскопии и Orbitrap.

На фигуре 16 показаны профили молекулярной массы (SEC-ИСП-МС) разновидностей селена в отдельных фракциях SPE, элюированных в кислой (верхний график) и щелочной (нижний график) среде.

15 На фигуре 17 показано SEC-фракционирование трипсинового гидролизата экстракта дрожжевого белка.

На фигуре 18 показаны профили отдельных фракций SEC.

На фигуре 19 показан блоттинг образца L09-4531 и ОФ-ИСП-МС-хроматограммы блот-фрагментов номер VI и VII.

20 На фигуре 20 показаны типичные МС-спектры селенсодержащих соединений, обнаруженных в экстрактах образцов блоттинга (нерасторимых в воде).

На фигуре 21 представлен список селенсодержащих пептидов, обнаруженных в нерасторимом в воде экстракте дрожжей, обогащенных селеном, с использованием 1D гель-электрофореза, блоттинга и гидролиза с последующим ВЭЖХ-анализом, ИСП-25 МС-анализом образцов блоттинга и МС/МС (Orbitrap)-анализа образцов блоттинга.

На фигуре 22 показана гипертрофия сердца с повышением маркерных генов гипертрофии, в том числе Myh7 и Ankrd1, у 13-месячных мышей PolG. (A) увеличенный размер сердца и кардиомиоциты 13-14-месячных мышей PolG. Фотографии взяты из работы Dai et al (2010). (B) повышенная экспрессия Myh7 и Ankrd1 в сердце 13-месячных мышей PolG (темные столбики). Уровни экспрессии нормированы по мРНК Actb и представлены как среднее  $\pm$  SEM (n=6). \*P<0,01 по сравнению с их экспрессией в сердце 2-месячных мышей PolG (светлые столбики).

На фигуре 23 показана ослабленная экспрессия маркеров гипертрофии Myh7 и Ankrd1 в мышце сердца мышей после введения селена в виде дрожжей, обогащенных селеном;

35 данные получены посредством ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга. А. Экспрессия мРНК Myh7 (верхний график) в сердце контрольных (SD) и обработанных (SP) молодых и старых мышей PolG, полученная посредством ПЦР в реальном времени, и экспрессия белка Myh7 (средний график) у контрольных (SD) и обработанных (SP) старых мышей PolG, полученная посредством вестерн-блоттинга. Относительная

40 экспрессия белка Myh7 (нормированная по белку Actb в каждом образце) показана на нижнем графике. В. Экспрессия мРНК Ankrd1 (верхний график) в сердце контрольных (SD) и обработанных (SP) молодых и старых мышей PolG и белка Ankrd1 (средний график) у контрольных (SD) и обработанных (SP) старых мышей PolG. Количественная экспрессия белка Myh7 (нормированная по белку Actb в каждом образце) показана на

45 нижнем графике. Как на фигуре А, так и на фигуре В данные представлены в виде среднее  $\pm$  SEM для указанного количества мышей. \*P<0,05, \*\*P<0,01 при сравнении с контролем соответствующего возраста.

На фигуре 24 показана регуляция сигнального пути Nfat в сердце мышей за счет

введения селена в форме дрожжей, обогащенных селеном. А. Схематическое представление сигнального пути Cn/Nfat при гипертрофии сердца. Активность Nfat регулируется путями, включающими кальциневрин; S6K и Gsk3b. Серым цветом обозначены молекулы-мишени, обнаруженные в сердце во время экспериментов, выполненных при разработке вариантов реализации настоящей заявки, регулируемые селеном в форме дрожжей, обогащенных селеном. В. Вестерн-блоттинг Cn-A, pNfatc2, Gsk3b и pS6K1 в сердце контрольных (SD) и обработанных (SP) мышей в возрасте 13 месяцев. С. Количественный анализ уровня белков pNfatc2, Gsk3b и pS6K1 (нормированных по Actb или тубулину) в результатах вестерн-блоттинга. На фигуре 10 С данные представлены в виде среднее ± SEM для четырех мышей на группу. \*P<0,05, \*\*P<0,01.

На фигуре 25 показана усиленная экспрессия антигипертрофического гена Foxo3 в сердце мышей PolG, получавших корм с селеном в форме дрожжей, обогащенных селеном, в течение 374 дней. (А). QRT-ПЦР генов семейства Foxo демонстрирует 15 доминантную экспрессию Foxo3 в сердце мышей polG и повышенную экспрессию Foxo3 в сердце обработанных (SP) мышей PolG по сравнению с контрольными мышами (SD) PolG. (В-С). Повышенные уровни белка Foxo3 в сердце мышей polG после обработки селеном (SP) в течение 374 дней. На фигурах А и С данные представлены в виде среднее ± SEM для указанного количества мышей. \*P<0,05 по сравнению с контролем SD.

На фигуре 26 показана регуляция экспрессии Attn и Gadd45g на уровне мРНК у мышей PolG. А. QRT-ПЦР демонстрирует возрастное снижение экспрессии Atm в сердце мышей PolG и отмену этого снижения за счет введения селена в форме дрожжей, обогащенных селеном. В. Повышенная экспрессия мРНК Gadd45g у мышей PolG после введения селена в форме дрожжей, обогащенных селеном, в течение 374 дней. Данные 25 представлены в виде среднее ± SEM для указанного количества мышей на группу. Различные буквы на гистограммах представляют собой значительные различия, определенные с помощью дисперсионного анализа с последующим расчетом t-критерия Стьюдента.

На фигуре 27 показана регуляция экспрессии мРНК Ucp1-3 за счет обработки селеном 30 в сердце мышей PolG, выявленная с помощью QRT-ПЦР. Данные представлены в виде среднее ± SEM для указанного количества мышей на группу. \*\*P<0,01 при сравнении с экспрессией Ucp2 у контрольных особей.

На фигуре 28 показана QRT-ПЦР, демонстрирующая возрастное повышение экспрессии Lcn2 в сердце мышей PolG и ингибирование указанной возрастной 35 повышенной экспрессии за счет введения селена в форме дрожжей, обогащенных селеном. Данные представлены в виде среднее ± SEM для шести мышей на группу. Различные буквы на гистограмме представляют собой значительные различия, определенные с помощью дисперсионного анализа с последующим расчетом t-критерия Стьюдента.

На фигуре 29 показан повышенный уровень общего белка в скелетных мышцах здоровых мышей, получавших корм с добавкой селена в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP, SELPLEX), или без добавления селена (SD) в течение 3 месяцев. Данные представлены в виде среднее ± SEM для указанного количества образцов на группу. P<0,01.

На фигуре 30 показаны данные, полученные путем анализа с использованием микрочипа, указывающие на наличие повышенной экспрессии генов, участвующих в элонгации белка при синтезе белка в скелетных мышцах здоровых мышей, получавших в течение трех месяцев корм с добавлением селена в форме дрожжей, обогащенных

селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), по сравнению с контрольным кормом с добавлением селена в форме селенметионина (SM), с добавлением селена в виде сelenита натрия (SS) или кормом без добавления селена. Данные представлены в виде: среднее ± СО (n=6).

- 5 На фигуре 31 показаны данные, полученные путем анализа с использованием микрочипа, указывающие на наличие пониженной экспрессии молекул, участвующих в синтезе белка (Gsk3b, mTor, S6K1), и повышенной экспрессии ключевой молекулы сигнального пути синтеза белка (Prkaa2) в скелетных мышцах здоровых мышей, получавших в течение трех месяцев корм с добавлением селена в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), по сравнению с контрольным кормом с добавлением селена в форме селенметионина (SM), с добавлением селена в виде сelenита натрия (SS) или кормом без добавления селена. Данные представлены в виде: среднее ± СО (n=6).
- 10

- На фигуре 32 показана значительно пониженная экспрессия атрофических генов Trim63 и Fbxo32 в скелетных мышцах здоровых мышей, получавших в течение трех месяцев корм с добавлением селена в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), по сравнению с контрольным кормом с добавлением селена в форме селенметионина (SM), с добавлением селена в виде сelenита натрия (SS) или кормом без добавления селена. Данные представлены в виде: среднее ± СО (n=6).
- 15

- На фигуре 33 показана значительно пониженная экспрессия Acvr2b в скелетных мышцах здоровых мышей, получавших в течение трех месяцев корм с добавлением селена в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), по сравнению с контрольным кормом с добавлением селена в форме селенметионина (SM), с добавлением селена в виде сelenита натрия (SS) или кормом без добавления селена. Данные представлены в виде: среднее ± СО (n=6).
- 20

- На фигуре 34 показана повышенная экспрессия в дифференцированных мышечных сателлитных (стволовых) клетках скелетных мышц здоровых мышей, получавших в течение трех месяцев корм с добавлением селена в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), по сравнению с контрольным кормом с добавлением селена в форме селенметионина (SM), с добавлением селена в виде сelenита натрия (SS) или кормом без добавления селена (SD). Данные представлены в виде: среднее ± СО (n=6).
- 25

- На фигуре 35 показаны несколько неограничивающих примеров путей, регулируемых селеном в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, представленных в настоящей заявке), что приводит к увеличению массы общего белка скелетных мышц у субъекта, получающего указанные формы селена, обнаруженных в ходе экспериментов, выполненных при разработке вариантов реализации настоящей заявки.
- 30

- На фигуре 36 показана пониженная экспрессия MAP2K2 в скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном (Эксп. 4) по сравнению с контролем (Эксп. 1, без добавления селена, Эксп. 2, добавление селенметионина). Селенит натрия (Эксп. 3) также снижал экспрессию MAP2K2 в скелетных мышцах мышей.
- 35

- На фигуре 37 показано, что субъекты, получавшие селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, демонстрировали заметно пониженный уровень экспрессии гена FTO в ткани коры и

в ткани икроножной мышцы. Эксп. 1 демонстрирует экспрессию FTO у контрольных (SD) мышей, Эксп. 2 демонстрирует экспрессию FTO у мышей, получавших корм с селенметионином, Эксп. 3 демонстрирует экспрессию FTO у мышей, получавших корм с селенитом натрия, а Эксп. 4 демонстрирует экспрессию FTO у мышей, получавших корм с дрожжами, обогащенными селеном, содержащими 2% или менее неорганического селена (SELPLEX).

На фигуре 38 показано, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), приводило к значительному 5 усилению экспрессии PGC1- $\alpha$  и значительному снижению экспрессии Nr2F2 в скелетных мышцах по сравнению с контрольными субъектами (SD). \* $p<0,05$ .

На фигуре 39 показано, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), приводило к значительному 10 снижению экспрессии PGC1- $\alpha$  и значительному усилению экспрессии Nr2F2 в печени по сравнению с контрольными субъектами (SD). \* $p<0,05$ .

На фигуре 40 показаны (A) скорости потребления кислорода митохондриями (OCR), 15 измеренные в трех различных состояниях дыхательной цепи (включая синтез АТФ (состояние III), комплекс I-зависимую (NADH-зависимую) максимальную дыхательную емкость (состояние V FCCP), и комплекс II-зависимую (FADH-зависимую) максимальную дыхательную емкость (состояние Vsucc) в присутствии контроля (C), LVSe-MR (C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Se) (№6) и метилселенаденозина (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Se) (№9). (B) показано, что 20 селенсодержащий пептид LVSe-MR усиливал состояние III (7,7%), состояние V<sub>FCCP</sub> (13,3%) и состояние V<sub>succ</sub> (9,6%) по сравнению с контролем. Метилселенаденозин (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Se) (№9) усиливал состояние III (29,9%), состояние V<sub>FCCP</sub> (17,3%) и состояние 25 V<sub>succ</sub> (15,3%) по сравнению с контролем с использованием oxytherm.

На фигуре 41 показана активность ферментов митохондрий (активность PDHC, активность комплекса I и активность комплекса IV) в присутствии 0, 50, 500 и 1000 30 миллиардных долей (PPB) метилселенаденозина (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Se) (№9).

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем документе термины «дрожжи» и «дрожевые клетки» относятся к 35 эукариотическим микроорганизмам, относящимся к царству Fungi, обладающим клеточной стенкой, клеточной мембраной и внутриклеточными компонентами. Дрожжи не образуют отдельной таксономической или филогенетической группы. В настоящее время известно около 1500 видов; считается, что описан только 1% всех видов дрожжей.

Термин «дрожжи» часто воспринимается как синоним *S. cerevisiae*, однако на 40 филогенетическое разнообразие дрожжей указывает их принадлежность к отделам Ascomycota и Basidiomycota. Почкующиеся дрожжи («истинные дрожжи») относятся к порядку Saccharomycetales. Большинство видов дрожжей размножаются бесполым путем посредством почкования, хотя некоторые размножаются делением пополам.

Дрожжи являются одноклеточными, однако некоторые виды стали многоклеточными 45 путем формирования цепи соединенных почкующихся клеток, известных как псевдогифы, или ложные гифы. Размер дрожжей может сильно варьироваться в зависимости от вида, обычно их диаметр составляет 3-4 мкм, хотя некоторые дрожжи могут достигать размера более 40 мкм.

В настоящем документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» относятся к первичной последовательности аминокислот, соединенных ковалентными «пептидными связями». В общем случае пептид состоит из небольшого количества аминокислот, обычно из 2-50 аминокислот, и является более коротким, чем белок. Термин

"полипептид" включает пептиды и белки. В некоторых вариантах реализации пептид, полипептид или белок являются синтетическими, в то время как в других вариантах реализации пептид, полипептид или белок являются рекомбинантными или природными. Синтетический пептид - это пептид, полученный искусственным путем *in vitro* (т.е. не 5 продуцированный *in vivo*).

Термины «образец» и «проба» используются в самом широком смысле и охватывают образцы или пробы из любого источника. В настоящем документе термин «образец» относится к биологическим образцам, полученным от животных (в том числе людей) и охватывает жидкости, твердые вещества, ткани и газы. В некоторых вариантах 10 реализации настоящей заявки биологические образцы содержат спинномозговую жидкость (СМЖ), серозную жидкость, мочу, слону, кровь и препараты крови, например, плазму, сыворотку и т.п. В то же время эти примеры не следует рассматривать в качестве ограничения типов образцов, применяемых в настоящей заявке.

В настоящем документе термины «дрожжи, обогащенные селеном» и

15 «селенизированные дрожжи» относятся к любым дрожжам (например, *Saccharomyces cerevisiae*), культивируемым в среде, содержащей неорганические соли селена. Настоящая заявка не ограничена используемой солью селена. Фактически в настоящей заявке рассматривается применение различных солей селена, включая селенит натрия, селенат натрия, селенит кобальта или селенат кобальта, но не ограничиваясь ими. Свободный 20 селенметионин (например, не связанный с клеткой или дрожжами) также можно использовать в качестве источника селена для дрожжей, обогащенных селеном, поскольку дрожжи используют эту форму селена. Вследствие химического сходства между селеном и серой дрожжи во время культивирования используют селен вместо серы в соединениях, обычно являющихся внутриклеточными серусодержащими 25 органическими соединениями. Селенсодержащее соединение в таких препаратах дрожжей представляет собой селенметионин, присутствующий в форме, входящей в состав полипептидов/белков. Количество общего селена, присутствующего в клетке в форме селенметионина в таких препаратах, изменяется, однако может быть между 10 и 100%, 20-60%, 50-75% и между 60 и 75%. Остальное количество органического селена в 30 препаратах селенизированных дрожжей преимущественно состоит из промежуточных соединений пути биосинтеза селенметионина. Они включают селенцистеин, селенцистатионин, селенгомоцистеин и селенданозилселенметионин, но не ограничиваются ими. Количество остаточной неорганической слои селена в конечном продукте обычно очень невелико (например, <2%). В то же время настоящая заявка не 35 ограничена этим процентным количеством, поскольку препараты, содержащие большее (например, между 2 и 79%) или меньшее (например, между 0,1 и 2%) количество, чем данное процентное количество, также входят в настоящую заявку.

В настоящем документе термин «SELPLEX» относится к высушенным 40 нежизнеспособным дрожжам, обогащенным селеном (например, *Saccharomyces cerevisiae* с номером доступа CNCM 1-3060 в Collection Nationale De Cultures De Microorganisms (CNCM), Institut Pasteur, Париж, Франция), культивированным в периодической культуре с добавлением субстрата, что обеспечивает поэтапное добавление мелассы и солей селена таким образом, который минимизирует вредное действие солей селена на скорость роста дрожжей и обеспечивает оптимальное встраивание неорганического селена в 45 органический материал клеток. Остаточный неорганический селен удаляют (например, с помощью тщательной промывки), и его количество не превышает 2% от общего содержания селена.

В настоящем документе термин «органический селен» относится к любому

органическому соединению, в котором селен замещает серу. Таким образом, органический селен может относиться к любому из таких соединений, полученному в результате биосинтеза в дрожжах, или к химически синтезированным свободным органическим селенсодержащим соединениям. Примером последних является свободный

5 селенметионин.

В настоящем документе термин «неорганический селен» в общем случае относится к любой соли селена (например, селениту натрия, селенату натрия, селениту кобальта и селенату кобальта). Кроме того, существует большое количество других неорганических источников селена (см., например, соединения, перечисленные в

10 указателе Merck). Селенизированные дрожжи можно получить с использованием источника неорганического селена, включающего селенит натрия, селенат натрия, селенит кобальта, селенат кобальта, селеновую кислоту, селенистую кислоту, бромид селена, хлорид селена, гексафторид селена, оксид селена, оксибромид селена, оксихлорид селена, оксифторид селена, сульфиды селена, тетрабромид селена, тетрахлорид селена

15 и тетрафторид селена, но не ограничивающиеся ими.

В настоящем документе термин «соединение селена», «селенсодержащее соединение» и «селенсодержащий компонент» относятся к любому соединению, содержащему селен, способному являться биодоступным источником селена. Соединение селена может включать неорганические соединения, например, минералы, содержащие селениты и

20 селенаты, органические соединения, например, селеноэфиры, коньюгаты SeCys, содержащие ди- и трипептиды, селенолы, селеноксиды, селенсодержащие белки и пептиды, аминокислоту (например, изолейцин, аланин, лейцин, аспарагин, лизин, аспартат, метионин, цистеин, фенилаланин, глутамат, треонин, глутамин, триптофан, глицин, валин, пролин, серин, тирозин, аргинин, гистидин), содержащую селен (например,

25 путем замены атома серы) или двухвалентное или четырехвалентное соединение селена, дрожжи, обогащенные селеном, или их фракцию, а также селенсодержащие вещества, описанные в настоящем документе. Соединение селена может поставляться в виде дрожжевого или растительного экстракта или за счет коммерческого синтеза. В конкретном варианте реализации соединение селена обеспечивает биодоступный

30 источник селена, легко всасываемый организмом в плазму крови или межклеточную жидкость. В предпочтительных вариантах реализации селенсодержащее соединение является дрожжами, обогащенными селеном, или селенсодержащим веществом, представленным в настоящем документе, или происходит от этих соединений.

В настоящем документе термин «окислительный стресс» относится к

35 цитотоксическому действию кислородных радикалов (например, супероксид-аниона ( $O_2^-$ ), гидроксильного радикала (OH) и пероксида водорода ( $H_2O_2$ )), полученных, например, в качестве побочных продуктов метаболических процессов, использующих молекулярный кислород (см., например, Coyle et al., Science 262:689-695 (1993)).

40 В настоящем документе термины «хозяин», «субъект» и «пациент» относятся к любому животному, включая людей и животных, не являющихся человеком (например, собак, кошек, коров, лошадей, овец, домашнюю птицу, рыбу, ракообразных и т.д.), изученному, проанализированному, проверенному, продиагностированному и получившему лечение. В настоящем документе термины «хозяин», «субъект» и «пациент» используют на взаимозаменяемой основе, если не указано иное.

45 В настоящем документе термин «*in vivo*» относится к исследованиям и/или экспериментам, выполняемым с использованием живого организма, происходящего внутри биологического организма.

В настоящем документе термин «*in vitro*» относится к искусственной среде за

пределами живого организма и к биологическим процессам или реакциям, которые обычно должны протекать в организме, но протекают в искусственной среде. Среды *in vitro* могут включать пробирки и культуры клеток, но не ограничиваются ими.

5 Термины «вестерн-блоттинг», «вестерн-иммуноблоттинг», «иммуноблоттинг» и «вестерн» относятся к иммунологическому анализу белка(ов), полипептидов или пептидов, иммобилизованных на мембранном носителе. Белки сначала разделяют путем электрофореза в полиакриламидном геле (т.е. Электрофореза в ДСН-ПААГ) с последующим переносом белка из геля на твердый носитель, например, нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Иммобилизованные белки затем 10 подвергают воздействию антител, реагирующих с исследуемым антигеном. Связывание антитела (т.е. первичного антитела) обнаруживают за счет использования вторичного антитела, специфически связывающегося с первичным антителом. Вторичное антитело обычно конъюгировано с ферментом, обеспечивающим визуализацию комплекса антиген-антитело за счет продукции окрашенного продукта реакции или 15 катализирующим люминесцентную ферментативную реакцию (например, реагента ECL, Amersham).

В настоящем документе термин «твердофазный ИФА» относится к твердофазному иммуноферментному анализу (или ИФА). В данной области техники известны различные способы и варианты применения твердофазного ИФА, которые описаны во многих 20 источниках (см., например, Crowther, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)," in Molecular Biotechnology Handbook, Rapley et al. (eds.), pp. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N.J. (1998); Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Ch. 11, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)). Кроме того, существуют многочисленные 25 доступные для приобретения тест-системы на основе твердофазного ИФА.

В настоящем документе термины «репортерный реагент», «репортерная молекула», «субстрат для обнаружения» и «реагент для обнаружения» используются по отношению к реагентам, обеспечивающим обнаружение и/или количественного анализа антитела, связанного с антигеном. Например, в некоторых вариантах реализации репортерный 30 реагент представляет собой колориметрический субстрат фермента, конъюгированного с антителом. Добавление подходящего субстрата к коньюгату антитело-фермент приводит к продукции колориметрического или флуориметрического сигнала (например, после связывания конъюгированного антитела с исследуемым антигеном). Другие 35 репортерные реагенты включают радиоактивные соединения, но не ограничиваются ими. Это определение также охватывает применение соединений на основе биотина и авидина (например, включая нейтравидин и стрептавидин, но не ограничиваясь ими) в составе системы обнаружения.

В настоящем документе термин «сигнал» используется в основном по отношению к любому обнаруживаемому процессу, указывающему на осуществление реакции, 40 например, связывания антитела с антигеном. Считается, что сигналы в виде радиоактивности, флуориметрических или колориметрических продуктов/реагентов находят применение в рамках настоящей заявки. В различных вариантах реализации настоящей заявки сигнал оценивают качественно, в то время как в альтернативных вариантах реализации сигнал оценивают количественно.

45 В настоящем документе термин «твердый носитель» используется по отношению к любому твердому или неподвижному материалу, к которому присоединяются реагенты, например, антитела, антигены и другие компоненты для анализа. Например, в способе на основе твердофазного ИФА твердым носителем являются лунки титрационного

микропланшета. Другие примеры твердых носителей включают предметные стекла для микроскопии, покровные стекла, гранулы, частицы, флаконы для культивирования клеток, а также многие другие подходящие объекты.

В настоящем документе термин «оценка характеристик ткани у субъекта» относится

5 к выявлению одного или более свойств образца ткани. В некоторых вариантах реализации характеристики тканей оценивают посредством выявления экспрессии различных генов, подробно описанных в настоящем документе, или ее отсутствия.

10 В настоящем документе термин «реагент(ы), способные специфически обнаруживать экспрессию генов» относится к реагентам, способным к или достаточным для обнаружения экспрессии различных генов, подробно описанных в настоящем документе. Примеры подходящих реагентов включают нуклеотидные зонды, способных к специфической гибридизации с мРНК или кДНК и антитела (например, моноклональные или поликлональные антитела), но не ограничиваются ими.

15 В настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству композиции (например, содержащей селен - например, SELPLEX), достаточному для получения благоприятных или желательных результатов. Эффективное количество можно ввести в ходе однократного или большего количества введений, нанесений или приемов; его не следует рассматривать в качестве ограничения настоящей заявки конкретным составом или способом введения.

20 В настоящем документе термин «введение» относится к акту применения лекарственного средства, пролекарства или другого агента, или терапевтического лечения (например, с применением композиции согласно настоящей заявки) по отношению к субъекту (например, субъекту или клеткам, тканям и органам *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*). Типичные пути введения в организм человека могут предусматривать введение через глаза (офтальмологическое), рот (пероральное), кожу (наружное или трансдермальное), нос (назальное), легкие (ингаляционное), слизистую ротовой полости (буккальное), ушное, ректальное, вагинальное, посредством инъекции (например, внутривенное, подкожное, внутриопухолевое, внутрибрюшинное и т.д.) и т.п.

25 В настоящем документе термин «совместное введение» относится к введению по меньшей мере двух агентов (например, композиции, содержащей SEL-PLEX или одного или более селенсодержащих соединений, присутствующих в ней или полученных из нее) и одного или более из других агентов (например, терапевтических) или лекарственных средств субъекту. В некоторых вариантах реализации совместное введение двух или более агентов или лекарственных средств является одновременным. В других вариантах реализации 30 первого агента/лекарственное средство вводят перед вторым агентом/лекарственным средством. Специалисты в данной области техники должны понимать, что составы и/или пути введения различных применяемых агентов или лекарственных средств могут меняться. Специалист в данной области техники может определить подходящую дозировку для совместного введения. В некоторых вариантах реализации 35 при совместном введении агентов или лекарственных средств соответствующие агенты или лекарственные средства вводят в более низких дозировках, чем дозировки, подходящие для их введения по отдельности. Таким образом, совместное введение особенно желательно в вариантах реализации, где совместное введение агентов или лекарственных средств снижает необходимую дозировку потенциально вредного 40 (например, токсичного) агента(ов), и/или где совместное введение двух или более агентов приводит к сенсибилизации субъекта к благоприятному действию одного из агентов за счет совместного введения другого агента.

45 В настоящем документе термин «лечение» или его грамматические эквиваленты

включает улучшение и/или регрессию симптомов заболевания. Соединение, которое приводит к улучшению любого параметра, связанного с заболеванием, при его применении в способах скрининга согласно настоящей заявки, можно тем самым идентифицировать в качестве терапевтического соединения. В настоящем документе

- 5 термин «подверженный риску заболевания» (например, подверженный риску гипертрофической кардиомиопатии, диабета, рака и т.д.) относится к субъекту (например, человеку), предрасположенному к конкретному заболеванию (например, гипертрофической кардиомиопатии, диабету, раку и т.д.). Эта предрасположенность может быть генетической (например, особой генетической склонностью к заболеванию,
- 10 например, наследственным расстройствам), или обусловленной другими факторами (например, гипертензией, возрастом, массой тела, условиями окружающей среды, воздействием вредных соединений, присутствующих в окружающей среде и т.д.). Таким образом, не следует считать, что настоящая заявка ограничивается каким-либо конкретным риском, или что настоящая заявка ограничивается каким-либо конкретным
- 15 заболеванием.

В настоящем документе термин «страдающий от заболевания» (например, страдающий о гипертрофической кардиомиопатии, диабета, рака и т.д.) относится к субъекту (например, человеку), испытывающему конкретное заболевание (например, гипертрофическую кардиомиопатию, диабет, рак и т.д.). Не следует считать, что

- 20 настоящая заявка ограничивается какими-либо конкретными признаками или симптомами или заболеванием. Таким образом, предполагается, что настоящая заявка охватывает субъектов, испытывающих любые заболевания (например, от субклинических проявлений до полномасштабного заболевания), причем у субъекта наблюдают по меньшей мере некоторые из показаний (например, признаков и
- 25 симптомов), связанных с конкретным заболеванием.

В настоящем документе термины «заболевание» и «патологическое состояние» используются на взаимозаменяемой основе для описания состояния, признаков и/или симптомов, связанных с любым нарушением нормального состояния живого животного или любого из его органов или тканей, которое нарушает или изменяет выполнение

- 30 обычных функций и может являться ответом на факторы окружающей среды (например, нарушения питания, промышленные угрозы или климат), конкретных возбудителей заболеваний (например, червей, бактерий или вирусы), врожденные дефекты организма (например, различные генетические аномалии, или комбинации указанных и других факторов.

- 35 Термин «соединение» относится к любой химической структуре, фармацевтическому средству, лекарственному веществу и т.п., которые можно использовать для лечения или предотвращения заболевания, болезни, болезненного состояния или расстройства функций организма. Соединения включают как известные, так и потенциальные терапевтические соединения. Терапевтические свойства соединения можно определить
- 40 путем проведения скрининга с использованием способов скрининга согласно настоящей заявке. «Известное терапевтическое соединение» относится к терапевтическому соединению, для которого продемонстрирована (например, в ходе исследований на животных или предшествующего применения на людях) эффективность при таком лечении. Другими словами, известное терапевтическое соединение не ограничивается
- 45 соединениями, эффективно лечащими заболевание (например, нейродегенеративное заболевание).

В настоящем документе термин «набор» используется по отношению к комбинации реагентов и других материалов. Предполагается, что набор может содержать такие

реагенты, как питательные вещества и лекарственные средства, а также средства для введения. Не следует считать, что термин «набор» ограничивается какой-либо конкретной комбинацией реагентов и/или других материалов.

В настоящем документе термин «токсичный» относится к любому вредоносному

5 или повреждающему действию по отношению к субъекту, клетке или ткани по сравнению с аналогичной клеткой или тканью до введения токсического соединения.

В настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» относится к комбинации активного агента (например, композиции, содержащей SEL-PLEX и/или одно или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в нем или получаемых 10 из него) с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Термины «фармацевтически приемлемый» или «фармакологически приемлемый» в настоящем документе относятся к композиции, не вызывающей существенно 15 нежелательных реакций, например, токсического действия, аллергических или иммунологических реакций при введении субъекту.

В настоящем документе термин «местно» относится к нанесению композиции согласно настоящей заявке на поверхность кожи и слизистых оболочек клеток и тканей (например, слизистой оболочки альвеол, щек, языка, жевательных поверхностей или носа и другие 20 ткани и клетки, выстилающие полые органы или полости тела).

В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, включая физиологический раствор с фосфатным буфером, воду, эмульсии (например, эмульсии типа масло/вода или вода/масло) и различные виды увлажнителей, всевозможные растворители,

25 дисперсионные среды, покрытия, лаурилсульфат натрия, изотонические и абсорбирующие задерживающие агенты, разрыхлители (например, картофельный крахмал или крахмал-гликолят натрия) и т.п., но не ограничиваясь ими. Кроме того, композиции могут содержать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адьювантов. (См., например, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 30 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975), включенную в настоящий документ посредством ссылки).

В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к любой соли (например, полученной посредством реакции с кислотой или основанием) соединения согласно настоящей заявке, физиологически переносимой для целевого

35 субъекта (например, субъекта-млекопитающего, и/или клеток, тканей или органов *in vivo* или *ex vivo*). «Соли» соединений согласно настоящей заявке можно получить из неорганических или органических кислот и оснований. Примеры кислот включают соляную, бромистоводородную, серную, азотную, хлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликоловую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-р-сульфоновую,

40 винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, сульфоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и т.п., но не ограничиваются ими. Другие кислоты, например, щавелевая, хотя и не являются сами по себе фармацевтически приемлемыми, могут использоваться при получении солей, применяемых в качестве промежуточных соединений при получении 45 соединений согласно настоящей заявке и их фармацевтически приемлемых солей добавления кислоты.

Примеры оснований включают, но не ограничиваются ими, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочноземельных металлов (например,

магния), аммиак и соединения формулы  $NW_4^+$ , где W представляет собой  $C_{1-4}$ -алкил и т.п.

Примеры солей включают, но не ограничиваются следующими, ацетат, адипинат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, флукогептanoат, глицерофосфат, гемисульфат, гептanoат, гексаноат, хлорид, бромид, иодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат, ундеканоат и т.п. Другие примеры солей включают анионы соединений согласно настоящей заявке в сочетании с подходящим катионом, например,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  и  $NW_4^+$  (где W представляет собой  $C_{1-4}$ -алкильную группу) и т.п. Для терапевтического применения соли соединений согласно настоящей заявке рассматриваются как фармацевтически приемлемые. В то же время, соли кислот и оснований, не являющихся фармацевтически приемлемыми, также могут найти применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

Для терапевтического применения соли соединений согласно настоящей заявке рассматриваются как фармацевтически приемлемые. В то же время, соли кислот и оснований, не являющихся фармацевтически приемлемыми, также могут найти применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

Термин «выделение» по отношению к нуклеиновой кислоте, а также термины «выделенный олигонуклеотид» или «выделенный полинуклеотид» относятся к нуклеотидной последовательности, выявленной и отделенной от по меньшей мере одного компонента или загрязнителя, с которым она обычно связана в природных источниках. Выделенная нуклеиновая кислота присутствует в форме или в окружении, отличающихся от формы или окружения, в которых она встречается в природе. В противоположность этому, невыделенные нуклеиновые кислоты представляют собой нуклеиновые кислоты, например, ДНК и РНК, в состоянии, в котором они существуют в природе. Например, заданная последовательность ДНК (например, ген) находится на хромосоме клетки-хозяина вблизи от соседних генов; последовательности РНК, например, определенная последовательность мРНК, кодирующая определенный белок, находится в клетке в виде смеси с многочисленными другими мРНК, кодирующими множество белков. Однако выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая заданный белок, включает, в качестве примера, такую нуклеиновую кислоту в клетках, обычно экспрессирующих заданный белок, причем указанная нуклеиновая кислота находится в положении на хромосоме, отличающимся от ее положения в естественных клетках, или, другими словами, фланкирована нуклеотидными последовательностями, отличающимися от последовательностей, встречающихся в природе. Выделенная нуклеиновая кислота, олигонуклеотид или полинуклеотид могут находиться в одноцепочечной или двуцепочечной форме. При использовании выделенной нуклеиновой кислоты, олигонуклеотида или полинуклеотида для экспрессии белка указанный олигонуклеотид или полинуклеотид должен содержать как минимум смысловую или кодирующую цепь (т.е. олигонуклеотид или полинуклеотид могут быть одноцепочечными), но может содержать как смысловую, так и антисмысловую цепи (т.е. олигонуклеотид или полинуклеотид могут быть двуцепочечными).

В настоящем документе термин «очищенный» или «очищать» относится к удалению

компонентов (например, загрязняющих веществ) из образца. Например, антитела очищают путем удаления загрязняющих неиммуноглобулиновых белков; их также очищают путем удаления иммуноглобулинов, не связывающихся с молекулой-мишенью. Удаление неиммуноглобулиновых белков и/или удаление иммуноглобулинов, не

5 связывающихся с молекулой-мишенью, приводит к увеличению процентного содержания иммуноглобулинов, реагирующих с мишенью, в образце. В еще одном примере рекомбинантные полипептиды экспрессируют в бактериальных клетках-хозяевах и очищают путем удаления белков клетки-хозяина; таким образом, в образце увеличивается процентное содержание рекомбинантных полипептидов.

10 В настоящем документе термин «высокоэффективная жидкостная хроматография» и термин «ВЭЖХ» относятся к форме жидкостной хроматографии для разделения соединений. Соединения растворяют в растворе. Соединения разделяют путем инъекции порции смеси образца в колонку. Приборы ВЭЖХ включают резервуар с подвижной фазой, насос, инжектор, разделительную колонку и детектор. Присутствие анализов 15 на выходе колонки регистрируется путем количественного обнаружения изменения индекса преломления, оптической плотности в УФ/видимом спектре при подходящей длине волны, флуоресценции после возбуждения светом с подходящей длиной волны или электрохимической реакции.

20 В настоящем документе термин «сканирующая электронная микроскопия» и термин «СЭМ» относятся к виду электронного микроскопа, получающего изображения поверхности образца путем его сканирования пучком высоконергетических электронов по шаблону растрового сканирования. Электроны взаимодействуют с атомами, составляющими образец, генерируя сигналы, которые содержат сведения о топографии поверхности образца, составе и других свойствах, например, электропроводности.

25 В настоящем документе термин «фиксирующий агент» относится к химическому веществу, которое способно фиксировать одно вещество на другом с целью «фиксации», стабилизации или сохранения вещества в его нынешнем виде иным образом для предотвращения его разложения или других вариантов изменения. Часто фиксирующие агенты применяют в сканирующей электронной микроскопии (SEM) для подготовки 30 образца. Первичный фиксирующий агент: в настоящем документе термин «первичный фиксирующий агент» относится к первому фиксирующему агенту, используемому для «фиксации» вещества. Вторичный фиксирующий агент: в настоящем документе термин «вторичный фиксирующий агент» относится к второму фиксирующему агенту, используемому для «фиксации» вещества. Третичный фиксирующий агент: в настоящем 35 документе термин «третичный фиксирующий агент» относится к третьему фиксирующему агенту, используемому для «фиксации» вещества.

В настоящем документе термин «аналит» относится к атому, молекуле, группировке атомов или молекул, веществу или химическому компоненту. Анализ сам по себе нельзя измерить; вместо этого можно определить аспекты или свойства (физические, 40 химические, биологические и т.д.) анализа с использованием аналитических процедур, например, ВЭЖХ. Например, нельзя измерить «стул» (аналит - компонент) сам по себе, однако можно измерить высоту, ширину и т.д. стула. Аналогичным образом, нельзя измерить микотоксин, но можно измерить флуоресценцию микотоксина, связанную с его концентрацией.

45 В настоящем документе термин «сигнал» используется в основном по отношению к любому обнаруживаемому процессу, указывающему на осуществление реакции, например, связывания антитела с антигеном. Сигналы можно оценить как качественно, так и количественно. Примеры видов «сигналов» включают радиоактивные сигналы,

флуориметрические сигналы или колориметрические сигналы продукта/реагента, но не ограничиваются ими.

В настоящем документе термин «биодоступность» относится к части молекулы или компонента, которая доступна для организма или проникает в системный кровоток.

5 При внутривенном введении молекулы или компонента его биодоступность составляет 100%. Однако при введении молекулы или компонента другим путем (например, перорально) его биодоступность снижается (из-за неполного всасывания и пресистемного метаболизма).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Энергия, полученная путем передачи электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), используется для перекачки протонов из митохондриального матрикса в межмембранное пространство, создавая электрохимический протонный градиент через внутреннюю мембрану митохондрий (ИММ) под названием  $\Delta\psi$ . Этот электрохимический 15 протонный градиент позволяет АТФ-синтазе (АТФазе) использовать поток  $H^+$  через фермент обратно в матрицу для получения АТФ из аденоzinидифосфата (АДФ) и неорганического фосфата. В митохондриях выявлены четыре мембраносвязанных комплекса. Каждый из них является трансмембранный структурой, встроенной во внутреннюю мембрану. Три из них являются протонными насосами. Структуры 20 электрически соединены липидорастворимыми переносчиками электронов и водорастворимыми переносчиками электронов. Комплекс I (НАДР-кофермент Q-редуктаза; отмеченный как I) принимает электроны от переносчика электронов цикла Кребса - никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и передает их на кофермент Q (убихинон; (UQ)), который также получает электроны от комплекса II (сукцинатдегидрогеназы; (II)). UQ передает электроны на комплекс III (комплекс 25 цитохрома  $bc_1$ ; (III)), который передает их на цитохром с (сyt c). Сyt c передает электроны на комплекс IV (цитохром с-оксидазу; (IV)), который использует электроны и ионы водорода для снижения содержания молекулярного кислорода в воде.

В комплексе I (НАДН-дегидрогеназа, также называемая НАДН:

30 убихиноноксидоредуктазой) два электрона удаляются из NADH и передаются на липидорастворимый переносчик убихинон (Q). Восстановленный продукт, убихинол ( $QH_2$ ) свободно диффундирует в мембрану, и комплекс I транслоцирует четыре протона ( $H^+$ ) через мембрану, таким образом генерируя протонный градиент. Комплекс I является одним из главных сайтов, где происходит преждевременная утечка электронов 35 на кислород, и, таким образом, одним из главных сайтов продукции вредоносного супероксида. Таким образом, он, наряду с комплексом III, продуцирует большую часть активных форм кислорода (главным образом супероксид-радикалов), генерируемых электрон-транспортной цепью. Считается, что помимо генетических мутаций, митохондриальная дисфункция обусловлена главным образом повреждениями 40 компонентов митохондрий, вызванными активными формами кислорода (АФК) (см., например, Kirkinezos and Moraes, 2001). Фактически существует общепринятое мнение, что процесс старения и возникновения метаболических заболеваний (например, диабета 2 типа) происходит за счет АФК-индуцированных повреждений клеток. Митохондрии являются основными производителями АФК внутри клетки, и это означает, что они также 45 являются первыми органоидами, подвергающимися так называемому окислительному стрессу, вызванному АФК (см., например, Kaneto et al., 2012). Значительное количество митохондриальных заболеваний специфически связаны дисфункцией или недостаточностью комплекса I.

Перенос электронов осуществляется по следующему пути: НАДН окисляется до НАД<sup>+</sup>, восстанавливая flavинмононуклеотид до ФМНН<sub>2</sub> за один этап с участием двух электронов. ФМНН<sub>2</sub> затем окисляется за два одноэлектронных этапа через образование 5 семихинонового промежуточного соединения. Таким образом, каждый электрон переносится с ФМНН<sub>2</sub> на Fe-S-кластер, а с Fe-S-кластера на убихинон (Q). Перенос первого электрона приводит к образованию свободно-радикальной (семихиноновой) формы Q, а перенос второго электрона восстанавливает семихиноновую форму в убихинольную форму QH<sub>2</sub>. В ходе этого процесса четыре протона переносятся из 10 митохондриального матрикса в межмембранные пространство.

В комплексе II (сукцинатдегидрогеназа) дополнительные электроны доставляются в хиноновый пул (Q), получаемый из сукцината и (через ФАД) переносятся на Q. Комплекс II включает четыре белковых субъединицы: SDHA, SDHB, SDHC и SDHD. Другие доноры электронов (например, жирные кислоты и глицерин-3-фосфат) также 15 отдают электроны Q (через ФАД).

В комплексе III (комплекс цитохромов bc<sub>1</sub>) Q-цикл участвует в формировании протонного градиента за счет асимметричного поглощения/высвобождения протонов. Два электрона удаляются из QH<sub>2</sub> в сайте Q<sub>O</sub> и последовательно переносятся на две 20 молекулы цитохрома с, водорастворимого переносчика электронов, расположенного в межмембранных пространствах. Два других электрона последовательно проходят через этот белок на сайт Q<sub>i</sub>, где хиноновая группа убихинона восстанавливается до хинола. Протонный градиент формируется посредством окисления двух хинолов (4Н+ 4e-) на сайте Q<sub>O</sub> с образованием одного хинола (2Н+2e-) на сайте Q<sub>i</sub>. (в общей сложности 25 транслоцируется шесть протонов: два протона восстанавливают хинон до хинола и четыре протона высвобождаются из двух молекул убихинола).

В комплексе IV (цитохром с-оксидаза), иногда называемом цитохромом A3, четыре 30 электрона удаляются из четырех молекул цитохрома с и переносятся на молекулярный кислород (O<sub>2</sub>), образуя две молекулы воды. Одновременно четыре протона удаляются из митохондриального матрикса (хотя только два из них транслоцируются через мембрану), внося вклад в протонный градиент. Цианид ингибирует активность цитохром с-оксидазы.

Электрон-транспортная цепь и окислительное фосфорилирование сопряжены через 35 протонный градиент на внутренней мембране митохондрий. Поток протонов из митохондриального матрикса создает электрохимический градиент (протонный градиент). Этот градиент используется F<sub>O</sub>F<sub>1</sub> АТФ-сингазным комплексом для получения АТФ посредством окислительного фосфорилирования. АТФ-сингазу иногда называют комплексом V электрон-транспортной цепи. Компонент F<sub>O</sub> АТФ-сингазы действует 40 как ионный канал, обеспечивающий поток протонов обратно в митохондриальный матрикс. Этот поток высвобождает свободную энергию, продуцируемую во время образования окисленных форм переносчиков электронов (НАД<sup>+</sup> и Q). Эта свободная энергия используется для синтеза АТФ, катализируемого компонентом F<sub>1</sub> данного комплекса.

45 Таким образом, комплекс I (НАДН: убихиноноксидоредуктаза) является первым ферментом дыхательной цепи митохондрий. Он получает от НАДН энергию, продуцированную путем окисления углеводов и жиров, и фиксирует энергию в виде разности потенциалов или напряжения по обе стороны внутренней мембраны

митохондрий. Эта разность потенциалов используется для энергетической подпитки синтеза АТФ. Поскольку комплекс I имеет центральное значение для продукции энергии в клетке, его отказ приводит к широкому спектру нервно-мышечных заболеваний. Некоторые из них обусловлены мутациями в митохондриальном геноме, однако другие обусловлены снижением активности комплекса I или повышенной продукцией активных форм кислорода.

Инсулиннезависимый сахарный диабет (СД II типа) представляет собой заболевание, характеризующееся инсулинрезистентностью скелетных мышц, печени и жировой ткани в сочетании с дефектами секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы.

- 10 Устойчивость к инсулину является центральным элементом диабета II типа. Например, известно, что подавляющее большинство пациентов с сахарным диабетом II типа устойчивы к инсулину. Аналогичным образом, инсулинрезистентность у потомков пациентов с сахарным диабетом II типа является лучшим прогностическим фактором для последующего развития данного заболевания (см., например, Warram et al., 1990).
- 15 Вмешательства, которые снижают инсулинрезистентность, также предотвращают развитие диабета. Работа митохондрий необходима для нормальной секреции инсулина из бета-клеток поджелудочной железы, стимулируемой глюкозой.

Скелетные мышцы и печень являются двумя ключевыми инсулин-чувствительными органами в поддержании гомеостаза глюкозы. Переход этих органов в состояние инсулинрезистентности обуславливает большую часть изменений метаболизма глюкозы, наблюдавшихся у пациентов с сахарным диабетом II типа (см., например, Lowell and Shulman, 2005). Скелетные мышцы являются более важным из этих двух органов с точки зрения последствий развития инсулинрезистентности. Это обусловлено тем, что скелетные мышцы, как обнаружено, утилизируют или перерабатывают от 80 до 90% ежедневно потребляемой глюкозы (см., например, DeFronzo et al., 1985).

Расширенный анализ геномной экспрессии документально подтвердил, что митохондриальные гены окислительного фосфорилирования (OXPHOS) демонстрируют пониженную экспрессию у лиц с преддиабетом и диабетом по сравнению с здоровыми контрольными субъектами, и что эти гены во многих случаях являются мишениями коактиватора транскрипции - 1-альфа коактиватора пролифератор-активируемого гамма-рецептора, (PGC1- $\alpha$ , см., например, Mootha et al., 2003). В этих исследованиях типичное снижение экспрессии генов OXPHOS было умеренным (примерно 20%), но очень постоянным; 89% исследованных генов демонстрировали пониженную экспрессию у лиц с нарушением переносимости глюкозы или диабетом II типа по сравнению с лицами с обычной переносимостью глюкозы.

Специалисты в данной области техники в основном считают и принимают во внимание, что лекарственные вещества или агенты, которые повышают активность OXPHOS в мышцах, применяются в качестве ценных терапевтических средств для лечения диабета 2 типа. В качестве подтверждения этой гипотезы, давно известно, что аэробные упражнения являются лучшим нефармакологическим вмешательством при лечении диабета, поскольку они увеличивают активность и количество митохондрий и стимулируют экспрессию генов OXPHOS.

Кроме диабета типа 2, существует много заболеваний и состояний, связанных с митохондриальной дисфункцией. Поскольку митохондрии являются основным источником энергии в клетках высших организмов, они обеспечивают прямую и косвенную биохимическую регуляцию широкого спектра клеточных дыхательных, окислительных и метаболических процессов. К ним относится активность электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), которая управляет окислительным фосфорилированием,

производя метаболическую энергию в форме аденоинтрифосфата (АТФ), и которая также лежит в основе центральной функции митохондрий во внутриклеточном гомеостазе кальция.

Помимо их роли в производстве энергии в растущих клетках, митохондрии (или по 5 меньшей мере компоненты митохондрий) участвуют в запрограммированной гибели клеток (PCD), также известной как апоптоз (см., например, Newmeyer et al., Cell 1994, 79:353-364; Liu et al., Cell 1996, 86:147-157). Апоптоз необходим для нормального развития 10 нервной системы и для надлежащего функционирования иммунной системы. Кроме того, считается, что некоторые болезненные состояния связаны с чрезмерным или недостаточным уровнем апоптоза (например, рак и аутоиммунные заболевания и 15 повреждения от инсульта и нейродегенерация при болезни Альцгеймера в последнем случае, соответственно). Документально подтверждена роль митохондрий в апоптозе (см., например, Green and Reed, Science, 1998, 281:1309-1312; Green, Cell, 1998, 94:695-698; и Kromer, Nature Medicine, 1997, 3:614-620). Измененная или дефектная митохондриальная 20 активность, включая сбой на любом этапе ЭТЦ, но не ограничиваясь им, может привести к образованию высокоактивных свободных радикалов, которые могут повреждать клетки и ткани. Эти свободные радикалы могут включать активные формы кислорода (АФК), например, супероксид, пероксинитрит и гидроксил-радикалы и, возможно, другие активные формы, которые могут быть токсичны для клеток. Например, 25 перекисное окисление липидов, индуцируемое свободными радикалами кислорода, является хорошо организованным патогенетическим механизмом повреждения центральной нервной системы (ЦНС), как это имеет место при ряде дегенеративных заболеваний и ишемии (например, инсульте).

В дополнение к повреждению тканей, опосредованному свободными радикалами, 25 существуют по меньшей мере два пагубных последствия воздействия активных свободных радикалов, обусловленные митохондриальной дисфункцией, которая сама по себе негативно влияет на митохондрии. Во-первых, повреждения, опосредованные свободными радикалами, могут инактивировать один или более из белков ЭТЦ. Во-вторых, повреждения, опосредованные свободными радикалами, могут привести к 30 коллапсу митохондрий, который называют «переходной проницаемостью» (РТ) или «митохондриальной переходной проницаемостью» (МРТ). Согласно общепринятой теории функции митохондрий и описанию, приведенному в настоящем документе, надлежащая дыхательная активность ЭТЦ требует поддержания электрохимического потенциала внутренней митохондриальной мембранны за счет сопряженного 35 хемиосмотического механизма. Окислительная активность свободных радикалов может рассеять этот мембранный потенциал, тем самым предотвращая биосинтез АТФ и прекращая продукцию жизненно важного источника биохимической энергии. Кроме того, возможна утечка митохондриальных белков, например, цитохрома с, из митохондрий за счет переходной проницаемости, что может индуцировать генетически 40 запрограммированную последовательность клеточного суицида, известную как апоптоз или запрограммированная гибель клетки.

Заболевания, ассоциированные с митохондриями (например, вызванные дисфункцией 45 митохондрий), также могут быть связаны с потерей электрохимического потенциала митохондриальной мембранны за счет механизмов, не связанных с окислением свободных радикалов, а переходная проницаемость может возникать за счет прямого или косвенного действия митохондриальных генов, продуктов генов или связанных с ними молекул-медиаторов следующих звеньев метаболических путей, и/или внemитохондриальных генов, продуктов генов или связанных с ними медиаторов

следующих звеньев метаболических путей, или других известных или неизвестных причин. Поэтому потеря потенциала митохондрий может являться критическим событием при прогрессировании заболеваний, ассоциированных с измененной функцией митохондрий, в том числе дегенеративных заболеваний, а также заболеваний/состояний, связанных со старением (например, рака, сердечно-сосудистых заболеваний и сердечной недостаточности, диабета 2 типа, болезней Альцгеймера и Паркинсона, жировой дегенерации печени, катаректы, остеопороза, атрофии мышц, расстройств сна и воспалительных заболеваний, например, псориаза, артрита и колита).

#### Кардиомиопатия

ДНК-полимераза с (POLG), кодируемая ядерными генами, является единственной известной ДНК-полимеразой в митохондриях клеток животных. Мутации в гене POLG человека связаны с многочисленными заболеваниями, ассоциированными с целым рядом симптомов, включая офтальмоплегию, катаректу, прогрессирующую мышечную слабость, паркинсонизм, преждевременную недостаточность яичников, мужское бесплодие, потерю слуха (пресбиакузис) и кардиологическую дисфункцию (см., например, Kujoth et al., PLoS Genetics, 2007. 3(2)). Модель мыши PolG<sup>(D257A)</sup> демонстрирует прогрессирующее снижение дыхательной функции комплексов, кодируемых митохондриальными генами, в возрасте 12 недель, что приводит к пониженному потреблению кислорода и снижению продукции АТФ (см., например, Kujoth et al., PLoS Genetics, 2007. 3(2)). Сообщалось, что мыши PolG демонстрируют фенотипы с ускоренным старением сердца, выраженной гипертрофией сердца, на которую указывает увеличенный размер сердца и кардиомиоцитов в возрасте 13-14 месяцев (см., например, Dai et al 2010, Kujoth et al., 2005 и фиг. 25А).

Гипертрофическая кардиомиопатия (HCM) является наиболее распространенной моногенно наследуемой формой сердечных заболеваний и наиболее распространенной причиной внезапной сердечной смерти у людей моложе 35 лет (см., например, Frey et al., Nat Rev Cardiol, 2012. 9(2): р. 91-100). Генетические мутации, лежащие в основе HCM, хорошо изучены, причем большинство из этих мутаций кодируют саркомерные белки, например, миозин-7 (также известный как тяжелая цепь β-миозина сердечной мышцы; MYH7) (мм., например, Frey et al., Nat Rev Cardiol, 2012. 9(2): р. 91-100).

Сердечный белок с анкириновым повтором (CARP) кодируется геном ANKRD1, и экспрессия гена ANKRD1 и ядерный фактор CARP вовлечены в гипертрофию левого желудочка, сердечную недостаточность у человека, дилатационную кардиомиопатию (DCM) и адиамицин-индуцированную кардиомиопатию (см., например, Duboscq-Bidot et al., Archives of Cardiovascular Diseases, 2009. 102, Supplement 1(0): р. S73). В соответствии с описанными фенотипами, возрастная экспрессия маркеров гипертрофии сердца Myh7 и Ankrd1 была повышена в ткани сердца старых мышей POLG по сравнению с молодыми мышами POLG.

Таким образом, эмпирические данные, полученные в ходе экспериментов, проведенных во время разработки вариантов реализации настоящей заявки, позволили установить, что мыши линии PolG являлись прекрасной экспериментальной моделью гипертрофии сердца. Например, обнаружено, что мыши PolG представляют собой живую модель старения сердца на животных, что, в свою очередь, позволило выполнить анализ/тестирование конкретных молекул, вовлеченных в старения и гипертрофию сердца (например, на уровне генов и белков). Кроме того, обнаружено, что модель PolG позволяет оценить и исследовать характеристики соединений, изменяющих специфические молекулы, участвующие в старении и гипертрофии сердца (например, на уровне генов и белков). Таким образом, в некоторых вариантах настоящей заявки

предложен способ выявления тестируемых соединений (например, для лечения или предотвращения гипертрофической кардиомиопатии), включающий воздействие на мышей PolG, демонстрирующих выраженную гипертрофию сердца, на которую указывают увеличенные размеры сердца и кардиомиоцитов в возрасте 13-14 месяцев, 5 одного или нескольких соединений и обнаружение изменений размера сердца или кардиомиоцитов и/или экспрессии молекул, вовлеченных в гипертрофическую кардиомиопатию, в присутствии тестируемого соединения (например, по сравнению с животным, не получавшим тестируемого соединения (например, получавшим контрольное вещество). В настоящем документе термин «тестируемое соединение» 10 относится к любой химической структуре, фармацевтическому средству, лекарственному веществу и т.п., которые можно использовать для лечения или предотвращения заболевания, болезни, болезненного состояния или расстройства функций организма, или иного изменения физиологического или клеточного состояния образца. Тестируемые соединения включают как известные, так и потенциальные терапевтические соединения. 15 Терапевтические свойства тестируемого соединения можно определить путем проведения скрининга с использованием способов скрининга согласно настоящей заявке. «Известное терапевтическое соединение» относится к терапевтическому соединению, для которого продемонстрирована (например, в ходе исследований на животных или предшествующего применения на людях) эффективность при таком лечении или 20 предотвращении. В некоторых вариантах реализации тестируемое соединение представляет собой одиночное лекарство-кандидат.

В настоящей заявке предложена композиция, содержащая селен (например, дрожжи, обогащенные селеном, и селенсодержащие соединения, полученные или происходящие из них), и способы ее применения для лечения и подавления кардиомиопатии. В 25 частности, в настоящей заявке предложены композиции, содержащие дрожжи, обогащенные селеном (например, содержащие 2% или менее неорганического селена), селенсодержащие соединения, содержащиеся в них и/или получаемые из них, и способы их применения для лечения и подавления гипертрофии сердца у субъекта (например, в качестве терапевтического и/или профилактического средства для лечения 30 кардиомиопатии). Например, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены композиции, содержащие дрожжи, обогащенные селеном (например, SELPLEX), селен-содержащие соединения, присутствующие в них и/или получаемые из них, и способы их применения для подавления или ослабления экспрессии белков гипертрофии - тяжелой бета-цепи миозина (Myh7) и/или сердечного белка с анкириновым 35 повтором (Ankrd1) (например, в качестве терапевтического или профилактического средства для лечения гипертрофии сердечной мышцы). Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического 40 селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них) при введении субъекту регулирует фактор транскрипции Foxo3, ингибируя экспрессию веществ Myh7 и Ankrd1 (например, тем самым подавляя гипертрофию сердечной мышцы).

Эксперименты, выполненные при разработке вариантов реализации настоящей заявки, позволили обнаружить и показать, что дрожжи, обогащенные селеном 45 (например, дрожжи, обогащенные селеном и содержащие 2% или менее неорганического селена) при введении субъекту ингибируют накопление белков гипертрофии - тяжелой бета-цепи миозина (Myh7) и сердечного белка с анкириновым повтором (Ankrd1), тем самым подавляя и/или предотвращая старение и гипертрофию сердечной мышцы. Хотя

для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих

5 соединений, присутствующих в них) при введении субъекту регулирует сигнальный путь Nfat (например, за счет усиления фосфорилирования Nfatc2/3, приводящего к снижению транскрипции генов, связанной с активностью ядерных факторов Nfatc2/3 (например, тем самым подавляя гипертрофию сердечной мышцы).

Дальнейшие эксперименты, выполненные при разработке вариантов реализации

10 настоящей заявки, позволили обнаружить и показать, что селен в виде дрожжей, обогащенных селеном (например, дрожжей, обогащенных селеном и содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них) при введении субъекту значительно снижает экспрессию pS6K1 в сердце (например, тем самым подавляя и/или снижая старение и

15 гипертрофию сердечной мышцы.

Сигнальный путь Atm/Gadd45 является критическим для остановки клеточного цикла и репарации ДНК как в скелетных, так и в сердечной мышце. В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования

20 характеристик экспрессии Atm и Gadd45 в сердце контрольных и обработанных селеном мышей PolG. Обнаружено, что существует возрастное снижение экспрессии Atm в сердце мыши PolG. В то же время, введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, устранило возрастное снижение

25 экспрессии гена Atm у мышей PolG. Кроме того, экспрессия Gadd45, следующей мишени в пути Atm, значительно стимулировалась в сердце мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена. Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и

хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном,

содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из

30 селенсодержащих соединений, присутствующих в них) при введении субъекту (например, пожилому субъекту) нейтрализует и/или устраниет возрастную пониженную экспрессию Atm в ткани сердца (например, тем самым увеличивая и/или усиливая экспрессию молекул, следующих за Atm (например, Gadd45) и/или улучшает состояние здоровья сердца за счет защиты кардиомиоцитов от повреждения ДНК (например, тем самым

35 подавляя и/или предотвращая гипертрофию сердечной мышцы (например, у пожилых субъектов))).

Разобщающие белки (Ucp) в митохондриях (МТ) имеют важное значение для термогенеза и поддержания потенциала или целостности митохондрий. В документах описано, что потеря Ucp2 приводит к снижению продолжительности жизни и

40 повышенной продукции активных форм кислорода (АФК) в митохондриях. Во время разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты, позволившие обнаружить и показать, что Ucp2 является основным Ucp, экспрессируемым в сердечной мышце. Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, не изменяло экспрессии Ucp1 или Ucp3, однако

45 экспрессия Ucp2 значительно повышалась у мышей PolG, обработанных селеном. Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2%

или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них) при введении субъекту (например, пожилому субъекту) стимулирует экспрессию Ucp2 в сердце (например, тем самым контролируя продукцию активных форм кислорода (например, тем самым улучшая состояние

5 здоровья сердца за счет защиты кардиомиоцитов от повреждения ДНК (например, тем самым подавляя и/или предотвращая гипертрофию сердечной мышцы (например, у пожилых субъектов))).

10 Lcn2 является биомаркером сердечной недостаточности и имеет важное значение для сокращения сердечной мышцы. При старении человека сердце теряет эластичность за счет увеличения кардиомиоцитов и снижения сократимости мышечных клеток, что является основными причинами сердечной недостаточности и гипертрофии сердца. В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования характеристик экспрессии Lcn2 в сердце контрольных и обработанных селеном мышей PolG. В сердце старых мышей PolG обнаружено

15 значительно резкое увеличение экспрессии Lcn2. Еще более неожиданным было наблюдение того, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному снижению экспрессии Lcn2 у старых мышей PolG по сравнению с контролем. Эти результаты подтверждают другие результаты, описанные в настоящем документе в

20 связи с повышением уровня pNfat2/3 (например, инактивирования активности Nfat при транскрипции генов) в сердце мышей polG, обработанных селеном. Кроме того, в документах описано, что Lcn2 является мишенью Nfat. Таким образом, хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых

25 вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них) при введении субъекту (например, пожилому субъекту) нейтрализует или устраняет возрастную усиленную экспрессию Lcn2 в ткани сердца (например, тем самым подавляя и/или предотвращая гипертрофию сердечной мышцы (например, у пожилых субъектов)).

30 Так, в предпочтительном варианте реализации настоящей заявки предложены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или их водорастворимую фракцию (например, описанную в настоящем документе) или их нерастворимую в воде фракцию (например, описанную в настоящем документе) или одно или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них (например, описанных в настоящем документе)), применяемые для снижения экспрессии белков гипертрофии в сердце (например, с целью профилактического или терапевтического лечения гипертрофии сердца) у субъекта

35 (например, целью подавления гипертрофии сердца и/или экспрессии молекул, вовлеченных в утолщение миокарда, у субъекта, которому вводят селенсодержащую композицию, по сравнению с толщиной сердечной мышцы и/или экспрессией молекул, вовлеченных в утолщение миокарда, у контрольного субъекта, не получающего селенсодержащей композиции).

40

45 В еще одном предпочтительном варианте реализации настоящей заявки предложены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или их водорастворимую фракцию (например, описанную в настоящем документе)

или их нерастворимую в воде фракцию (например, описанную в настоящем документе) или одно или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них (например, описанных в настоящем документе)), применяемые для введения субъекту с целью предотвращения экспрессии молекул, вовлеченных в

5 утолщение миокарда (например, для предотвращения гипертрофии сердца у субъекта-человека или животного, которому вводят селенсодержащую композицию, по сравнению с наличием или тяжестью гипертрофии сердца у контрольного субъекта, не получающего селенсодержащей композиции). Настоящая заявка не ограничена типом кардиомиопатии, подвергаемой профилактическому или терапевтическому лечению у субъекта.

10 Фактически, композиции и способы согласно настоящей заявке находят применение при профилактическом и/или терапевтическом лечении любой кардиомиопатии, при которой наблюдается благоприятный эффект от снижения экспрессии белков гипертрофии в сердце, включая, но не ограничиваясь следующими, гипертрофическую кардиомиопатию (например, вследствие семейной гипертрофической кардиомиопатии, 15 инфаркта миокарда или пороков сердца (например, связанных с миксоматозной дегенерацией клапана, дисфункцией папиллярных мышц или ревматической лихорадкой)), дилатационную кардиомиопатию, рестриктивную кардиомиопатию и аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка (ARVC).

Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя 20 настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в предпочтительных вариантах реализации введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или их водорастворимой фракции (например, описанной в настоящем документе) или их нерастворимой в воде фракции (например, описанной в настоящем документе) или 25 одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них (например, описанных в настоящем документе)) снижает экспрессию белков гипертрофии (например, тяжелой цепи бета ( $\beta$ )-миозина и/или белка с анкириновым повтором) в сердце, тем самым подавляя и/или предотвращая старение и гипертрофию сердечной мышцы. В одном неограничивающем варианте реализации 30 снижение экспрессии белков гипертрофии (например, тяжелой цепи бета ( $\beta$ )-миозина и/или белка с анкириновым повтором) у субъекта, которому вводят композицию, содержащую селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из 35 них, достигается за счет снижения активности транскрипции генов, имеющей отношение к сердечному ядерному фактору Nfatc2/3, у субъекта. В еще одном неограничивающем варианте реализации снижение экспрессии белков гипертрофии (например, тяжелой цепи бета ( $\beta$ )-миозина, белка с анкириновым повтором) у субъекта, которому вводят композицию, содержащую селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из 40 них, происходит за счет снижения экспрессии и/или активности сердечной рибосомальной протеинкиназы (pS6K1) у субъекта.

В некоторых вариантах реализации снижение экспрессии белков гипертрофии (например, тяжелой цепи бета ( $\beta$ )-миозина, белка с анкириновым повтором) у субъекта, которому вводят композицию, содержащую селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, достигается за счет повышения экспрессии и/или активности белка O3 с доменом forkhead-бокс (foxo3) у субъекта.

В некоторых вариантах реализации снижение экспрессии белков гипертрофии

(например, тяжелой цепи бета ( $\beta$ )-миозина, белка с анкириновым повтором) у субъекта, которому вводят композицию, содержащую селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, происходит за счет снижения или устраниния возрастной 5 усиленной экспрессии липокалина-2 (Lcn2) у субъекта.

Настоящая заявка не ограничена типом субъекта, подвергающегося введению композиций и применению способов согласно настоящей заявке. Фактически, многие субъекты получают благоприятное действие от введения композиций и применения способов согласно настоящей заявке, включая субъектов, у которых считается

- 10 необходимым замедление прогрессирования гипертрофии сердца, субъектов, у которых необходимо остановить прогрессирование гипертрофии сердца, и субъектов, у которых необходимо обратить вспять прогрессирование гипертрофии сердца, но не ограничиваясь ими. Неограничивающий пример замедления прогрессирования гипертрофии сердца у субъекта заключается в снижении экспрессии белков гипертрофии (например, тяжелой 15 цепи бета ( $\beta$ )-миозина и/или белка с анкириновым повтором) в сердце субъекта за счет введения композиции, содержащей селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, в эффективном количестве для снижения достигается за счет снижения экспрессии белков гипертрофии в сердце субъекта (например, по сравнению 20 с контрольным субъектом, не получающим селенсодержащей композиции).

У субъекта могут проявляться признаки, симптомы или другие показатели гипертрофии сердца, или субъект может подвергаться риску (например, быть генетически предрасположенным к) проявления признаков, симптомов или других показателей гипертрофии сердца (например, в настоящее время признаки, симптомы или другие 25 показатели гипертрофии сердца не проявляются, однако согласно медицинскому диагнозу субъект генетически предрасположен к повышенному риску гипертрофии сердца). В других вариантах реализации субъект страдает или подвергается риску кардиомиопатии (например, гипертрофической кардиомиопатии (например, вследствие семенной гипертрофической кардиомиопатии, инфаркта миокарда или пороков сердца 30 (например, связанных с миксоматозной дегенерацией клапана, дисфункцией папиллярных мышц или ревматической лихорадкой) и т.д.), дилатационной кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии и аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (ARVC)).

Изменения экспрессии генов можно обнаружить путем сравнения уровней экспрессии мРНК у обработанных и необработанных субъектов. На основе идентифицируемых последовательностей можно получить и разработать праймеры и зонды. Размер праймеров или зондов обычно составляет приблизительно 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10 или 5 нуклеотидов или любое целое число между 5 и 200 нуклеотидами. Праймеры или зонды специфически гибридизуются с нуклеотидной последовательностью, 35 кодирующей белок с указанной ниже последовательностью. Праймеры или зонды 40 можно метить обнаруживаемой репортерной молекулой.

Таблица 1

Обозначение гена	Номер доступа (NCBI)	GI (NCBI)	Номер доступа (NCBI)	GI (NCBI)
Myh7	NP_000248	115496169	NM_000257	115496168
AnKrd1	NP_055206	38327522	NM_014391	38327521
Foxo3	NP_001446	4503739	NM_001455	146260266
Pgclα	NP_037393	7019499	NM_013261	116284374
Nr2F2	NP_005645	5032173	NM_005654	53749664
Prkaa2	NP_006243	46877068	NM_006252	157909838
Trim63	NP_115977	19924163	NM_032588	378744182
Fbxo32	NP_001229392	335057520	NM_001242463	335057519
Acvr2b	NP_001097	116734708	NM_001106	116734707
Gadd45g	NP_006696	5729836	NM_006705	209413759
UCP2	NP_003346	13259541	NM_003355	13259540
UCP1	NP_068605	11225256	NM_021833	194733796
UCP3	NP_003347	4507807	NM_003356	215272349
Atm	NP_000042	71902540	NM_000051	71902539
mTOR	NP_004949	4826730	NM_004958	206725550
Gsk3b	NP_001139628	225903437	NM_001146156	225903436
S6K1	NP_991385	45430051	NM_205816	45430050
MAP2k2	NP_109587	13489054	NM_030662	187171274
NFAT1	NP_001265598	522021835	NM_001278669	522021834
NFAT2	NP_001129493	209862843	NM_001136021	385137158
Lcn2	NP_005555	38455402	NM_005564	108936956

Специалист в данной области техники может определить нуклеотидные и белковые последовательности генов, описанных в настоящем документе. Типичные 25 последовательности показаны в таблице 1.

### Саркопения

Саркопения, возрастная потеря скелетной мышечной массы, характеризуется ухудшением количества и качества мышц, что приводит к постепенному замедлению 30 движения, снижению силы, развитию слабости и повышенному риску травмы при падении. Саркопения по определению представляет собой придаточную скелетную

мышечную массу ( $\text{кг}/\text{рост}^2 (\text{м}^2)$ ), более чем на два стандартных отклонения отличающуюся от среднего значения в эталонной группе в сторону снижения (см., например, Baumgartner et al. (Am J Epidemiol 1998; 147:755-63; 149: 1161). Оценки

35 распространенности саркопении колеблются от 13-24% у взрослых старше 60 лет до более чем 50% у лиц в возрасте 80 лет и старше. Секреция гормона роста постепенно снижается, начиная с середины полового созревания, и известно, что гормон роста увеличивает мышечную массу. Пациенты с недостаточностью гормона роста характеризуются снижением мышечной массы и увеличением жировой массы.

40 Заместительная терапия с применением гормона роста увеличивает мышечную массу и приводит к уменьшению жировой массы.

Нормальный механизм, участвующий в регенерации тканей мышц, изначально включает рекрутинг сателлитных клеток. Мышечные сателлитные клетки являются отдельной линией дифференцировки миогенных клеток-предшественников, 45 расположеными между базальной пластинкой и сарколеммой зрелых мышечных волокон (см., например, Bischoff, 1994; Grounds and Yablonka-Reuveni, 1993). Во время цикла регенерации сателлитные клетки активируются и мигрируют из мышечных волокон в область регенерации, где образуют миобласты. Большинство

пролиферирующих миобластов дифференцируются в мышечные трубочки. Мышечные трубочки являются зрелыми и входят в состав мышечных волокон. Миобlastы, не дифференцировавшиеся в мышечные трубочки, возвращаются к мышечные волокна, где возобновляют популяцию сателлитных клеток.

- 5 Цикл регенерации мышц происходит непрерывно на протяжении всей жизни человека и животных (например, для замены изношенной или поврежденной мышечной ткани). По мере старения организма цикл регенерации мышц становится менее эффективным. Саркопения, приводящая к снижению мышечной массы и производительности, связана с нормальным старением. Хотя скелетные мышцы по-прежнему способны к
- 10 саморегенерации во время старения, неизвестные факторы в старых мышцах создают условия, препятствующие активации, пролиферации и дифференцировке сателлитных клеток мышц, что приводит к чистой потере мышечной ткани (см., например, Greenlund and Nair, 2003). Показано, что некоторые факторы роста, в том числе фактор роста гепатоцитов (ФРГ), фактор роста фибробластов (ФРФ) и mechanозависимый фактор
- 15 роста (МФР), положительно влияют на регенерацию мышц, регулируя активацию сателлитных клеток (Floss et al., 1997; Miller et al., 2000, Goldspink and Harridge; 2004).

В настоящей заявке предложена композиция, содержащая селен (например, дрожжи, обогащенные селеном, и селенсодержащие соединения, полученные или происходящие из них), и способы ее применения для лечения и подавления саркопении. В частности,

20 в настоящей заявке предложены композиции, содержащие дрожжи, обогащенные селеном (например, SELPLEX), селенсодержащие соединения, содержащиеся в них и/ или получаемые из них, и способы их применения для повышения и/или поддержания массы скелетных мышц у субъекта (например, в качестве терапевтического и/или профилактического средства для лечения саркопении). Эксперименты, выполненные

25 при разработке вариантов реализации настоящей заявки, позволили обнаружить и показать, что дрожжи, обогащенные селеном (например, дрожжи, обогащенные селеном и содержащие 2% или менее неорганического селена) при введении субъекту усиливают синтез белка в скелетных мышцах, а также ингибируют разложение белка в протеасомах скелетных мышц. Введение субъекту дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2%

30 или менее неорганического селена, также активировало сателлитные (столовые) клетки скелетных мышц. Кроме того, введение субъекту дрожжей, обогащенных селеном, активировало экспрессию кальциневрина, тем самым стимулируя экспрессию генов гипертрофии в скелетных мышцах.

Таким образом, в предпочтительном варианте реализации настоящей заявки

35 предложены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одно или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них), применяемые для лечения саркопении у субъекта (например, с целью увеличения или поддержания мышечной массы у субъекта-человека или

40 животного, которому вводят селенсодержащую композицию, по сравнению с мышечной массой контрольного субъекта, не получающего селенсодержащей композиции). В еще одном предпочтительном варианте реализации настоящей заявки предложены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена

45 (или одно или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них), применяемые для предотвращения саркопении у субъекта (например, с целью увеличения или поддержания мышечной массы у субъекта-человека или животного, которому вводят селенсодержащую композицию, по сравнению с

мышечной массой контрольного субъекта, не получающего селенсодержащей композиции).

Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации увеличение массы общего белка у субъекта, которому вводят селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или один или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, обусловлено стимуляцией синтеза белка и/или ингибированием разложения белка. В одном неограничивающем варианте реализации увеличение массы общего белка у субъектов, которым вводят селен (в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или селенсодержащего соединения, присутствующего в них или получаемого из них), обусловлено способностью селенсодержащих соединений, присутствующих в дрожжах, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, регулировать экспрессию Gsk3β и/или Ampk и модифицировать сигнальный путь mTOR/MAPK/S6K1, тем самым усиливая синтез белка в скелетных мышцах. Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них) стимулирует экспрессию генов гипертрофии (например, кальциневрина и факторов элонгации белка), тем самым усиливая синтез белка и противодействуя атрофии скелетных мышц.

В другом неограничивающем варианте реализации увеличение массы общего белка у субъекта, которому вводят селенсодержащую композицию в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, достигается за счет усиленного синтеза белка, обусловленного снижением ингибирующего действия сигнального пути миостатина/Acvr на синтез белка (что, например, подавляет саркопению или стимулирует гипертрофию скелетных мышц). В некоторых вариантах реализации увеличение массы общего белка у субъекта, которому вводят селенсодержащую композицию в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, достигается за счет активации сателлитных клеток скелетных мышц. В некоторых вариантах реализации увеличение массы общего белка у субъекта, которому вводят селенсодержащую композицию в виде дрожжей, обогащенных селеном, и/или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, достигается за счет стимуляции сигнальных молекул - кальциневрина и/или NFAT.

Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации ингибирование разложения белка и предотвращение атрофии скелетных мышц у субъектов, которым вводят селен (в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена) обусловлено способностью селенсодержащих соединений, присутствующих в дрожжах, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, снижать/ослаблять экспрессию генов атрофии Trim63 и Fbxo32 в результате снижения экспрессии mTOR, и/или ослаблять активность факторов транскрипции Foxo.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен

способ лечения саркопении, включающий введение субъекту (например, субъекту-человеку или животному), нуждающемуся в этом, эффективного количества селенсодержащей композиции в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых их них. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено применение селенсодержащей композиции в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых их них, в способе усиления активности сателлитных клеток скелетных мышц у субъекта. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено применение селенсодержащей композиции в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых их них, в способе снижения ингибирования синтеза белка миостатином и/или Acvr у субъекта. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено применение селенсодержащей композиции в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых их них, в способе ингибирования сигнального пути миостатина/Acvr (например, за счет ингибирования экспрессии миостатина и/или Acvr (например, Acvr2b)) у субъекта (например, с целью увеличения массы скелетных мышц субъекта).

Изменения экспрессии генов можно обнаружить путем определения уровней экспрессии мРНК по сравнению с эталонным геном, например, актиномиозина (Act b) или по обнаружению повышения уровня белка с использованием, например, иммуноанализа. Праймеры и зонды можно получить и разработать на основе типичной эталонной последовательности, как показано ниже для генов, описанных в настоящем документе. Такие белковые и нуклеотидные последовательности являются общедоступными. Размер праймеров или зондов обычно составляет приблизительно 200, 150, 100, 75, 50, 25, 15, 10 или 5 нуклеотидов или любое целое число между 5 и 200 нуклеотидами. Праймеры или зонды специфически гибридизуются с нуклеотидной последовательностью, кодирующими белок с указанной ниже последовательностью. Праймеры или зонды можно метить обнаруживаемой репортерной молекулой. Такие метки включают Alexa flour, биотин, FAM, TAMRA, HEX, NED, ROX и т.п.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ лечения поддержания или увеличения мышечной массы у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества селенсодержащей композиции в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых их них (например, с целью лечения саркопении у субъекта).

Настоящая заявка не ограничена типом субъекта, нуждающегося в поддержании и/или увеличения массы скелетных мышц. Как описано выше, саркопения по определению представляет собой природную скелетную мышечную массу ( $\text{кг}/\text{рост}^2 (\text{м}^2)$ ), более чем на два стандартных отклонения отличающуюся от среднего значения в группе молодых контрольных субъектов в сторону снижения (балльный показатель t) Балльный показатель t определяют путем измерения массы мышц осевого скелета у субъекта, как правило, посредством dxa (двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии) или аналогичного и воспроизводимого показателя. Измерения массы мышц осевого скелета можно использовать отслеживания состояния субъекта (до, во время или после

применения способа лечения субъекта, описанного в настоящем документе) с целью определения способности лечения замедлять, предотвращать или вызывать регресс снижения массы скелетных мышц.

Одна из целей настоящей заявки - лечение и/или подавление саркопении, в том числе

- 5 замедление ее прогрессирования, остановка ее прогрессирования и ее частичный регресс. Примером замедления прогрессирования саркопении является измерение времени, в течение которого значение балльного показателя  $t$  у субъекта изменится от -1,5 до -2 баллов (например, если такое прогрессирование обычно занимает 5 лет, то лечение, применяемое в настоящей заявке, может замедлить это изменение до 10 лет). Примеры
- 10 частичного регресса включают снижение балльного показателя  $t$  на 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 или более баллов (например, изменение балльного показателя  $t$  от -2 до -1,9, -1,8, -1,7, -1,6, -1,5, -1,4, -1,3, -1,2, -1,1, и т.д.). Лечение саркопении также включает задержку начала саркопении. Например, если типичный возраст начала проявления признаков саркопении у мужчин составляет 55 лет, то лечение согласно
- 15 настоящей заявке может отсрочить это начало на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более лет. Таким образом, лечение саркопении включает лечение субъектов, которым еще не поставлен диагноз саркопении, но которые подвержены или предположительно подвержены развитию саркопении. Неограничивающие примеры подверженных или предположительно подверженных субъектов также включают субъектов, получающих
- 20 гормональные терапевтические средства, в том числе глюкокортикоидные стероиды, субъектов с нейродегенеративным заболеванием, субъектов с хроническими инфекциями, субъектов, страдающих СПИДом, субъектов с хроническими воспалительными состояниями, и субъектов, страдающих раком, но не ограничиваются ими.

Другие субъекты, получающие благоприятный эффект от применения композиций

- 25 и способов согласно настоящей заявке, включают субъектов, страдающих от потери мышечной массы, но не страдающих от состояния, мешающего повседневной жизни и/или самостоятельной жизни субъекта (например, пациента, которому вскоре может потребоваться уход).

Например, субъект, получающий благоприятный эффект от применения композиций

- 30 и способов согласно настоящей заявке, включает субъекта с балльным показателем  $t$ , составляющим от 3, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0, -0,1, -0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6, -0,7, -0,8, -0,9, -1,0, -1,1, -1,2, -1,3, -1,4, -1,5, -1,6, -1,7, -1,8, -1,9, -2,0, -2,1, -2,2, -2,3, -2,4, -2,5, -2,6, -2,7, -2,8, -2,9, -3,0, -3,1, -3,2, -3,3, -3,4, -3,5, -3,6, -3,7, -3,8, -3,9, -4,0, -4,1, -4,2, -4,3, -4,4, -4,5, -4,6, -4,7, -4,8, -4,9, -5,0, -5,1, -5,2, -5,3, -5,4, -5,5, -5,6, -5,7, -5,8, -5,9 и 6,0 баллов, но не ограничивающимся этими значениями. Тем не менее, настоящая заявка не ограничена этим. Например, в некоторых вариантах реализации субъект, получающий благоприятный эффект от применения композиций и способов согласно настоящей заявке, включает субъекта с балльным показателем  $t$  более 3 или менее -6,0.
- 35

- 40 В некоторых вариантах реализации субъект, получающий благоприятный эффект от применения композиций и способов согласно настоящей заявке, включает субъекта в возрасте между 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90 годами или старше. Тем не менее, настоящая заявка не ограничена этим. Например, в некоторых вариантах реализации субъект, получающий благоприятный эффект от применения
- 45 композиций и способов согласно настоящей заявке, включает субъекта в возрасте менее 40 лет (например, субъекта, страдающего раком, нейродегенеративным заболеванием, хроническим воспалительным заболеванием и т.д.).

В предпочтительном варианте реализации настоящей заявки предложен способ

лечения саркопении, включающий введение субъекту (например, субъекту-человеку или животному), нуждающемуся в этом, эффективного количества селенсодержащей композиции в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или одного или более из селенсодержащих соединений,

5 присутствующих в них или получаемых их них.

Ожирение, диабет 2 типа и связанные с ними состояния

Саркопения и ожирение представляют собой два независимых, но взаимосвязанных состояния, которые оказывают большее влияние на продолжительность жизни и расходы на здравоохранение в развитых странах. Сочетание пониженной мышечной массы с

10 повышенной жировой массой называют «саркопеническим ожирением» (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: р. 109-113). Ожирение усугубляет саркопению, поскольку оно стимулирует накопление жировой массы и липидов, что предотвращает включение аминокислот и снижает синтез белка в мышцах (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: р. 109-113). В свою очередь, поскольку скелетная мышечная масса имеет важное 15 значение для метаболического здоровья и играет основную роль в утилизации глюкозы во всем организме и в чувствительности к инсулину, саркопения усугубляет ожирение (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: р. 109-113). В дополнение к саркопении, ожирение часто представляет собой побочный эффект, связанный с другими 20 метаболическими заболеваниями, например, диабетом II типа, гипергликемией и др.

25 Вполне понятно, что генетическая предрасположенность и экспрессия молекул, связанных с ожирением, также представляют собой способствующий фактор.

Ожирение оказывает возрастающее влияние на продолжительность жизни и расходы на здравоохранение в развитых странах (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: р. 109-113). Ожирение ассоциировано с несколькими метаболическими заболеваниями,

25 например, диабетом II типа, гипергликемическим метаболическим синдромом, инсулинрезистентностью и многими другими заболеваниями. Понятно, что генетические факторы и экспрессия определенных генов, связанных с повышенным ожирением, играют важную роль при этих состояниях.

Одним из таких примеров является ген, ассоциированный с жировой массой и 30 ожирением (FTO), также называемый «геном ожирения». FTO тесно связан с увеличением индекса массы тела и предрасположенностью к ожирению у детей и взрослых (см., например, Gulati et al, PNAS, 2013. 110(7): р. 2557-2562). Ген FTO экспрессируется во всем организме, однако уровни его мРНК в головном мозге особенно высоки в гиппокампе, мозжечке и гипоталамусе, что указывает на потенциальную роль FTO 35 головного мозга в контроле потребления пищи, общем метаболизме организма и ожирении (см., например, Church, PLoS Genetics, 2009).

Во время разработки вариантов реализации настоящей заявки были проведены дополнительные эксперименты с целью определить, может ли введение селена изменить экспрессию FTO. При использовании моделей животных, описанных в примере 2, 40 установили, что субъекты, получавшие селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, демонстрировали заметно пониженный уровень экспрессии гена FTO не только в ткани коры (кратное изменение = -1,70), но и в ткани икроножной мышцы (кратное изменение = -3,33) по сравнению с контрольными субъектами.

45 Существует тесная связь между повышенной экспрессией FTO и снижением окислительной функции митохондрий у субъектов с диабетом 2 типа (см., например, Bravard et al, 2011). Обнаружено, что несколько селенсодержащих соединений, выявленных и выделенных из дрожжей, обогащенных селеном, значительно улучшили

биоэнергетику митохондрий, усиливая способность митохондрий к синтезу АТФ, а также максимальную дыхательную емкость с использованием субстратов, зависимых от комплекса I или II. Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ лечения субъекта (например, субъекта с диабетом и/или ожирением), включающий введение эффективного количества селенсодержащей композиции (дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, водорастворимой фракции дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, нерастворимой в воде фракции дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, 10 экстракта дрожжей, обогащенных селеном (например, растворимого в кислых условиях), растворимого селеногликопротеина, селенсодержащих соединений (например, полученных или происходящих из дрожжей, обогащенных селеном (например, дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена) или их производных, выделенных или синтезированных селенсодержащих соединений 15 (например, сelenоэфиров, конъюгатов SeCys, содержащих ди- и трипептиды, селенолов или селеноксидов (или их производных), селенсодержащих белков и/или селенсодержащих пептидов, описанных в настоящем документе (например, в примере 1) субъекту (например, тем самым повышая продукцию АТФ в митохондриях, усиливая митохондриальное дыхание, повышая метаболизм глюкозы и/или снижая экспрессию 20 молекул, связанных с ожирением (например, FTO)).

Кроме того, во время разработки вариантов реализации настоящей заявки были выполнены эксперименты с целью исследования возможности изменения активности OXPHOS в печени и/или скелетной мышце субъекта за счет введения селена (например, в качестве терапевтического средства для лечения диабета 2 типа). Эмпирические 25 данные, полученные при разработке вариантов реализации настоящей заявки, позволили обнаружить, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному усилению экспрессии PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах по сравнению с контрольными субъектами.

PGC1- $\alpha$  является мощным коактиватором транскрипции, усиливающим 30 митохондриальную активность в скелетных мышцах. В то же время экспрессия повышенного уровня PGC1- $\alpha$  в других тканях, помимо скелетных мышц, может оказывать вредоносное и/или повреждающее воздействие на субъекта. Например, в печени PGC1- $\alpha$  выполняет другую роль, чем в скелетных мышцах. В частности, 35 повышенный уровень PGC1- $\alpha$  в печени приводит к усилению глюконеогенеза (продукции глюкозы; см., например, Liang and Ward, 2006), что является крайне неблагоприятным для субъектов с диабетом и нарушенной чувствительностью к инсулину, которые не могут усваивать глюкозу.

Как ни странно, обнаружено, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному 40 снижению экспрессии PGC1- $\alpha$  в ткани печени по сравнению с контрольными субъектами. Это открытие было неожиданным и основывалось на наблюдении того, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному усилению экспрессии PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах по сравнению с контрольными субъектами. Таким образом, в 45 некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены композиции, содержащие дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена (или одно или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них (например, описанных в примере 1) для применения в способах

усиления экспрессии PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах субъекта при одновременном снижении экспрессии PGC1- $\alpha$  в печени субъекта (например, тем самым обеспечивая повышение метаболизма и утилизации глюкозы в скелетных мышцах субъекта (например, за счет повышенного уровня OXPHOS) и подавление продукции глюкозы в печени).

5 COUP-TFII (фактор транскрипции COUP 2), также известный как Nr2F2 (2 член группы F 2 подсемейства ядерных рецепторов) является предполагаемым прямым ингибитором PGC1- $\alpha$  (см., например, Lin et al., 2011). Выполнены эксперименты с целью анализа экспрессии Nr2F2 у субъектов, получавших селенсодержащую композицию. Как и в предыдущем случае, было неожиданно обнаружено, что введение селена в виде дрожжей, 10 обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному снижению экспрессии Nr2F2 в скелетных мышцах по сравнению с контрольными субъектами и значительному усилению экспрессии Nr2F2 в ткани печени по сравнению с контролем. Таким образом, в настоящей заявке приведено первое 15 доказательство полезности композиции, содержащей селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одной или более из их водорастворимых фракций или одной или более из нерастворимых в воде фракций или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них (см. пример 1)) для применения при регуляции гомеостаза глюкозы в различных тканях (например, ткани скелетных мышц и ткани печени) у 20 субъекта.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ лечения (терапевтического или профилактического) субъекта (например, субъекта с диабетом 2 типа), включающий введение эффективного количества композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического 25 селена (одну или несколько из их водорастворимых фракций или одну или более из их нерастворимых в воде фракций или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них), с целью усиления экспрессии PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах субъекта при одновременном снижении экспрессии PGC1- $\alpha$  в печени субъекта (например, тем самым усиливая метаболизм и/или утилизацию глюкозы 30 в скелетных мышцах субъекта и подавляя продукцию глюкозы в печени субъекта).

Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации усиление метаболизма/utiлизации глюкозы в скелетных мышцах с параллельным подавлением продукции глюкозы в печени субъекта 35 происходит за счет способности селена при введении субъекту снижать экспрессию Nr2f2 в скелетных мышцах субъекта (например, усиливая экспрессию PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах) и усиливать экспрессию Nr2f2 в печени субъекта (например, снижая экспрессию PGC1- $\alpha$  в печени).

Настоящая заявка также предусматривает, что можно предпочтительно и 40 дифференцированно регулировать специфическую для печени митохондриальную активность посредством введения дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, в то время как введение селена в виде селениита или селенметионина было значительно менее эффективным. Соответственно, в настоящей заявке предложено введение селена (например, дрожжей, обогащенных селеном, 45 содержащих 2% или менее неорганического селена, селениита натрия и т.д.) субъекту, которое можно применять для установления/усиления специфической для печени экспрессии генов катаболизма глюкозы (OXPHOS) и/или метаболизма глюкозы.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены

способы усиления утилизации глюкозы в печени субъектов посредством введения селена (например, дрожжей, обогащенных селеном (например, содержащих 2% или менее неорганического селена), или одной или более из их водорастворимых фракций или одной или более из их нерастворимых в воде фракций или одного или более из

5 селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, селенита натрия и т.д.) субъекту, нуждающемуся в этом (например, субъекту с диабетом 2 типа).

Эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, документально показали, что увеличение экспрессии генов OXPHOS в печени субъектов, которым вводят композиции селена, описанные в настоящем документе,

10 обеспечивало скромное, хотя и значительное увеличение экспрессии (приблизительно на 20-25%) по сравнению с контрольными субъектами. Это увеличение соответствует документально описанному снижению экспрессии соответствующих генов, наблюдаемому у субъектов со стойкой инсулинрезистентностью и диабетом (см., например, Mootha et al., 2004). Соответственно, в некоторых вариантах реализации,

15 композиции и способы согласно настоящей заявке используются для лечения диабета 2 типа у субъекта (например, хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены композиции и способы, увеличивающие специфическую для печени

20 митохондриальную активность (например, восстанавливающие пониженную митохондриальную активность, наблюдавшуюся у субъектов с диабетом 2 типа).

Во время разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены дополнительные эксперименты с целью определить, обладают ли конкретные селенсодержащие соединения, выявленные в примере 1, биологической активностью

25 (например, определить, проявляют ли селенсодержащие соединения биологическую активность и/или могут ли селенсодержащие соединения быть более (или менее) биологически активными при выделении и очистке от компонентов дрожжевых клеток и/или внутренней смеси других, не содержащих селена, клеточных компонентов).

Синтезировали ряд наиболее распространенных селенсодержащих соединений и молекул, 30 обнаруженных в дрожжах, обогащенных селеном, в примере 1.

Одним из центров внимания экспериментов являлся водорастворимый экстракт, содержащий, согласно описанию, приведенному в примере 1, до 25% общего селена, присутствующего в дрожжах, обогащенных селеном. Предполагалось, что селенсодержащие соединения водорастворимого экстракта должны в первую очередь

35 высвобождаться/гидролизоваться из дрожжей, обогащенных селеном, после их потребления субъектом и прохождения через кишечник. Кроме того, в примере 1 выше описано, что селенсодержащие белки, присутствующие в дрожжах, обогащенных селеном, были выявлены с использованием компьютерного прогностического моделирования. Кроме того, эксперименты выявили небольшие селенсодержащие

40 пептиды, высвобождающиеся под действием пищеварительных ферментов (например, трипсина).

Был получен ряд селенсодержащих соединений для анализа и исследования характеристик. С целью определения наличия и характера потенциального действия отдельных селенсодержащих соединений на биоэнергетику митохондрий

45 селенсодержащие соединения непосредственно анализировали с использованием выделенных митохондрий. Несколько селенсодержащих соединений демонстрировали положительное увеличение митохондриальной активности во всех трех состояниях дыхания и повышенные профили биоэнергетики митохондрий. Таким образом, в

настоящей заявке предложено выявление и исследование характеристик селенсодержащих соединений (например, LVSe-MR ( $C_{22}H_{44}N_7O_5Se$ ), метилселенаденозина ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ), селенаденозилгомоцистеина ( $C_{14}H_{20}N_6O_5Se$ )) и других соединений, выявленных в примере 1) и композиций, содержащих указанные соединения, с целью 5 их применения при модуляции активности/биоэнергетики митохондрий у субъекта (например, субъекта, нуждающегося в этом (например, субъекта с диабетом 2 типа)).

Например, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложена 10 композиция (например, фармацевтическая композиция), содержащая селенсодержащие соединения, описанные в настоящем документе (например, в примере 1 (например, для применения при производстве лекарственного средства для лечения состояния или заболевания (например, ожирения, диабета, инсулинрезистентности, метаболического синдрома, хронического воспаления (например, печени, жировой ткани и т.д.), стеатоза печени и т.д.)). В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ 15 лечения субъекта, нуждающегося в этом (например, субъекта с ожирением), включающий введение эффективного количества композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей селенсодержащее соединение, описанное в настоящем документе (например, в примере 1), субъекту для повышения митохондриальной активности (например, специфической для скелетных мышц или печени 20 митохондриальной активности (например, приводящего к усилению метаболизма глюкозы у субъекта)). В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом (например, субъекта с диабетом), включающий введение эффективного количества композиции (например, 25 фармацевтической композиции), содержащей селенсодержащее соединение, описанное в настоящем документе (например, в примере 1), субъекту для повышения митохондриальной активности (например, специфической для скелетных мышц или 30 печени митохондриальной активности). Хотя для реализации настоящей заявки не требуется понимание механизма, и хотя настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, в некоторых вариантах реализации увеличение митохондриальной активности (например, специфической для скелетных мышц или 35 печени митохондриальной активности) у субъекта происходит за счет увеличения синтеза АТФ в митохондриях. В некоторых вариантах реализации увеличение митохондриальной активности (например, специфической для скелетных мышц или печени митохондриальной активности) у субъекта происходит за счет повышения дыхательной емкости (например, максимальной дыхательной емкости (например, с 40 использованием субстратов, зависимых от комплекса I или II)).

Еще один неожиданный вывод заключался в том, что хотя некоторые селенсодержащие соединения проявляли свойства, усиливающие митохондриальную активность, при инкубации с митохондриями, эти свойства были не характерны для ряда других выявленных и исследованных селенсодержащих соединений. Например, 45 несколько селенсодержащих соединений оказывали отрицательное влияние на митохондриальную активность. В частности, неожиданный вывод заключался в том, что несколько селенсодержащих соединений, обладающих некоторым сходством в общей структуре, проявляли самые разные биологические свойства по отношению к способности модифицировать митохондриальную активность. Например, глутамилселенцистеин ( $C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$ ) (№10) снижал синтез АТФ (состояние III) почти на 19%, несмотря на то, что его общая структура аналогична/не сильно отличается от метилселенаденозина ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9), который увеличивал синтез АТФ на

17,3%. Таким образом, влияние этих двух селенсодержащих соединений, присутствующих в дрожжах, обогащенных селеном, на митохондриальную активность различалось более чем 36%.

В связи с тем, что несколько селенсодержащих композиций согласно настоящей

5 заявке проявляли возможность повышения активности митохондриального комплекса I, были выполнены эксперименты с целью определения возможности стимуляции митохондрий за счет удаления вредных активных форм кислорода (АФК) селенсодержащими соединениями. Таким образом, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью оценки

10 антиоксидантного потенциала селенсодержащих соединений.

Обнаружено, что некоторые из селенсодержащих соединений обладают/проявляют антиоксидантной емкостью. Кроме того, некоторые из селенсодержащих соединений обладают/проявляют антиоксидантной емкостью, которая является аддитивной или слегка синергетической, слегка антагонистической или синергетической (например, с

15 точки зрения способности к удалению кислородных радикалов).

Данные и информация, полученные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, являются уникальными и беспрецедентными результатами. В частности, в настоящей заявке предложены новые композиции и способы лечения (например, профилактического и терапевтического лечения) митохондриальной 20 дисфункции или недостаточности (например, связанных с диабетом (например, диабетом II типа), ожирением, инсулинрезистентностью, диабетической кардиомиопатией и т.д.). В некоторых вариантах настоящей заявки предложена композиция, содержащая два или более селенсодержащих соединений (например, водорастворимой фракции дрожжей, обогащенных селеном, нерастворимой в воде фракции дрожжей, обогащенных селеном, 25 селенсодержащего соединения, присутствующего в дрожжах, обогащенных селеном, и/или получаемого из них), объединенных для получения композиции, обладающей желательной, специфической способностью усиливать митохондриальную активность.

Например, в некоторых вариантах реализации композиции (например, фармацевтические композиции) содержат 2 или более (например, 3 или более, 4 или 30 более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более или 50 или более) отдельных селенсодержащих соединений (например, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложена композиция, содержащая комбинацию 2 или более (например, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 35 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более или 50 или более) селенсодержащих соединений (например, выделенных, химически синтезированных или рекомбинантных селенсодержащих соединений), предназначенных для конкретного применения (например, в комбинации демонстрирующих желательный уровень биологической 40 активности (например, стимулирующей и/или ингибирующей активности)).

Например, в некоторых вариантах реализации первую композицию, содержащую комбинацию двух или более селенсодержащих соединений, используют для повышения митохондриальной активности (например, продукции АТФ и/или метаболизма глюкозы) в мышечной ткани, тогда как вторую композицию, содержащую комбинацию двух или 45 более различных селенсодержащих соединений (например, проявляющую биологическую активность, которая отличается от активности первой композиции), используют для изменения митохондриальной активности (например, продукции АТФ и/или метаболизма глюкозы) в ткани печени. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки

предложена композиция (например, фармацевтическая композиция), содержащая селенсодержащее соединение (например, выявленное в примере 1). В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ повышения активности фермента PDHC и/или повышения активности митохондриального комплекса I у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом (например, субъекту с диабетом II типа), эффективного количества композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей селенсодержащее соединение (например, описанное в примере 1), повышающее активность митохондриального комплекса I и/или PDHC (например, тем самым усиливая митохондриальное дыхание у субъекта (например, в скелетных мышцах и/или печени).

В некоторых вариантах реализации предложены способы лечения, включающие: введение фармацевтически эффективного количества селенсодержащей композиции (например, дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, водорастворимой фракции дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, нерастворимой в воде фракции дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, экстракта дрожжей, обогащенных селеном (например, растворимого в кислых условиях), растворимого селеногликопротеина, селенсодержащих соединений (например, полученных или происходящих из дрожжей, обогащенных селеном (например, дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена) или их производных, выделенных или синтезированных селенсодержащих соединений (например, селеноэфиров, конъюгатов SeCys, содержащих ди- и трипептиды, селенолов или селеноксидов (или их производных), селенсодержащих белков и/или селенсодержащих пептидов, описанных в настоящем документе (например, в примере 1), по отдельности или в комбинации с еще одним агентом субъекту с состоянием, ассоциированным с ожирением или инсулинрезистентностью. В некоторых вариантах реализации указанное введение вызывает одно или более из ослабления или устранения одного или более из симптомов указанного состояния, предотвращение увеличения тяжести одного или более из симптомов указанного состояния и/или снижение, предотвращение или устранение дальнейшего развития заболеваний или состояний.

В некоторых вариантах реализации инсулинрезистентностью характеризуются адипоциты, клетки печени или мышечные клетки субъекта. В конкретных вариантах реализации инсулинрезистентность приводит к нарушениям метаболизма глюкозы у субъекта. В дополнительных вариантах реализации введение селенсодержащей композиции согласно настоящей заявке вызывает усиление метаболизма глюкозы у субъекта (например, адипоцитами, печенью и/или скелетными мышцами). В некоторых вариантах реализации усиление метаболизма глюкозы обусловлено увеличением синтеза АТФ в митохондриях, митохондриального дыхания и/или активности сигнального пути рецептора инсулина.

В конкретных вариантах реализации введение селенсодержащей композиции согласно настоящей заявке вызывает снижение количества жира в организме субъекта (например, снижает размер и/или количество адипоцитов у субъекта). В некоторых вариантах реализации введение вызывает у субъекта потерю по меньшей мере 10 фунтов массы тела (например, 10, 15, 20, 35, 60, 100, 200 или более фунтов). В некоторых вариантах реализации введение вызывает по меньшей мере 5% снижение массы тела субъекта (например, по меньшей мере 7%, 10%, 20%, 30%, 50%, 75% или большее снижение). В некоторых вариантах реализации состояние, подвергаемое лечению, является ожирением. В других вариантах реализации состояние, подвергаемое лечению, является диабетом

(например, II типа или как I, так и II типа). В дополнительных вариантах реализации состояние, подвергаемое лечению, является инсулинрезистентностью.

В некоторых вариантах реализации субъект страдает от или подвергается риску такого состояния, как ожирение, диабет и инсулинрезистентность. В некоторых

- 5 вариантах реализации лечение приводит к усилению метаболизма глюкозы, снижению количества жира в организме, отсутствию увеличения количества жира в организме, усилению сигнального пути рецептора инсулина, повышению/усилению митохондриальной активности, снижению или предотвращению хронического воспалительного процесса в печени, снижению или предотвращению хронического 10 воспаления в жировой ткани, снижению или предотвращению стеатоза печени, стимуляции расхода метаболической энергии, снижению уровня циркулирующих свободных жирных кислот и/или снижению уровня холестерина.

Состояния и заболевания, которые можно лечить с использованием способов и фармацевтически приемлемых композиций, предложенных в настоящем документе,

- 15 включают ожирение, диабет, диабет II типа, метаболический синдром, синдром инсулинрезистентности, состояния, связанные с метаболизмом липидов, и стеатоз печени (также называемый жировой дегенерацией печени), но не ограничиваются ими. Жировая дегенерация печени может варьироваться от жирового гепатоза по отдельности (стеатоз) до жирового гепатоза, связанного с воспалением (стеатогепатит).

20 Репродуктивная функция

Состояния и заболевания, которые можно лечить с использованием способов и фармацевтически приемлемых композиций, предложенных в настоящем документе, включают ожирение, диабет, диабет II типа, метаболический синдром, синдром инсулинрезистентности, состояния, связанные с метаболизмом липидов, и стеатоз

- 25 печени (также называемый жировой дегенерацией печени), но не ограничиваются ими. Жировая дегенерация печени может варьироваться от жирового гепатоза по отдельности (стеатоз) до жирового гепатоза, связанного с воспалением (стеатогепатит).

Современный социальный шаблон наличия детей у матери в пожилом возрасте ( $\geq 35$  лет) оказывает все большее влияние на спрос на медицинские услуги. В дополнение к

- 30 снижению рождаемости, женщины старше 35 лет подвергаются повышенному риску родовых осложнений и дефектов (см., например, Noda et al., *Biology of Reproduction*, 2012. 86(1): р. 1-8). Исследование, проведенное в США, позволило прийти к выводу, что пожилой возраст матери являлся одним из наиболее распространенных факторов риска, связанных с мертворождениями и, несмотря на более высокую частоту 35 акушерского вмешательства, для пожилых женщин характерна повышенная частота преждевременных родов, кесарева сечения и рождения недоношенных детей (LBW) (см., например, Noda et al., *Biology of Reproduction*, 2012. 86(1): р. 1-8).

Кроме того, существующие у матери болезненные состояния, например, ожирение и диабет, усиливаются с возрастом матери, как и связанные с беременностью осложнения

- 40 со стороны матери, например, преэклампсия и гестационный диабет (см., например, Hoque, M., *Advanced maternal age and outcomes of pregnancy: A retrospective study from South Africa*. 2012. Ожирение не только снижает частоту овуляции у женщин, но и значительно уменьшает вероятность беременности у женщин с регулярной овуляцией. На модели ожирения матери у мышей также продемонстрирована высокая распространенность 45 аномалий веретена деления, а также увеличение образования активных форм кислорода (АФК) в митохондриях ооцитов (см., например, Mills et al., *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 2011. 21(4): р. 107-111). Токсические состояния (например, повышение уровня АФК), действующие на ооциты у матерей с диабетом, вызывают

значительные повреждения митохондрий (см., например, Shaum, Maturitas, 2013). Кроме того, на модели диабета у мышей продемонстрировано увеличение апоптоза зернистых клеток и нарушение созревания ооцитов (см., например, Shaum, Maturitas, 2013). Эти и другие исследования на животных моделях выявили роль дисфункции ооцитов при

5 ожирении и диабете.

Связь между ожирением, диабетом и репродуктивной функцией вызывает особую обеспокоенность, учитывая продолжающуюся эпидемию ожирения, распространенность диабета и тенденцию к задержке родов у женщин старше 35 лет (см., например, Chang et al., Endocrinology, 2005. 146(5): p. 2445-53).

10 Последние данные свидетельствуют о центральной роли митохондрий и накоплении точечных мутаций и делеций в митохондриальной ДНК (мтДНК) в процессе старения. Дефектные митохондрии и последующая низкая продукция АТФ является одним из основных факторов, нарушающих качество ооцитов (см., например, Bentov et al., Fertility and Sterility 2013. 99(1)). В процессе репликации и размножения митохондрий популяция

15 митохондрий в ооцитах резко увеличивается и, безусловно, ооциты содержат максимальное количество митохондрий и копий митохондриальной ДНК (мтДНК) среди любых клеток

20 Сообщалось, что ооциты женщин с недостаточностью яичников содержат меньшее количество копий мтДНК, чем у женщин с нормальным профилем яичников. Интересно, что мыши с мутатором женской митохондриальной ДНК (POLG, описанные в настоящем документе), у которых преждевременно проявляются фенотипические характеристики, аналогичные характеристикам пожилых лиц, страдают выраженным снижением репродуктивной функции и не могут зачать в возрасте более 20 недель, несмотря контакт с самцами в течение нескольких месяцев (см., например, Yu et al., J Cell Physiol., 2010. 3: 25 p. 672-80). Эти и другие исследования показали, что репродуктивное старение не является результатом преференциального отбора яйцеклеток, а представляет собой эффект процесса старения и, конкретнее, влияние старения на функцию митохондрий.

25 Высокий уровень активных форм кислорода (АФК) тесно связан с повреждениями митохондриальной ДНК, и приблизительно 90% АФК в клетке производится комплексами I и III митохондрий.

30 Уровень АФК в фолликулярной жидкости можно использовать для прогнозирования успешного оплодотворения *in vitro* оплодотворения; предполагается, что повышенный уровень АФК в перитонеальной жидкости приводит к бесплодию у некоторых женщин без очевидной причины (см., например, Trifunovic et al., Nature, 2004. 429(6990): p. 417-423). Кроме того, продемонстрирован повышенный исходный уровень общей антиоксидантной емкости (ТАС) в фолликулах ооцитов, подвергшихся успешному оплодотворению (см., например, Cupta et al., Reprod Fertil Dev, 2011. 23(5): p. 673-80).

35 Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены композиции и способы усиления и/или поддержания репродуктивной функции (например, в ооцитах (например, в старых ооцитах)). В некоторых вариантах реализации селенсодержащую композицию (например, селенсодержащие соединения, описанные в настоящем документе) вводят субъекту, нуждающемуся в этом (например, субъекту, желающему забеременеть) в эффективном количестве для поддержания или усиления репродуктивной функции. Кроме того, в некоторых вариантах реализации настоящей 40 заявки предложено применение селенсодержащей композиции (например, описанной в настоящем документе) при производстве лекарственного средства или пищевой добавки для поддержания или усиления репродуктивной функции. В некоторых 45 вариантах реализации композиции и способы согласно настоящей заявке применяют

для улучшения качества, количества и/или функциональности ооцитов (например, за счет снижения уровня активных форм кислорода и/или увеличения общей антиоксидантной емкости (например, в митохондриях)).

Таким образом, в настоящей заявке показано, что с использованием композиций и

- 5 способов согласно настоящей заявке можно лечить разнообразные митохондриальные заболевания, в том числе заболевания, характеризующиеся признаками или симптомами, вызванными дисфункцией митохондрий в клетках. Примеры митохондриальных заболеваний широко известны и включают митохондриальную энцефаломиопатию, лактатацидоз и инсультоподобные эпизоды (MELAS), хроническую прогрессирующую 10 внешнюю офтальмоплегию, миоклоническую эпилепсию, ассоциированную с разорванными красными волокнами; синдром Фукухара, болезнь Лебера, энцефалопатию Ли и болезнь Пирсона, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены способы регуляции метаболизма скелетных мышц или энергетического гомеостаза скелетных мышц или

- 15 метаболизма печени или энергетического гомеостаза печени у субъекта. В таких способах субъекту, нуждающемуся в этом, вводят эффективное количество селенсодержащей композиции (например, описанной в настоящем документе). Способы регуляции метаболизма скелетных мышц или энергетического гомеостаза скелетных мышц у субъекта включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, селенсодержащей 20 композиции (например, описанной в настоящем документе), модулирующей митохондриальную активность (например, как описано в настоящем документе). Кроме того, композиции и способы согласно настоящей заявке можно применять для противодействия влиянию некоторых лекарственных веществ на активность печени и/или мышц (например, во время и/или после лечения с применением 25 химиотерапевтических препаратов (например, применяемых для лечения рака и/или аутоиммунных заболеваний). Кроме того, композиции и способы согласно настоящей заявке можно применять для повышения работоспособности (например, физической работоспособности) здоровых субъектов.

В некоторых вариантах реализации селенсодержащую композицию (например,

- 30 описанную в настоящем документе) вводят субъекту, нуждающемуся в этом, с целью повышения функции и/или активности митохондрий у субъекта (например, для лечения (например, профилактического или терапевтического) состояния или заболевания, связанного с митохондриальной дисфункцией). В некоторых вариантах реализации введение селенсодержащей композиции, описанной в настоящем документе, снижает 35 митохондриальную гибель клеток у субъекта. В некоторых вариантах реализации введение селенсодержащей композиции, описанной в настоящем документе, снижает продукцию активных форм кислорода у субъекта. В некоторых вариантах реализации введение селенсодержащей композиции, описанной в настоящем документе, ослабляет признаки, симптомы или состояния, связанные с гипоксией, у субъекта. В некоторых 40 вариантах реализации введение селенсодержащей композиции, описанной в настоящем документе, увеличивает продукцию АТФ в митохондриях субъекта. В некоторых вариантах реализации введение селенсодержащей композиции, описанной в настоящем документе, усиливает митохондриальное дыхание у субъекта.

Сердечно-сосудистые заболевания, которые можно лечить с помощью композиций

- 45 и способов согласно настоящей заявке, включают кардиомиопатию или миокардит; например, идиопатическую кардиомиопатию, метаболическую кардиомиопатию, алкогольную кардиомиопатию, медикаментозную кардиомиопатию, ишемическую кардиомиопатию и гипертоническую кардиомиопатию. Кроме того, композиции и

способы, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения или предотвращения атероматозных заболеваний крупных кровеносных сосудов (макрососудистых заболеваний), например, аорты, коронарных артерий, сонных артерий, цереброваскулярных артерий, почечных артерий, подвздошных артерий, 5 бедренных артерий и подколенных артерий. Другие сосудистые заболевания, которые можно лечить или предотвращать, включают заболевания, связанные с артериолами сетчатки, клубочковыми артериолами, сосудами нервной системы, артериолами сердца и соответствующими капиллярными руслами глаз, почек, сердца и центральной и периферической нервной системы.

10 Аналогичным образом, композиции и способы согласно настоящей заявке можно применять для лечения (например, профилактического или терапевтического) мышечных заболеваний. Мышечные заболевания включают мышечную дистрофию и миопатию, но не ограничиваются ими.

15 Композиции и способы согласно настоящей заявке можно применять для лечения расстройств инсулинрезистентности (например, любого заболевания или состояния, вызванного или способствующего инсулинрезистентности). Примеры включают диабет, ожирение, метаболический синдром, синдромы инсулинрезистентности, синдром X, инсулинрезистентность, высокое давление крови, гипертензию, высокий уровень холестерина в крови, дислипидемию, гиперлипидемию, дислипидемию,

20 атеросклеротические заболевания, в том числе инсульт, заблевание коронарных артерий или инфаркт миокарда, гипергликемию, гиперинсулинемию и/или гиперпроинсулинемию, нарушение переносимости глюкозы, задержку высвобождения инсулина, осложнения диабета, в том числе заболевание коронарных сосудов, стенокардию, застойную сердечную недостаточность, инсульт, нарушение когнитивных функций при деменции,

25 ретинопатию, периферическую нейропатию, нефропатию, гломерулонефрит, гломерулосклероз, нефротический синдром, гипертонический нефросклероз, осложнения беременности, недостаточность женских репродуктивных функций (например, нарушения менструального цикла, бесплодие, нерегулярные овуляции, синдром поликистозных яичников (СПКЯ)), липодистрофию, расстройства, имеющие отношение

30 к холестерину, например, камни в желчном пузыре, холецистит и холестаз, подагру, обструктивные апноэ во сне и проблемы с дыхательной системой, остеоартрит и предотвращение и лечение потери костной массы, например, остеопороз, но не ограничиваются ими.

35 Настоящая заявка не ограничена типом вводимой субъекту селенсодержащей композиции. Источник селена может быть синтетическим и природным, а селен может быть органическим или неорганическим. В настоящем документе в зависимости от предполагаемой мишени, подлежащей лечению у субъекта, можно использовать множественные формы селена независимо друг от друга или в комбинации друг с другом. В предпочтительном варианте реализации субъекту вводят селен в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (например, SELPLEX). Кроме того, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено применение и введение селенсодержащих соединений (например, полученных или происходящих из дрожжей, обогащенных селеном) или их производных. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено применение и введение 40 селенсодержащих фракций, полученных из дрожжей, обогащенных селеном. Например, в некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту, содержит водорастворимую фракцию дрожжей, обогащенных селеном. В некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту, содержит

45

нерастворимую в воде фракцию дрожжей, обогащенных селеном.

В некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту, содержит одиночную жидкую фазу, содержащую экстракт дрожжей, обогащенных селеном (например, растворимый в кислых условиях (например, фракцию растворимых селенсодержащих соединений (например, растворимых селеногликопротеинов), экстрагированную и/или осажденную при первом значении pH (например, pH 1,85), вторую фракцию, осажденную при втором значении pH (например, pH 3,0), третью фракцию, осажденную при третьем значении pH (например, pH 4,0), и четвертую фракцию, осажденную при четвертом значении pH (например, pH 6,0))). В некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту, содержит экстракт дрожжей, обогащенных селеном, полученный в соответствии с описанием в публикации патента США №20120164234 A1, опубликованной 28 июня 2012 г., полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено одно или более

из селенсодержащих соединений (например, селеноэфиров, конъюгатов SeCys, содержащих ди- и трипептиды, селенолов или селеноксидов (или их производных), селенсодержащих белков и/или селенсодержащих пептидов, композиций, содержащих указанные соединения, и способов их применения (например, для медицинского и/или ветеринарного применения, как описано в настоящем документе) (см. пример 1).

Например, в некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту (например, в способе согласно настоящей заявке), содержит одно или несколько из следующих соединений: 2,3-DHP-селенцистеинцистеина, N-ацетилселенцистеинселенгомоцистеина, метилтиоселенглутатиона, 2,3-DHP-селенцистеинселенцистеина, 2,3-DHP-селенцистеинцистеинилглицина, 2,3-DHP-

селенцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенгомоцистеинцистеинилглицина, селенметилселенглутатиона, селенглутатионцистеина, глутатионселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенцистеин- $\gamma$ -глутамоилцистеина, ди-2,3-DHP-селенцистеина, N-ацетилцистеинселенглутатиона, селенглутатионселенцистеина, 2,3-DHP-селенцистеин-2,3-DHP-селенгомоцистеина,

глутатион-N-ацетилселенгомоцистеина, глутатионселенцистеинилглицина,  $\gamma$ -глутамоилселенцистеин- $\gamma$ -глутамоилцистеина,  $\gamma$ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-селенцистеина, глутатион-2,3-DHP-селенцистеина, глутатион-2,3-DHP-селенгомоцистеина, ди- $\gamma$ -глутамоилселенцистеина, селенглутатион- $\gamma$ -глутамоилцистеина, селенглутатион-2,3-DHP-селенцистеина, селенглутатион-2,3-DHP-селенгомоцистеина, селенглутатионтио-

2,3-DHP-селенцистеина, селенглутатион- $\gamma$ -глутамоилселенцистеина, селенглутатионглутатиона, селендиглутатиона, диселенглутатиона, тиодиселенглутатиона, метилдегидрогомоцистеина, селенметионина, селенгомолантионина, N-ацетилселенцистациионина, дегидрокси-5'-метилселенаденозина, N-ацетилцистеинселенгомоцистеина, 2,3-DHP-селенлантионина, этилселенлантоина, N-

пропионилселенцистациионина, 2,3-DHP-селенцистациионина, метилселенглутатиона,  $\gamma$ -глутамоилселенцистациионина, селенглутатиона, селен-(гидроксил)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина), N-ацетилцистеинселенгомоцистеина, аллилселенаденозилгомоцистеина, селенаденозилгомоцистеина,

селенгидроксиаденозилгомоцистеина, селенаденозина, селенаденозил-Se(метил)-

селеноксида, аденоцилгидроксиселеноксида, этилселенаденозина, селен-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезоксиаденозина), адноцилгидроксиселеноксида и селенаденозил-Se (метил)-селеноксида. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены способы выявления селенсодержащих соединений, присутствующих в дрожжах,

обогащенных селеном (например, способов, описанных в примере 1).

В некоторых вариантах реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту (например, в способе согласно настоящей заявке) содержит один или более из белков или пептидных фрагментов, где одна или более молекул серы, присутствующих в одном

или нескольких аминокислотных остатках белка или пептида, замещена молекулой селена. Настоящая заявка не ограничена конкретным селенсодержащим белком или пептидом. В предпочтительном варианте реализации селенсодержащая композиция, вводимая субъекту (например, в способе согласно настоящей заявке), содержит один или более из пептидных фрагментов, где одна или более молекул серы, присутствующих

10 в одном или нескольких аминокислотных остатках пептида, замещена молекулой селена из: MVAEAEK, DYMGAAK, YMGAAK, ELQDIANPIMSK, NQAAMNPSNTVFDAK, NFTPEQISSMVLGK, NFTPEQISSMVLGK, MVSEAEK, PEVQGDMK, ELQDIANPIMSK, AMSSR, VQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGK, AAAEGPMK, LTGMAFR, PFVSNDYAAVMVK, AFGIEEGLMTTVHSLTATQK, PFITNDYAAVMFK, PGMVVTFAPAGVTTEVK,

15 VETGVIKPGMVVTFAPAGVTTEVK, AAATAAMTK, SIVPSGASTGVHEALEMR, WMGK, SIVPSGASTGVHEALEMR, AMPQK, AAMAK, HVGDMEIR, VIEEPITSETAMK, VLQALEEIGIVEISPK, LPAASLGDMVMATVK, AGMTTIVR, AGMTTIVR, MLMPK, TMGAK, MNAGR, TYENMK, MGHDQSGTK, GEAIMAPK, Ac-MNVFGK, AMEVVASER, IVMR, MA(I/L)R, AMXAK, DLETLTMHTK, LVMR, VMR, LTGMAFR, 20 SRPNVEVVALNDPFITNDYAAVMFK и VINDAFGIEEGLMTTVHSLTATQK.

Другие формы селенсодержащих соединений, которые находят применение в различных вариантах различных вариантах реализации настоящей заявки, описаны в патентах США №6911550, 6197295, 5221545, 6 и 6576233, и заявках на патент США №20010043925, 20050069594 и 20050089530, которые полностью включены в настоящую 25 заявку посредством ссылок.

В некоторых вариантах реализации композиции (например, фармацевтические композиции) содержат 2 или более (например, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более или 50 или более) отдельных селенсодержащих соединений 30 (например, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложена композиция, содержащая комбинацию 2 или более (например, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 15 или более, 20 или более, 30 или более, 40 или более или 50 или более) селенсодержащих соединений (например, выделенных, химически

35 синтезированных или рекомбинантных селенсодержащих соединений), предназначенных для конкретного применения (например, в комбинации демонстрирующих желательный уровень биологической активности (например, стимулирующей и/или ингибирующей активности)). Например, в некоторых вариантах реализации первую композицию, содержащую комбинацию двух или более селенсодержащих соединений, используют

40 для повышения митохондриальной активности (например, продукции АТФ и/или дыхания) в мышечной ткани, тогда как вторую композицию, содержащую комбинацию двух или более различных селенсодержащих соединений (например, проявляющую биологическую активность, которая отличается от активности первой композиции), используют для изменения митохондриальной активности в ткани печени. В некоторых

45 вариантах реализации композицию, содержащую два или более селенсодержащих соединения, настраивают в соответствии с конкретным генетическим профилем индивида (например, для адресного воздействия на определенный ген или белок). Аналогичным образом для применения при лечении конкретного заболевания или состояния у

индивидуа можно настроить дрожжевые экстракты или фракции. Таким образом, разрабатывают индивидуализированные составы для отдельно взятого субъекта, нуждающегося в лечении.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложена селенсодержащая

5 композиция в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, в виде или совместно с биологически активной добавкой (например, отпускаемой без рецепта композицией, предлагаемой, например, в качестве средства, улучшающего состояние здоровья или общее

10 самочувствие).

В дополнительных вариантах реализации настоящей заявки предложены фармацевтические композиции, содержащие одну или более из форм селена (например, описанных выше) отдельно или в комбинации с по меньшей мере одним из других агентов, например, антидиабетическим средством, жирной кислотой (например, 15 эйкозапентаеновой кислотой (ЭПК)) и т.д., которые можно вводить в любом стерильном биосовместимом фармацевтическом носителе, включая физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу и воду, но не ограничиваясь ими.

Способы согласно настоящей заявке находят применение при лечении (например, профилактическом или терапевтическом) субъекта (например, субъекта с диабетом и/ 20 или ожирением). Селенсодержащие композиции (например, SEL-PLEX) можно внутривенно вводить субъекту (например, пациенту) в фармацевтически приемлемом носителе, например, физиологическом растворе. Можно использовать стандартные способы для внутриклеточной доставки соединений (например, доставки посредством липосом). Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники. 25 Селенсодержащие композиции можно применять для внутривенного введения, а также парентерального введения, например, внутривенно, подкожно, внутримышечно и внутрибрюшинно.

Как известно в области медицины, дозировки для любого субъекта могут зависеть от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, 30 конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и взаимодействия с другими одновременно вводимыми препаратами.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки селенсодержащие композиции и/или составы можно вводить субъекту отдельно или в комбинации с другими формами селена, лекарственными средствами, 35 низкомолекулярными соединениями или в составе фармацевтической композиции, где они смешаны со вспомогательным(и) веществом(ами) или другими фармацевтически приемлемыми носителями. В одном варианте реализации настоящей заявки фармацевтически приемлемый носитель является фармацевтически инертным. В еще одном варианте реализации настоящей заявки селенсодержащие композиции можно 40 отдельно вводить лицам, подверженным, подвергающимся риску или страдающим от диабета и/или ожирения. Селенсодержащие композиции (например, SEL-PLEX или селенсодержащие соединения, присутствующие в нем или получаемые из него, отдельно или в комбинации с одной или более из форм селена) можно добавлять к диетическому напитку или продуктам питания (например, ENSURE, POWERBAR и т.п.), 45 мультивитаминам, диетическим продуктам, пищевым продуктам и т.д. для ежедневного употребления.

В зависимости от мишени, которую планируется изменить за счет лечения, можно составить фармацевтическую композицию и вводить ее системно или местно. Способы

составления и введения можно найти в последнем издании "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Подходящие пути могут, например, включать пероральное или трансмукозальное введение; а также парентеральную доставку, в том числе внутримышечное, подкожное, интрамедуллярное, интракальное,

5 внутрижелудочковое, внутривенное, внутрибрюшинное или интраназальное введение.

Селенсодержащую композицию (например, фармацевтическую композицию) для инъекций согласно настоящей заявке можно составить на основе водных растворов, предпочтительно физиологически совместимых буферов, например, раствора Хэнкса, раствора Рингера или забуференного физиологического раствора. Для введения состава 10 в ткани или клетки используют пенетранты, соответствующие конкретному барьеру, который необходимо преодолеть. Такие пенетранты хорошо известны в данной области техники.

В других вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящей заявке составляют с использованием фармацевтически приемлемых носителей, хорошо известных в данной области техники, в дозировках, подходящих для перорального применения. Такие носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, пастообразных взвесей, супензий и т.п. для перорального или назального приема пациентом, которого надлежит лечить.

20 Фармацевтической композиции, подходящие для применения в настоящей заявке, включают композиции, содержащие активные ингредиенты (например, дрожжи, обогащенные селеном, или селенсодержащие соединения) в эффективном количестве для достижения поставленной цели. Например, в предпочтительном варианте реализации эффективное количество фармацевтической композиции содержит количество дрожжей, 25 обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, или селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них), увеличивающее митохондриальную активность (например, продукцию АТФ и/или дыхание). Специалисты в данной области техники могут определить эффективное количество, особенно с учетом описания, представленного в настоящем документе.

30 Помимо активных ингредиентов, фармацевтические композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, в том числе вспомогательные вещества, которые облегчают обработку активных соединений в препаратах для фармацевтического применения. Препараты, составленные для перорального применения, могут быть в виде таблеток, драже, капсул или растворов.

35 Фармацевтическую композицию согласно настоящей заявке можно производить посредством известного способа (например, с помощью обычных процессов смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, измельчения, эмульгирования, инкапсуляции, захвата или лиофилизации).

Фармацевтические составы для парентерального введения содержат водные растворы 40 активных соединений в водорастворимой форме. Кроме того, можно получить супензии активных соединений в виде соответствующих масляных супензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, например, кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, например, этилолеат, или триглицериды, или липосомы. Водные супензии для инъекций могут 45 содержать вещества, повышающие вязкость супензии, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит или декстрозу. При необходимости супензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, повышающие растворимость соединений для получения высококонцентрированных растворов.

Фармацевтические препараты для перорального применения можно получить путем объединения активных соединений с твердым вспомогательным веществом, необязательного измельчения полученной смеси и, при желании, переработки смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ с получением таблеток или ядер драже. Подходящие вспомогательные вещества представляют собой углеводные или белковые наполнители, например, углеводы, в том числе лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; крахмал кукурузы, пшеницы, риса, картофеля и т.д.; целлюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу или карбоксиметилцеллюлозу натрия; смолы, в том числе гуммиарабик и трагакант; а также белки, например, желатин и коллаген. При желании можно добавлять разрыхлители или растворители, например, перекрестно сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновую кислоту или ее соль, например, альгинат натрия.

Ядра драже покрывают соответствующим покрытием, например, концентрированными растворами сахара, которые могут также содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбополовый гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы глазури и подходящие органические растворители или смеси растворителей. В покрытие таблеток и драже можно добавлять красители и пигменты с целью идентификации продукта или указания количества активного соединения.

Фармацевтические препараты, применяемые перорально, включают твердые капсулы из желатина, а также мягкие герметичные капсулы из желатина, покрытые, например, глицерином или сорбитом. Твердые капсулы могут содержать активные ингредиенты, смешанные с наполнителем или связующими веществами, например, лактозой или крахмалом, скользящие вещества, например, тальк или стеарат магния и, при необходимости, стабилизаторы. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, например, жирных маслах, жидким парафине или жидким полиэтиленгликоле со стабилизаторами или без них.

Селенсодержащие композиции согласно настоящей заявке, по отдельности или в составе с фармацевтической приемлемым носителем, можно получить, поместить в соответствующий контейнер и маркировать для лечения указанного состояния. Для селенсодержащих композиций или составов показания, приведенные на этикетке, могут включать лечение состояний, связанное с профилактическим или терапевтическим лечением диабета и/или ожирения, а также других заболеваний или состояний, при котором возможно получение благоприятного эффекта от стимуляции митохондриальной активности (например, митохондриальной активности в скелетных мышцах и/или печени).

Фармацевтическая композиция может быть представлена в виде соли и образована с участием многих кислот, в том числе соляной, серной, уксусной, молочной, винной, яблочной, янтарной и т.д., но не ограничиваясь ими. Соли, как правило, более растворимы в водных или других протонных растворителях, чем соответствующие формы свободных оснований. В других случаях предпочтительный препарат до применения может представлять собой лиофилизированный порошок в 1-50 мМ гистидина, 0,1%-2% сахарозе, 2%-7% манните в диапазоне pH 4,5-5,5, в комбинации с буфером.

Терапевтически эффективную дозу любого соединения, применяемого в способах согласно настоящей заявке, можно первоначально оценить с помощью анализа на основе культуры клеток. Затем, в предпочтительном случае, можно составить дозировку на животных моделях (в частности, моделях мыши) с целью достижения диапазона желательных циркулирующих концентраций.

Эффективное количество (например, терапевтически эффективная доза) относится к количеству, облегчающему или предотвращающему признаки, симптомы и/или состояния, связанные с диабетом и ожирением, у субъекта. Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно оценить с помощью 5 стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных, например, определяя LD<sub>50</sub> (доза, смертельная для 50% особей популяции) и ED<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная для 50% особей популяции). Соотношение доз, оказывающих токсическое и терапевтическое действие, представляет собой 10 терапевтический индекс и может выражаться в виде соотношения LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Соединения с большими терапевтическими индексами являются предпочтительными. Данные, 15 полученные с помощью указанных анализов на основе культуры клеток и дополнительных исследований на животных, можно использовать при разработке диапазона дозировок для медицинского применения. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, включающем ED<sub>50</sub>, обладающих небольшой токсичностью или не обладающих токсичностью. Эта дозировка меняется в пределах данного диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы, чувствительности пациента и пути введения.

Точную дозировку может выбрать субъект или врач с учетом пациента, которого 20 следует лечить. Дозировку и способ применения корректируют для обеспечения достаточного уровня активного вещества или для поддержания желательного эффекта (например, изменения экспрессии генов у субъекта). Дополнительные факторы, которые 25 можно принимать во внимание, включают тяжесть болезненного состояния; возраст, вес и пол пациента; питание, время и частоту введения, комбинацию(и) лекарств, реакции чувствительности и переносимость/реакцию на лечение. Фармацевтические композиции 30 длительного действия можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю или каждые две недели в зависимости от периода полувыведения и скорости выведения конкретного состава. Таким образом, настоящая заявка не ограничена продолжительностью приема композиции согласно настоящей заявке субъектом. В некоторых вариантах реализации 35 субъект принимает/получает композицию согласно настоящей заявке в течение 3-12 месяцев (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев). Тем не менее, настоящая заявка не ограничена этим промежутком времени. В некоторых вариантах реализации субъект принимает/получает композицию согласно настоящей заявке в течение менее 40 чем 3 месяцев (например, 1 или 2 месяцев) или более чем 12 месяцев (например, 15, 18, 21, или 24, месяцев, 2,5 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет, 6 лет, 7 лет, 8 лет, 9 лет, 10 лет или более).

В некоторых вариантах реализации селенсодержащую композицию согласно 45 настоящей заявке (например, органический селен (например, селенизированные дрожжи (например, SEL-PLEX) или селенсодержащее соединение, присутствующее в них или получаемое из них)) вводят, в суточной дозе, обеспечивающей получение субъектом от 25 до 800 мкг селена в день (например, SEL-PLEX вводят субъекту, обеспечивая получение субъектом от 25 до 800 мкг селена каждый день). Тем не менее, настоящая заявка не ограничена этим. Фактически в некоторых вариантах реализации селенсодержащую композицию согласно настоящей заявке вводят в суточной дозе, 40 обеспечивающей получение субъектом от менее 25 (например, 24, 23, 22, 21, 20 или менее) до более 800 (например, 825, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100 или более) мкг селена в день. В предпочтительных вариантах реализации селен (например, органический селен (например, селенизированные дрожжи (например, SEL-PLEX))) вводят в суточной дозе от 200 до 500 мкг в день. В других предпочтительных вариантах реализации селен

вводят в суточной дозе от 200 до 400 мкг в день. В некоторых вариантах реализации разовую дозу селена (например, органического селена (например, селенизованных дрожжей (например, SELPLEX))) вводят раз в день. В других вариантах реализации каждый день вводят 2, 3, 4 или более доз (например, один раз утром и один раз ночью,

5 или раз в каждые 4-6 часов). Например, в некоторых вариантах реализации селен вводят субъекту в трех раздельных, более чем в трех раздельных, двух раздельных или менее чем двух раздельных дозах. В некоторых предпочтительных вариантах реализации суточную дозу вводят посредством капсулы с замедленным высвобождением. В некоторых вариантах реализации суточная доза составляет между 25-75 мкг/кг селена.

10 В других вариантах реализации суточная доза составляет 200 мкг селена (например, органического селена (например, селенизованных дрожжей (например, SEL-PLEX))). В некоторых вариантах реализации дозу составляют для введения субъекту конкретного возраста (например, моложе 50 лет, старше 50 лет, моложе 70 лет, старше 70 лет, моложе 80 лет, старше 80 лет и т.д.).

15 Фармацевтические композиции согласно настоящей заявке можно вводить посредством ряда путей в зависимости от желательности местной или системной терапии и обрабатываемой области. Введение может быть местным (в том числе офтальмологическим и через слизистые оболочки, включая вагинальную и ректальную доставку), пульмонарным (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков 20 или аэрозолей, в том числе посредством ингалятора; интрапрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, подкожную, внутриартериальную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или вливание; или внутричерепное, например, интракраниальное или внутрижелудочковое введение.

25 Считается, что селенсодержащие композиции и составы особенно полезны при пероральном введении.

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластиры, гели, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Можно использовать общепринятые фармацевтические 30 носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т.п.

Композиции и составы для перорального применения включают порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, пакетики с порошками или таблетки. Может быть желательным применение загустителей, вкусоароматических агентов, разбавителей, эмульгаторов, диспергирующих средств 35 или связующих веществ.

Композиции и составы для парентерального, интракраниального или внутрижелудочкового введения могут включать стерильные водные растворы, которые могут также содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, например, усилены проницаемости, носители и другие фармацевтически приемлемые носители 40 или вспомогательные вещества, но не ограничиваются ими.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции согласно настоящей заявке содержат липосомы, эмульсии и составы, содержащие липосомы, но не ограничиваются ими. Эти композиции можно создать из различных компонентов, которые включают предварительно составленные жидкости, 45 самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полужидкие вещества, но не ограничиваются ими.

Фармацевтические составы согласно настоящей заявке может быть удобно представлять в дозированной лекарственной форме и получать любым способом,

известным в области фармацевтической промышленности. Такие методики включают этап объединения активных ингредиентов с фармацевтическим(и) носителем(ями) или вспомогательным(и) веществом(ами). В целом, составы получают путем равномерного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями или

- 5 тонкоизмельченными твердыми носителями или как жидкими, так и тонкоизмельченными твердыми носителями, а затем, при необходимости, формования продукта.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящей заявке можно составить в виде любой из многих возможных лекарственных форм,

- 10 например, таблеток, капсул, жидких сиропов, гелевых капсул, суппозиториев и клизм, но не ограничиваясь ими. Кроме того, композиции согласно настоящей заявке можно составить в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстрозу. Суспензия может также

15 содержать стабилизаторы.

В одном варианте реализации настоящей заявки фармацевтическую композицию можно составить и применять в виде пен. Фармацевтические пены включают такие составы, как эмульсии, микроэмульсии, кремы, желе и липосомы, но не ограничиваются ими. Эти составы различаются по составу и консистенции конечного продукта, хотя

20 их природа в основном сходна.

Композиции согласно настоящей заявке могут содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные, совместимые, фармацевтически активные материалы, например, противоздушные средства, вяжущие средства, местные

- 25 анестетики или противовоспалительные агенты, или дополнительные материалы, которые можно применять при физическом составлении различных лекарственных форм композиций согласно настоящей заявке, например, красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутняющие агенты, загустители и стабилизаторы. В то же время добавление таких материалов не должно ненадлежащим образом влиять

30 на биологическую активность компонентов композиций согласно настоящей заявке. Составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, например, скользящими веществами, консервантами, стабилизаторами, увлажняителями, эмульгаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красителями, вкусоароматическими добавками или ароматическими

- 35 веществами и т.п., не оказывающими вредного воздействия на нуклеиновую(ые) кислоту(ы) состава.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены фармацевтические композиции, содержащие (а) одну или более из форм селена (например, SEL-PLEX и/или селенсодержащее соединение, присутствующее в нем или получаемое из него) и (б)

- 40 один или более из других агентов (например, антидиабетических средств, антиоксидантов и т.д.). В некоторых вариантах реализации можно совместно или последовательно применять два или более комбинированных агента.

Настоящая заявка также включает способы, включающие совместное введение селенсодержащих соединений, описанных в настоящем документе, с одним или более

- 45 из дополнительных активных агентов (например, антидиабетических средств, антиоксидантов и т.д.). Фактически, в дополнительном аспекте настоящей заявки предложены способы усовершенствования известных в данной области техники терапевтических средств и/или фармацевтических композиций за счет совместного

введения селенсодержащей композиции согласно настоящей заявке. В рамках процедур совместного введения агенты можно вводить одновременно или последовательно. В одном варианте реализации соединения, описанные в настоящем документе, вводят до введения другого(их) активного(ых) агента(ов) (например, бета-блокатора).

5 Фармацевтические составы и способы введения могут представлять собой любой из составов и способов, описанных выше. Кроме того, каждый из двух или более совместно вводимых агентов можно вводить с использованием различных способов или различных составов.

Агент или агенты, подлежащие совместному введению, зависят от типа состояния,

10 которое следует лечить. Например, если состояние, которое следует лечить, представляет собой ожирение, дополнительный агент может представлять собой лекарственное средство от ожирения или препарат для потери массы тела и т.п. Если состояние, которое следует лечить, представляет собой предотвращение или лечение диабета, дополнительный агент может представлять собой любое из антидиабетических лекарственных средств, известных в данной области техники. Дополнительные агенты, подлежащие совместному введению, могут представлять собой любые из агентов, известных в данной области техники, в том числе агенты, в настоящее время применяемые в клинической практике, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки антиоксиданты совместно

20 вводят с селенсодержащими композициями или составами согласно настоящей заявке. Настоящая заявка не ограничена типом используемого антиоксиданта. Фактически считается, что в настоящей заявке можно применять различные антиоксиданты, включая алкилированные дифениламины, N-алкилированные фенилендиамины, фенил- $\alpha$ -нафтиламин, алкилированный фенил- $\alpha$ -нафтиламин, диметилхинолины, 25 триметилдигидрохинолины, стерически затрудненные фенольные соединения, алкилированные гидрохиноны, гидроксилированные тиодифенильные простые эфиры, алкилиденбисфенолы, тиопропионаты, металлодитиокарбаматы, 1,3,4-димеркаптотиадиазол, жирорастворимые соединения меди, NAUGALUBE 438, NAUGALUBE 438L, NAUGALUBE 640, NAUGALUBE 635, NAUGALUBE 680, 30 NAUGALUBE AMS, NAUGALUBE APAN, Naugard PANA, NAUGALUBE TMQ, NAUGALUBE 531, NAUGALUBE 431, NAUGALUBE BHT, NAUGALUBE 403, NAUGALUBE 420, аскорбиновую кислоту, токоферолы, альфа-токоферол, сульфгидрильное соединение, метабисульфит натрия, N-ацетилцистеин, липоевую кислоту, дигидролипоевую кислоту, лактоферрин, аскорбиновую кислоту, 35 аскорбипальмитат, аскорбиполипептид, бутилированный гидрокситолуол, ретиноиды, ретинол, ретинилпальмитат, токотриенолы, убихинон, флавоноид, изофлавоноид, генистин, диадзин, ресвератрол, виноградные косточки, зеленый чай, кору сосны, прополис, IRGANOX, антиген P, SUMILIZER GA-80, бета-каротин, ликопин, витамин С, витамин Е и витамин А, но не ограничиваясь ими.

#### 40 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Следующие примеры приведены для демонстрации и дополнительного иллюстрирования некоторых предпочтительных вариантов реализации и аспектов настоящей заявки и не должны рассматриваться как

##### Пример 1

45 Выявление и исследование характеристик селенсодержащих соединений в дрожжах, обогащенных селеном

Селен (Se) является важным элементом в рационе человека и животных. Низкий уровень Se во многих странах вызывает растущий интерес к селенсодержащим пищевым

и кормовым добавкам (см., например, Rayman, Br. J. Nutr., 92 (2004), р. 557). Дрожжи, выращенные в среде, богатой селеном (Se), можно использовать в качестве источника органического Se для получения добавок для человека и животных. Наиболее популярной формой добавок на основе Se являются дрожжи, выращенные в присутствии селената или селениита, которые способны накапливать до 3000 мг Se/кг.

Привлекательность дрожжей, богатых Se и доступных на рынке с 1974 года, обусловлена их относительно низкой стоимостью и высоким содержанием селенметионина (SeMet), являющегося прекурсором при синтезе селенопротеинов. Дрожжи, богатые Se - это природный продукт, для которого уже на протяжении длительного времени существуют сложности при изучении с точки зрения состава соединений Se. Ряд вопросов, включая изменчивость регистрируемых значений концентрации SeMet; высокую изменчивость состава с точки зрения разновидностей Se; и несоответствие между общим количеством выявленных соединений Se и общей концентрацией Se, до сих пор остаются без ответа.

Недостаточная изученность заставила Европейский Союз исключить дрожжи с Se из списка разрешенных пищевых добавок согласно директиве 2002/46/EC.

Таким образом, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования характеристик метаболома и протеома дрожжей, богатых селеном. Соответственно, как описано в настоящем документе, в настоящей заявке предложено выявление и исследование характеристик Se-содержащих метаболитов и белков, принадлежность и характеристики которых (например, биологическая активность) до сих пор неизвестны.

#### Определение и изотопный состав общего Se

Доступные для приобретения образцы дрожжей обычно содержали 1000 м.д. или 2000 м.д. Se, причем максимальное значение превышало 3000 м.д. Дрожжи, богатые Se, считаются неотличимыми по внешнему виду, вкусу и запаху от нормальных высушенных пищевых дрожжей (см., например, Schrauzer, Pure Appl. Chem., 78 (2006), р. 105), однако морфологические особенности разных препаратов могли различаться. Образцы низкокачественных дрожжей, богатых Se, обладали красноватым или коричневатым цветом в результате образования  $Se^0$  и селенидов.

Определение общего количества Se в дрожжах, богатых Se, могло быть простым. Например, дрожжи гидролизовали со смесью  $HNO_3$  и  $H_2O_2$  на плите или с помощью СВЧ-нагрева. Содержание Se можно впоследствии определить с помощью гидридгенерирующей (HG) атомной абсорбционной спектрометрии (AAC) или атомной флуоресцентной спектрометрии (AFS). Однако при этом важна полнота гидролиза (отсутствие растворенного углерода), в противном случае наблюдали низкие и/или несогласующиеся результаты. В некоторых вариантах реализации для изучения характеристик селенсодержащих соединений (например, более устойчивых к растворенному углероду) использовали масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Однако при ИСП-МС используемый(е) изотоп(ы) являются

оптимизированными (например, потому, что наиболее распространенный изотоп  $^{80}Se$  не подходит для работы со старыми квадрупольными приборами и не может использоваться при квадрупольном исследовании). В предпочтительном варианте реализации использовали приборы, оснащенные реакционной ячейкой, использующей  $H_2$  в качестве газа для соударений для стимуляции образования интерференции «M+1»

для  $^{77}Se$  и  $^{78}Se$ . В дополнительном предпочтительном варианте реализации в качестве газа для соударений использовали Не. Для контроля/обеспечения качества можно использовать CRM SELM-1.

Дрожжи, богатые Se, часто применяют в качестве активного компонента готовых смесей (3-5 м.д. в пересчете на Se) и кормовых добавок (0,3-0, м.д. в пересчете на Se). Однако сильная неоднородность образцов готовых смесей, являющаяся обычным явлением на рынке, затрудняет или делает невозможным полный гидролиз образцов или воспроизводимость между сериями пакетной обработки. Например, отсутствие Se в твердом остатке после выщелачивания на горячей плите со смесью  $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$  представляет собой распространенное явление. Таким образом, в некоторых вариантах реализации применяли анализ ИСП-МС (например, при невозможности или невоспроизводимости полного гидролиза образцов готовых смесей). Кроме того, точное определение изотопного состава Se посредством HG-ИСП-многоколлекторной МС (HG-МК-ИСП-МС) выявило значительные различия в соотношении изотопов ( $\delta^{82/77}\text{Se}$ ,  $\delta^{82/76}\text{Se}$  и  $\delta^{82/74}\text{Se}$ ) в дрожжах, богатых Se, от разных производителей (см., например, Far et al., J Anal At Spectrom, 25 (2010) 1695). Знание и понимание происхождения изменений в соотношении изотопов (другой источник Se или другое изотопное фракционирование в ходе биохимического включения в различных биотехнологических процессах) остается недостижимым.

#### Определение SeMet

Независимо от точного описания, общую концентрацию SeMet обычно называют признаком «органической» природы дрожжей, богатых Se. SeMet является составной частью белков, большинство из которых нерастворимы в воде. Поэтому содержание SeM определяли по его высвобождению из белков. Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены способы описания характеристик SeMet, приводящие к полному распаду дрожжевых белков на аминокислоты. В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены способы исследования характеристик SeMet, препятствующие разложению SeMet (которое, например, приводит к потере или окислению Se).

В данной области техники многие результаты относились к SeMet, присутствующему в водном экстракте, что в значительной степени обусловило путаницу с уровнем SeMet в дрожжах, богатых Se. Путаница также усугублялась тем, что условия стандартного кислотного гидролиза, используемого при анализе аминокислот (гидролиз в 6 н.  $\text{HCl}$  при 120С в закрытых ампулах), являлись слишком жесткими для контролируемого сохранения SeMet. Для выделения SeMet можно использовать две процедуры: одна из них основана на 16-ч гидролизе с метансульфоновой кислотой при использовании обратного холодильника, а другая основана на множественном протеолитическом гидролизе с использованием протеазы (см., например, Mester et al, Anal Bioanal Chem, 385 (2006) р 168). Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки показано, что по отношению к определению содержания SeMet время удержания и присутствие Se являются необходимыми параметрами для подтверждения выявления и чистоты Se-Met, присутствующего в образце. В некоторых вариантах реализации для исследования характеристик разновидностей селена в образце применяли обращенно-фазовую (ОФ) или анионообменную (АО) хроматографию ВЭЖХ-ИСП-МС.

#### Гидролитическое разложение образца

Эксперименты, проведенные во время разработки вариантов реализации настоящей заявки, показали, что доступные для приобретения дрожжевые продукты, присутствующие на рынке, отличались по морфологии и текстуре и могли привести к намного меньшему выходу SeMet, чем ожидалось (например, на основании анализа эталонного материала). Кроме того, эксперименты, проведенные во время разработки

вариантов реализации настоящей заявки, показали наличие изменчивости партий протеазы (что, например, обуславливало плохую воспроизводимость выхода экстракции). Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены поэтапные действия и способы, минимизирующие риск низкого выхода.

- 5      Например, в некоторых вариантах реализации использовали только свежеприготовленную и высокоактивную протеазу. В дополнительных вариантах реализации осуществляли многократную (например, трехкратную) экстракцию, причем каждый раз использовали свежую порцию фермента. В предпочтительном варианте реализации окончательный продукт экстракции/экстракт содержал менее 1% Se. В 10 дополнительных вариантах реализации получали полную солюбилизацию образца путем ферментативного разложения. В некоторых вариантах реализации при невозможности полной солюбилизации образца за счет ферментативного разложения применяли последовательную экстракцию с использованием смеси целлюлаз и гемицеллюлаз и хаотропных агентов, и проверяли отсутствие SeMet в каждом из 15 экстрактов. Настоящая заявка не ограничена способом проверки отсутствия SeMet в экстрактах (см., например, Encinar et al., Anal Chem Acta, 500 (2003), 171). Для дополнения результатов анализа можно использовать способы и данные баланса масс при экстракции. Пример солюбилизации образца согласно одному из аспектов настоящей заявки показан на фигуре 1.

- 20     Эксперименты, проведенные во время разработки вариантов реализации настоящей заявки, позволили выявить и исследовать негидролизованные остатки протеолиза ряда доступных для приобретения дрожжей и дополнительно показали наличие остаточного SeMet после дополнительной обработки смесью целлюлаза-пектиназы. Для некоторых образцов остаточный SeMet составлял до 10% всего Se, хотя типичные значения 25 составляли ~3-5%. Обработка остатков додецилсульфонатом натрия (ДСН) с последующим протеолитическим гидролизом, позволила дополнительно повысить выход SeMet, как правило, до 2-8%, а в одном образце - до 15%. Наличие остатка (например,  $Se^0$ , экстрагируемого с помощью  $CS_2$ ), является свидетельством низкого качества дрожжей.

#### 30     Анализ ВЭЖХ-ИСП-МС

- Эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, позволили выявить и исследовать селенсодержащие соединения в растворах, полученных после ферментативного разложения (например, содержащих как SeMet, так и окисленный SeMet, различные формы SeCys, различные метаболиты Se и не 35 полностью гидролизованные белки). Установлено, что присутствие не полностью гидролизованных белков приводило к получению заниженной общей концентрации SeMet. Обнаружено, что не полностью гидролизованные белки присутствовали в тонкодисперсной густой суспензии (например, из-за этого оставаясь на фильтре колонки) или в растворе. Соответственно, в некоторых вариантах реализации использовали этап 40 проверки, включавшей анализа гидролизата с помощью эксклюзионной ЖХ-ИСП-МС (например, с целью проверки отсутствия высокомолекулярных соединений и полноты элюирования Se (см., например, врезку на фигуре 2).

- Количественную оценку SeMet можно выполнить с помощью АО-ВЭЖХ-ИСП-МС (см. фигура 2) или ОФ-ВЭЖХ-ИСП-МС, с использованием способа стандартных добавлений. Выбор неподвижной фазы для хроматографии имеет важное значение (например, с целью минимизации потерь вследствие сорбции Se-содержащих веществ на колонке). В то же время выявление, количественная оценка и анализ селенсодержащих соединений (например, селенопротеинов, сelenоаминоокислот, селенопептидов и т.д.)

может сопровождаться балансом масс, исключая или учитывая их элюирование до и после пика, используемого для количественной оценки. Это сделало выявление и количественную оценку селенсодержащих соединений (например, SeMet) сложной задачей. Количественную оценку с использованием изотопного разбавления нельзя

5 рассматривать как полноценное средство исследования образца (например, потому что неполный гидролиз и сохранение не полностью гидролизованных SeMet-содержащих соединений было основной причиной неточных результатов), поскольку маловероятно, чтобы добавленная доза вела себя так же, как SeMet в образце.

Другой распространенный источник ошибок обусловлен возникновением окисленного

10 SeMet. Часть SeMet проявляется в виде отдельного пика SeMetOx, что ведет к занижению концентрации SeMet. Окисление SeMet во время процедуры можно предотвратить или даже обратить вспять путем добавления окислительно-восстановительного реагента (например, дитиотрейтоля), однако изначально присутствующий оксид SeMet нельзя преобразовать в SeMet.

15 Эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, показали, что замена ИСП-МС тройной квадрупольной МС, применяемая в (одиночном или множественном) режиме мониторинга реакции может являться альтернативой, повышающей селективность и надежность параллельной количественной оценки других форм SeMet (например, окисленного SeMet).

20 Определение SeMet в готовых смесях и кормах

Определение SeMet в готовых смесях, кормах для животных и таблетках добавок является более сложным, чем в дрожжах, богатых Se. Высвобождение SeMet сдерживается наличием некоторых добавок, которые могут выступать в качестве ингибиторов протеаз. Рекомендуется проводить этап экстракции для удаления этих 25 добавок до ферментативной экстракции SeMet. В некоторых вариантах реализации концентрация SeMet в корме для животных является слишком низкой для определения непосредственно в экстракте и требует предварительного концентрирования.

Лиофильная сушка ферментативного гидролизата приводит к совместному 30 предварительному концентрированию остаточного фермента, и, следовательно, матрикса, нарушая последующую ОФ-ВЭЖХ или АО-ВЭЖХ. Таким образом, в настоящей заявке предложено выделение низкомолекулярной фракции Se посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) до лиофильной сушки и ВЭЖХ-ИСП-МС.

Анализ водорастворимых Se-содержащих соединений и метаболитов

35 Эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, показали, что дрожжи, богатые Se, можно характеризовать по метаболическому профилю Se (селенометаболому), который является характеристикой штамма дрожжей и параметров ферментации. Селенометаболом можно использовать в качестве «отпечатков пальцев» происхождения препаратов, доступных на рынке, и воспроизводимости процесса производства. Как описано в настоящем документе,

40 эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, позволили обнаружить, что селенометаболом содержит одно или более из Se-содержащих соединений (например, проявляющих терапевтическую активность и/или антитерапевтические свойства (например, токсичность)). Типичная процедура получения и выявления как водорастворимой, так и нерастворимой в воде фракции Se-содержащих 45 соединений, присутствующих в селенизированных дрожжах согласно одному варианту реализации настоящей заявки показана на фигуре 3.

Установлено, что экстракция водой позволяет выделить 15-25% Se. Типичная хроматограмма (100% выделение), полученная посредством SEC-ИСП-МС, показана

на фигуре 4А. Водный экстракт содержал ~5% водорастворимых белков с высокой молекулярной массой, элюирующихся в пустое пространство колонки SuperdexPeptide, или с низкой молекулярной массой (5-15 кДа), включая многократно селенизированный (1-7) SIP18, моноселенизированный HSP12 или белок YMZ. Эти белки содержали Se 5 исключительно в составе SeMet.

Соответственно, в настоящей заявке также предусмотрено, что остальные водорастворимые соединения Se, наблюдаемые в виде низкомолекулярных (<1500 Да) соединений/метаболитов, составляют селенометаболом дрожжей. До экспериментов, проведенных в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, выявление и 10 исследование характеристик этих метаболитов были весьма сложной задачей (например, эти метаболиты остались вообще неизвестными после первого официального обнаружения Se-аденозил-Se-гомоцистеина «de novo» в работах Casiot et al. с использованием тройной квадрупольной МС с электрораспылением (см., например, Casiot et al, Anal Commun, 36 (1999), p 77)). Например, исследована сложность состава 15 водного экстракта с точки зрения принадлежности Se, которая проиллюстрирована на фигуре 4В. Показаны более 25 различных пиков, причем каждый пик потенциально скрывал любое количество других менее интенсивных пиков (причем, например, каждый пик представлял собой одно или более из различных Se-содержащих соединений).

Эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящей 20 заявки, использовали определенные достижения способов многомерной очистки и МС, что, в свою очередь, позволило значительно расширить знания о селенометаболоме дрожжей (см. фигура 4). В частности, наличие орбитальной ионной ловушки с FT обеспечило больший динамический диапазон внутреннего сканирования, а возможность точного определения массы и многоэтапной фрагментации использовали для облегчения 25 выявления и исследования характеристик селенометаболома (например, выявления каждого селенсодержащего соединения (например, метаболита, пептида, белка, нуклеиновой кислоты и/или предшественников каждого из них), а также исследования биологических свойств отдельных соединений, а также их комбинаций (например, как описано в настоящем документе).

Получены и исследованы дрожжи, обогащенные селеном (дрожжи, богатые Se, 30 *Saccharomyces cerevisiae*). Использовали реагенты класса чистоты для ЖХ-МС, полученные из Sigma-Aldrich (Сен-Кантен-Фаллавье, Франция). Воду очищали с помощью системы Milli-Q (MILLIPORE, Гвианкур, Франция). В одной типичной процедуре общая концентрация селена в дрожжах, богатых Se, составляла 2399 мкг/г 35 (+/-40). 0,2-г образец экстрагировали 5 мл воды в ультразвуковой ванне в течение 1 ч. Экстракт центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант лиофилизировали и при необходимости хранили при -20°C. Концентрация общего селена в водном экстракте была равна 756 мкг, что составляло приблизительно 30 процентов от общего селена. Параллельные дополнительные экстракции дрожжей, 40 обогащенных селеном, также позволили получить водный экстракт с концентрациями в диапазоне между приблизительно 170-750 мкг (что соответствует приблизительно 5-30% от общего селена).

Затем водный экстракт подвергали эксклюзионной хроматографии-ИСП-МС. 45 Эксклюзионную хроматографию-ИСП-МС осуществляли на системе ВЭЖХ AGILENT 1200 (AGILENT, Токио, Япония), подключенной к ИСП-масс-спектрометру с камерой распыления и реакционной ячейкой Scott. Жидкостную хроматографию осуществляли с использованием СЭЖХ-насоса Ultimate 3000 (DIONEX, Париж, Франция). Выход с колонки подключали к масс-спектрометру LTQ30 Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Scientific,

Бремен, Германия) с ESI-источником ионов и к ИСП-МС AGILENT 7700, камерой распыления и реакционной ячейкой Scott.

На фигуре 5 показаны хроматограммы пяти отдельных водных экстрактов, полученные посредством эксклюзионной хроматографии-ИСП-МС (76Se - темно-серая линия, 77Se - черная линия, 78Se - светло-серая линия). Хроматограммы экстракта дрожжей, богатых Se (фигура 5, нижний график) демонстрируют типичную картину, полученную с использованием SELPLEX (ALLTECH, Inc., Лексингтон, штат Кентукки, США). Кроме того, появлялся относительно интенсивный пик на поздней стадии элюирования (приблизительно 66 мин), отсутствовавший в предыдущих исследованиях.

Профили оставшихся образцов (фиг. 1, верхний график) значительно отличаются от профиля Sel-Plex и аналогичны друг другу. На них представлен основной очень часто встречающийся широкий пик, по-видимому, содержащий ряд соединений, элюирующих в начале хроматографии. В результате этого наблюдения для дальнейшего исследования отбрали несколько образцов (фигура 5, второй график сверху и нижний график) с помощью колонки для эксклюзионной хроматографии с более подходящим диапазоном разделения (пептидная колонка SUPERDEX) (фигура 6, А и В, соответственно). Широкий пик, присутствовавший на предыдущей хроматограмме (фигура 5, второй график сверху) разделился на два пика, каждый из которых содержал 2-3 плача, что указывало на наличие большого количества селенсодержащих соединений с молекулярной массой в диапазоне 5-1,5 кДа. Кроме того, обнаружено, что образец, показанный на нижнем графике фигуры 5, также содержал поздно элюирующийся пик приблизительно на 25 мин.

#### Выявление и исследование характеристик селенсодержащих соединений водорастворимых фракций

Серия экспериментов, описанных выше, позволила выявить наличие большой фракции селенсодержащих соединений (приблизительно 1,5-5 кДа) в обработанных образцах, отсутствовавшей в исходных дрожжах. Поэтому в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования этой фракции.

Исследуемая фракция (произвольно названная «пиком I») представляла собой среднюю фракцию эксклюзионной хроматограммы (SEC) (см. фигуру 7а); ее подвергали предварительному концентрированию с помощью лиофилизации. Как показано на фигуре 7В, это позволило отделить интактную исследуемую фракцию от других Se-содержащих соединений, присутствующих в необработанных дрожжах. На фигуре 7 показана SEC-пептидная хроматограмма образцов: а) водного экстракта, б) отдельного пика I, с) пика I после расщепления трипсином, д) водного экстракта после расщепления протеазами; черная линия - 80Se, светло-серая линия - 78Se, темно-серая линия - 77Se.

Несколько попыток дальнейшего фракционирования исследуемой фракции с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ провалились. Выделение с использованием протестированных колонок для ОФ-ВЭЖХ было очень низким, а разделение - плохим. Поэтому была сделана попытка протеолитического ферментативного гидролиза (трипсин и протеаза XIV) этой фракции с целью дальнейшего исследования характеристик данной фракции и выявления компонентов, содержащихся в ней. Как показано на фигуре 7С, трипсин (расщепление по остаткам лизина и аргинина) снижал среднюю молекулярную массу Se-содержащих соединений в смеси. Таким образом, как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предусмотрено, что одну или более из водорастворимых фракций дрожжей, богатых Se, подвергали протеолитическому гидролизу (например, с использованием трипсина,

протеазы XIV или другого фермента) перед выделением и/или исследованием характеристик селенсодержащих соединений посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ-ИСП-МС или Orbitrap MC.

Например, как показано на фигуре 7D, протеазный гидролиз пептидов позволял

5 получить в основном селенметионин (фигура 7D, высокая черная линия, приблизительно 27 минут). Кроме того, существовали другие селенсодержащие соединения, элюировавшиеся до приблизительно 25 минут.

Таким образом, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены дополнительные эксперименты с целью выделения, очистки и исследования

10 характеристик пика, элюировавшегося на 58 мин с SEC-колонки, показанного на фигуре 7A. Для выявления соединений, присутствующих на эксклюзионной хроматограмме при времени элюирования 58 мин (см. фигуру 7A) указанный пик выделили и концентрировали. Оптимизировали процесс элюирования для обращенно-фазовой хроматографии. ОФ-хроматограмма пика, элюировавшегося на 58 мин с SEC-колонки,

15 показанная на фигуре 7A (а также на фигуре 8A), демонстрирует только один острый и хорошо разделенный пик (см. фигуру 8B). Затем с целью выявления селенсодержащего соединения выполнили дополнительный анализ, включающий масс-спектроскопию. Обращенно-фазовую хроматографию соединили с Orbitrap. Установлено, что селенсодержащее соединение с массой 346,04025 являлось Se-метил-Se-аденозином (см. фигуру 9).

В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью дальнейшего выделения и исследования характеристик селенсодержащих соединений водорастворимых фракций, выделенных из дрожжей, обогащенных селеном.

Использовали водный экстракт дрожжей, богатых Se, описанный выше (содержащий

25 756 мкг, что составляет приблизительно 30 процентов от общего селена), который содержал приблизительно 70% водорастворимых селенсодержащих соединений.

Экстракт концентрировали и вводили в колонку для эксклюзионной хроматографии (SEC) и собирали 10 подфракций (начиная с первого широкого пика, показанного на фигуре 2A) через равные интервалы времени. В свою очередь, эти фракции представляли

30 собой соединения, отсутствующие в необработанном водном экстракте дрожжей. Каждую фракцию делили на два отдельных образца, один образец использовали для наглядной демонстрации фракции, а другой образец обрабатывали посредством трипсинового гидролиза.

Образцы вначале анализировали посредством ИСП-МС (см. фигуру 10) с

35 использованием колонки RP C18. Разрешающая способность была достаточной для анализа СЭЖХ-Orbitrap MC.

Образцы проанализировали; список 170 соединений, полученных для подфракции 8 со структурами селена приведены ниже в таблице 1. Кроме того, в таблице 5 приведены типичные спектры этих соединений. Масса всех пептидов, выявленных в

40 негидролизованной фракции, находилась в диапазоне от 1 до 3,4 кДа. Размер выявленных селенсодержащих соединений был намного меньше, чем у исходных белков, из которых они были получены. На фигуре 11 показан список селенсодержащих пептидов, выявленных в подфракции 8 образца. Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено одно или более из селенсодержащих

45 соединений (например, выявленных в таблице 2, на фигуре 11, на фигуре 13 и фигуре 15, описанных ниже), композиций, содержащих указанные соединения, и способов их применения (например, для медицинского и/или ветеринарного применения, как описано в настоящем документе).

Nº Macca	
5	1 504,22677
	2 517,59942
	3 519,20538
	4 528,90197
	5 531,75903
10	6 532,67706
	7 539,25262
	8 539,33910
	9 540,67584
15	10 541,24383
	11 541,26294
	12 541,74151
	13 542,24139
20	14 542,24725
	15 552,71209
	16 553,25964
	17 562,28595
25	18 563,78735
	19 566,25152
	20 566,91772
	21 567,24585
30	22 567,76349
	23 568,64807
	24 571,90582

35

40

45

	25 573,77539
	26 581,73694
5	27 589,32348
	28 601,79260
	29 601,95440
	30 604,25134
10	31 604,41015
	32 608,38354
	33 614,28143
	34 614,78192
15	35 619,25683
	36 622,77655
	37 623,27374
	38 627,17450
20	39 628,17425
	40 631,36401
	41 632,69647
	42 638,27905
25	43 640,34161
	44 648,30755
	45 648,58545
	46 650,31329
30	47 651,35296
	48 677,32788
	49 683,32922
35	50 684,33172
	51 695,28955
	52 698,28625
	53 702,70654
40	54 702,98858

	55 704,29077
	56 707,36828
5	57 709,31628
	58 710,30029
	59 712,28479
	60 714,33471
10	61 714,83740
	62 718,80896
	63 720,81946
	64 721,67334
15	65 722,00866
	66 724,69372
	67 724,83240
	68 726,81750
20	69 727,31964
	70 728,32373
	71 729,84302
	72 734,82367
25	73 741,04901
	74 741,05059
	75 741,38433
	76 741,85113
30	77 745,81677
	78 747,29687
	79 748,37677
35	80 750,67205
	81 751,87048
	82 752,39074
	83 764,31012
40	84 775,89483

	85 776,39734
	86 780,83679
	87 781,35034
5	88 785,24920
	89 789,43182
	90 792,33807
10	91 794,72375
	92 796,31152
	93 803,32995
	94 803,80926
15	95 804,80969
	96 814,71167
	97 814,79699
	98 815,04895
20	99 815,80066
	100 821,72363
	101 821,87463
	102 822,37549
25	103 828,33893
	104 833,06408
	105 833,06604
	106 833,39843
30	107 833,40020
	108 833,72723
	109 833,72827
	110 835,41009
35	111 839,04785
	112 839,38415
	113 839,82940
40	114 844,36627

	115 844,40557
	116 849,87439
	117 850,19653
5	118 854,69995
	119 855,03100
	120 861,87719
10	121 862,36950
	122 863,74206
	123 863,74316
	124 863,87079
15	125 864,07483
	126 871,40753
	127 872,73132
	128 878,90771
20	129 881,38879
	130 881,88763
	131 886,74395
	132 891,72467
25	133 895,74530
	134 896,07586
	135 908,87964
	136 909,37103
30	137 924,37268
	138 925,08465
	139 925,41833
	140 929,44366
35	141 929,74249
	142 931,39825
	143 932,34991
40	144 955,42822

	145 960,50860
	146 966,89325
5	147 975,96557
	148 990,36322
	149 990,41070
	150 998,92859
10	151 1003,74280
	152 1016,45190
	153 1021,41125
	154 1022,39312
15	155 1037,80859
	156 1038,13623
	157 1043,39104
	158 1057,86181
20	159 1076,48632
	160 1102,13940
	161 1123,56475
	162 1133,01947
25	163 1134,47436
	164 1217,36182
	165 1221,56891
	166 1249,09771
30	167 1249,59564
	168 1427,01928
	169 1486,43866
35	170 1489,46460

Таблица 2. Список масс селенсодержащих соединений, обнаруженных в подфракции 8.

Кроме того, выполнены эксперименты с целью дальнейшего исследования характеристик подфракций. В частности, ферментативный (например, трипсиновый) гидролиз подфракций проводили с последующим анализом с использованием обращенно-фазовой хроматографии и масс-спектроскопии (например, ВЭЖХ-ИСП-МС). (Фигура 12) Анализ СЭЖХ-Orbitrap MC/MC выявил наличие ряда селенсодержащих пептидов. Определили принадлежность селенсодержащих пептидов, а также белка, из которого был получен каждый селенсодержащий пептид; эти сведения показаны на фигуре 13.

Дальнейший анализ селенсодержащих соединений и/или метаболитов в водорастворимых фракциях дрожжей, богатых селеном

Мишениями дальнейшего выявления и исследования характеристик являлись водорастворимые органические соединения селена со средней молекулярной массой (приблизительно 300-100 Да). Уникальные селенометаболомы теоретически

представляют собой «отпечатки пальцев» дрожжей из различных источников (например, предоставляющие информацию о составе коммерческих продуктов).

Экстракция водой с последующим фракционированием. 0,2 г дрожжей (SEL-PLEX, дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, ALLTECH, Inc., Лексингтон, штат Кентукки, США) экстрагировали 5 мл воды с использованием ультразвуковой ванны в течение одного часа. Экстракт центрифугировали (2700 g, 10 мин), декантировали, лиофилизировали и хранили в морозильной камере. Затем порошок растворяли в 0,15 мл 10 mM аммоний-ацетатного буфера (pH 7,5) и центрифугировали (14000 g, 15 мин). Супернатант фракционировали на пептидной колонке SUPERDEX (эксклюзионная хроматография, SEC); элюирование выполняли 100 mM ацетатом аммония (pH 7,5) при скорости 0,7 мл мин-1. Элюат собирали между 20 и 30 мин, замораживали и лиофилизировали. Лиофилизат растворяли в 0,15 мл воды и хранили при -20°C до дальнейших анализов.

#### Анализ ВЭЖХ-ИСП-МС

Лиофилизированные образцы после SEC, предварительно растворенные в воде, разбавляли в 20 раз в буфере А, и вводили 10-мкл аликвоту в катионообменную PRP-X200 SCX колонку (150 мм × 2,1 мм × 10 мкм; Hamilton, Рено, штат Невада, США). Градиентное элюирование осуществляли формиатом аммония (буфер А: 1 mM аммония и 10 mM муравьиной кислоты в 20% метаноле (pH 3), буфер В: 100 mM аммония и 110 mM муравьиной кислоты в 20% метаноле (pH 6), при скорости 0,5 мл мин-1. Элюат разделяли после выхода с колонки таким образом, что его часть (30%) подавали на ESI-МС, а остальную часть (70%) отправляли в отходы. Использовали следующую программу: 0-8 мин до 3% В, 8-15 3% В, 15-20 до 10% В, 20-25 до 100% В, 25-38 100% В, 38-40 до 100% А, 40-52 100% А 4.1.3.

Идентификация с помощью ВЭЖХ-ESI МС/МС. On-line анализ очищенных Se-содержащих фракций посредством катионообменной ВЭЖХ-ESI МС осуществляли с использованием колонки PRP-X200 SCX. Градиент элюирования был таким же, как для анализа ИСП-МС. Для анализа использовали 5 мкл образца без предварительного разбавления. Источник ионов работал в режиме положительных ионов. Оптимальные параметры представляли собой: напряжение источника ионов 2,60 кВ; температура капилляра 280°C; температура нагревателя источника 120°C; скорость потока защитного газа 20; скорость потока вспомогательного газа 5; уровень RF S-линзы 61%; разрешающая способность 100000. Масс-спектры получили в диапазоне 100-1000 m/z и обработали с помощью программного обеспечения Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific).

Масс-калибровку прибора выполняли с использованием смеси кофеина, n-бутиламина, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA), Ultramark 1621 и додецилсульфоната натрия (ДСН), растворенной в 50% ацетонитриле и 0,1% растворе муравьиной кислоты.

Условия хроматографии оптимизировали с учетом совместимости с обеими используемыми детекторными системами ИСП-МС и ESI МС. Профиль катионообменной ВЭЖХ-ИСП-МС селенсодержащих соединений выявил наличие большого количества пиков (см. фигуру 14А). Кроме того, выполнили эксперименты с целью получения хроматограммы обращенно-фазовой ИСП-МС разделенных фракций (см. фигуру 14В).

Затем эту же колонку объединяли с Orbitrap и выявляли и исследовали селенсодержащие соединения/метаболиты (см. фигуру 14).

С целью фракционирования и выявления соединений селена, присутствующих в дрожжах, обогащенных селеном, использовали дополнительные этапы пробоподготовки. Например, перед ИСП-МС проводили эксклюзионную

хроматографию (например, с использованием колонки SUPERDEX), причем каждую фракцию собирали с помощью эксклюзионной ИСП-МС (см., например, можно собрать и проанализировать фракции, включающие каждый пик, показанный на фигуре 7А или 8А). Анализ фракций осуществляли согласно процедурам, описанным в настоящем

5 документе (например, с использованием бимодальной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии/жидкостной хроматографии с взаимодействием гидрофильных ионов - масс-спектрометрии с гибридной квадрупольной ловушкой с электрораспылением/орбитальной ловушкой и т.д.). Дополнительные селенсодержащие соединения, выявленные в дрожжах, обогащенных селеном (SELPLEX), с помощью

10 вышеперечисленных способов включали: 2,3-DHP-селенцистеинцистеин, N-ацетилселенцистеинселенгомоцистеин, метилтиоселенглутатион, 2,3-DHP-селенцистеинселенцистеин, 2,3-DHP-селенцистеинцистеинилглицин, 2,3-DHP-селенцистеинселенгомоцистеин, 2,3-DHP-селенгомоцистеинцистеинилглицин, селенметилселенглутатион, селенглутатионцистеин,

15 2,3-DHP-селенцистеин-γ-глутамоилцистеин, ди-2,3-DHP-селенцистеин, N-ацетилцистеинселенглутатион, селенглутатионселенцистеин, 2,3-DHP-селенцистеин-2,3-DHP-селенгомоцистеин, глутатион-N-ацетилселенгомоцистеин, глутатионселенцистеинилглицин, γ-глутамоилцистеин-γ-глутамоилцистеин, γ-глутамоилцистеин-2,3-DHP-селенцистеин, глутатион-2,3-DHP-селенцистеин, глутатион-

20 2,3-DHP-селенгомоцистеин, ди-γ-глутамоилселенцистеин, селенглутатион-γ-глутамоилцистеин, селенглутатион-2,3-DHP-селенцистеин, селенглутатион-2,3-DHP-селенгомоцистеин, селенглутатионтио-2,3-DHP-селенцистеин, селенглутатион-γ-глутамоилселенцистеин, селенглутатионглутатион, селенглутатион, диселенглутатион, тиодиселенглутатион, метилдегидрогомоцистеин, селенметионин, селеномолантионин,

25 N-ацетилселенцистациионин, дегидрокси-5'-метилселенаденозин, N-ацетилцистеинселенгомоцистеин, 2,3-DHP-селенлантионин, этилселенлантоин, N-пропионилселенцистациионин, 2,3-DHP-селенцистациионин, метилселенглутатион, γ-глутамоилселенцистациионин, селенглутатион, селен-(гидроксил)-сelenофен-(3'-дезоксиаденозина), N-ацетилцистеинселенгомоцистеин, аллилселенаденозилгомоцистеин,

30 селенаденозилгомоцистеин, селенгидроксиаденозилгомоцистеин, селенаденозин, селенаденозил-Se(метил)-селеноксид, аденоzилгидроксиселеноксид, этилселенаденозин, селен-(гидрокси)-сelenофен-(3'-дезоксиаденозина), адноzилгидроксиселеноксид и селенаденозил-Se(метил)-селеноксид. Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено одно или более из селенсодержащих

35 соединений (например, селеноэфиров, конъюгатов SeCys, содержащих ди- и трипептиды, селенолов или селеноксидов (например, представленных в вышеприведенном списке) или их производных), композиций, содержащих указанные соединения, и способов их применения (например, для медицинского и/или ветеринарного применения, как описано в настоящем документе).

40 Выявление и исследование характеристик нерастворимых в воде соединений и метаболитов

Установлено, что 80-90% селена в полученных фракциях SEL-PLEX присутствовало в виде селенсодержащих соединений (например, белков, пептидов, нуклеиновых кислот и т.д.), нерастворимых в воде. Соответственно, в ходе разработки вариантов реализации 45 настоящей заявки выполнены эксперименты с целью разработки способа экстракции этих соединений (например, экстракции максимального количества указанных соединений (например, в интактном виде или в виде полученных из них компонентов) с целью выявления, исследования характеристик и/или количественной оценки

соединений). Кроме того, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью создания процесса очистки, позволяющего выполнить ионизацию (например, эффективную ионизацию) соединений (например, белков, пептидов, молекул и т.д.) электрораспылением и/или анализ с помощью Orbitrap.

- 5 Соответственно, как описано ниже, разработали способ, обеспечивающий экстракцию более чем 50% нативных соединений. Исследовали твердофазную экстракцию с фракционированием. Однако плохая чистота выделенных соединений сделала анализ с помощью Orbitrap-МС неинформативным. Выявлены другие процессы, позволившие получить полезную информацию. Выполнены попытки фракционирования при 10 эксклюзионной ЖХ с дополнительными этапами ВЭЖХ-очистки или без них, которые позволили получить информативные результаты.

#### Экстракция соединений селена

- Большинство соединений/разновидностей селена (от приблизительно 70 до 95% от общего Se в зависимости от образца), присутствующих в образцах, были нерастворимы 15 в воде, и для переноса их в раствор перед масс-спектрометрическим анализом требовались пользовательские процедуры. Протестировали и сравнили двенадцать отдельных способов и получили значения выхода экстракции (соотношение общего селена в экстракте к общему Se в образце). Максимальный уровень выделения, равный приблизительно 55%, получен для процедуры, основанной на экстракции белков 4% 20 ДСН в сочетании с модификацией иодацетамидом. Оптимизацию выполнили для образца SELPLEX, в котором водорастворимые соединения составляли приблизительно 15% от общего Se (результаты приведены в таблице 3 ниже).

Условие	Выход экстракции, %
4% ДСН, 0,1 М трис-НСl, pH 7,5; дериватизация	55
4% ДСН, 0,1 М трис-НСl, pH 7,5	40,2
5% глицерин; 2% ДСН; 0,06 М трис, pH 8,8	18,9
7 М мочевина, 0,1 М трис, pH 7,5	14,3
5 М мочевина, 0,1 М трис, pH 7,5	11,4
7 М мочевина; 3,3% СНАР	10,9
5 М мочевина, 0,1 М трис, pH 7,5	10,6
0,1 М трис, pH 7,5	3,33
0,09 М трис, pH 7,5	2,63
5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 M трис, pH 7,5	1,76
30% этанол, 0,1 M трис-НСl, pH 7,5	1,16
у-рех	0,61
*Вода	16,32

- Экстрагированные белки осаждали ацетоном и гидролизовали трипсином. Перед масс-спектрометрическим анализом требовалась очистка гидролизованных экстрактов. В частности, оптимизировали очистку трипсиновых гидролизатов. Протестированные 40 процедуры включали твердофазную экстракцию в кислых и щелочных условиях (см. таблицу 4 ниже) и препаративную эксклюзионную хроматографию.

Кислотный режим	Щелочной режим
H <sub>2</sub> O pH 2,5	H <sub>2</sub> O pH 10,5
H <sub>2</sub> O 3% ACN pH 2,5	H <sub>2</sub> O 3% ACN pH 10,5
H <sub>2</sub> O 10% ACN pH 2,5	H <sub>2</sub> O 10% ACN pH 10,5
H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 2,5	H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 10,5
H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 10,5	H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 2,5
H <sub>2</sub> O 50% ACN pH 10,5	H <sub>2</sub> O 50% ACN pH 2,5
H <sub>2</sub> O 8% ACN pH 10,5	H <sub>2</sub> O 80% ACN pH 2,5

Таблица 4. Условия элюирования, использованные для очистки трипсинового гидролизата соединений из селенизированных дрожжей посредством твердофазной экстракции (SPE).

Сводная информация о полученных результатах приведена в таблице 5 ниже, где показано процентное содержание Se, элюированного в отдельных фракциях.

Условие	Процентное содержание Se во фракции
Вода в кислом образце	15%
H <sub>2</sub> O, pH 2,5	11%
H <sub>2</sub> O 3% ACN pH 2,5	11%
H <sub>2</sub> O 10% ACN pH 2,5	16%
H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 2,5	18%
H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 10,5	18%
H <sub>2</sub> O 50% ACN pH 10,5	8%
H <sub>2</sub> O 80% ACN pH 10,5	3%
Вода в щелочном образце	5%
H <sub>2</sub> O, pH 10,5	10%
H <sub>2</sub> O 3% ACN pH 10,5	9%
H <sub>2</sub> O 10% ACN pH 10,5	21%
H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 10,5	43%
H <sub>2</sub> O 20% ACN pH 2,5	9%
H <sub>2</sub> O 50% ACN pH 2,5	3%
H <sub>2</sub> O 80% ACN pH 2,5	0%

Распределение соединений/разновидностей селена по молекулярной массе в отдельных фракциях определяли с помощью SEC-ИСП-МС (см. фигуру 15), полноту элюирования подтверждали путем сравнения суммы профилей с профилем, полученным для необработанного гидролизата (см. фигуру 16). К сожалению, чистота SPE-очищенной фракции оказалось недостаточной для анализа посредством МС с электрораспылением. Наконец, выбрали препаративную эксклюзионную хроматографию (см. фигуру 17), которая была более продолжительной, но позволяла получить полезный материал.

Фигура 18 представляет собой профили отдельных фракций SEC. Данная процедура позволяла удалить низкомолекулярную фракцию Se, элюируемую после селенметионина (например, которая не имела значения для последующего анализа).

Отдельные фракции SEC анализировали посредством СЭЖХ-Orbitrap MC/MC;

выявлено несколько селенизированных пептидов. Для подтверждения принадлежности можно использовать ионообменную ВЭЖХ с фракционированием.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложены способы (например, включающие такие этапы, как экстракция белков 4% ДСН в

5 сочетании с модификацией иодацетамидом, осаждение ацетоном и ферментативный гидролиз (например, трипсином), очистку с использованием твердофазной экстракции в кислых и щелочных условиях, препартивную эксклюзионную хроматографию и анализ с ВЭЖХ-фракционированием и СЭЖХ-Orbitrap MC/MC) для выявления и исследования характеристик нерастворимых в воде селенсодержащих соединений и

10 метаболитов.

Анализ нерастворимых в воде селенсодержащих соединений посредством 1D гель-электрофореза

Обнаружено, что ДСН-экстракция, оптимизированная и описанная выше, являлась высокоэффективным способом получения фракций SELPLEX. Создали способ разделения

15 (1D гель-электрофорез), совместимый с высокой концентрацией поверхностно-активного вещества. Лазерное аблационное сканирование позволило определить части геля с высоким содержанием селенопротеина, которые затем вырезали и подвергали ферментативному (например, трипсиновому) гидролизу. Трипсиновые гидролизаты анализировали комбинированной СЭЖХ-ИСП-МС и СЭЖХ-ES MC/MC. Данный 20 процесс обеспечивал выявление большинства соединений, полученных из глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы 3. Эксперименты, выполненные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, выявили, что белок глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы 3 (35 кДа), обнаруженный в SELPLEX, разлагался во время пакетной обработки на смесь 10-15-кДа белков/пептидов, на которые приходилось 25 свыше 80% присутствующих нерастворимых белков. Данные, полученные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки и представленные в настоящем документе, представляют собой результаты первого выявления и исследования характеристик фракций нерастворимых в воде селенсодержащих соединений.

#### Водная экстракция

30 0,1 г образца взвешивали и дважды промывали 5 мл 30 мМ трис-HCl, pH 7,5 в течение 1 ч в ультразвуковой ванне. Супернатант отделяли центрифугированием и замораживали до анализа. Остаток собирали для дальнейшего анализа.

#### Экстракция нерастворимых в воде белков

35 Остаток после водной экстракции промывали 5 мл 4% раствора ДСН в 0,1 М трис-HCl буфере. Образцы дважды обрабатывали ультразвуком в течение 2 минут с использованием ультразвукового зонда и впоследствии после добавления 50 мкл 0,2 М ДТТ в течение 1 ч в ультразвуковой ванне. Образцы центрифугировали, супернатант собирали для анализа.

#### Гель-электрофорез

40 ДСН-экстракты каждого образца анализировали на предмет содержания белка, выполняя четыре параллельных анализа до и после электрофореза (образцы внедряли в гель в 4 различных концентрациях). Гели получали в двух экземплярах с целью последующего переноса на мембрану для блоттинга.

#### Гидролиз результатов блоттинга до ВЭЖХ-анализа

45 На основании анализа LA ИСП-МС образцы геля (образцы L09-4531 и 0087-16) выбрали для анализа с помощью ВЭЖХ-ИСП-МС и ВЭЖХ-МС/МС. Результаты блоттинга разрезали по видимым полосам, как отмечено/описано на фигуре 6 и фигуре 7 (описанных выше). Фрагменты мембран для блоттинга помещали в отдельные

пробирки, экстрагировали буфером тритон X-100/CAN/трикс, модифицировали IAM и DTT и гидролизовали трипсином.

**ИСП-МС-анализ образцов blottinga**

Для анализа были выбраны две линии blottinga: одна на основе материала,

5 полученного из дрожжей, и одна - на основе образца, подготовленного для гидролиза при pH 3. Их анализировали с использованием колонки Phenomenex C18 и программы градиентного элюирования и растворов воды/метанола/муравьиной кислоты в качестве элюентов (см. фигуру 19). Из 7 полос, вырезанных из образца L09-4531, две типичные хроматограммы показаны на фигуре 19 и использованы для анализа с помощью Orbitrap.

10 **МС/МС-анализ образцов blottinga**

Получили полные масс-спектры. Поиск и выявление селенсодержащих соединений выполняли следующим образом: Программное обеспечение MetWorks использовали для поиска соединений с одинарным, двойным и тройным зарядом и структурами селена; список соединений проверяли вручную в целях устранения ложноположительных 15 результатов; после выявления и проверки списка соединений выполняли второй Orbitrap-анализ с целью получения МС2-спектров для выбранных масс. МС-спектры 5 селенсодержащих соединений, выявленных согласно описанным способам (для которых выполняли секвенирование), представлены на фигуре 20. Blotting образца, полученного из дрожжей, разделили на 10 частей. Все 10 частей анализировали с помощью ИСП- 20 МС. Из образца 6, соответствующего полосе с массой 35 кДа, получили интересную хроматограмму. Эта хроматограмма была очень похожа на хроматограмму, полученную из предыдущего blottinga, позволившую выявить пептиды, происходящие от глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы 3. Таким образом, в настоящей заявке показано, что получение нерастворимого в воде экстракта при pH 3 приводит к гидролизу 25 глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы 3.

Секвенирование результатов МС2-анализа выполняли. Данные секвенирования получили и исследовали посредством сравнения и перекрестного сопоставления с протеомными онлайн-базами данных (UNIPROT, BLAST и т.д.). На фигуре 21 представлен список селенсодержащих пептидов, выявленных с помощью описанных 30 способов. Сделан вывод, что каждый выявленный селенсодержащий пептид происходил от глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложено одно или более из селенсодержащих соединений (например, выявленных на фигурах 20 и 21), композиций, содержащих указанные соединения, и способов их применения (например, для медицинского и/или 35 ветеринарного применения, как описано в настоящем документе).

**ПРИМЕР 2**

Селенсодержащие композиции ингибируют гипертрофию и старение клеток сердечной мышцы

Материалы и способы

40 Животные и обработка.

Самцы мышей PolG<sup>(D257A)</sup>, экспрессирующие гомозиготную мутацию в домене митохондриальной ДНК-полимеразы-гамма, кодирующем экзонуклеазу, в генетическом окружении C57/BL6, были предоставлены д-ром Tomas A. Prolla (Висконсинский университет, Мэдисон, штат Висконсин, США). Мышей содержали поодиночке и 45 поддерживали в совместном виварии для взрослых грызунов в мемориальном медицинском центре Управления социального обеспечения бывших военнослужащих им. Уильяма С. Миддлтона (Мэдисон, штат Висконсин, США). В помещении поддерживали постоянную температуру и влажность. Комнатное освещение

контролировали, обеспечивая 12-ч цикл светлого и темного периодов. Мышей неограниченно обеспечивали водой и кормили экспериментальными кормами, хранившимися в темноте при 4°C. Свежий корм добавляли в кормушку дважды в неделю.

- 5 Сразу же после отъема мышей случайным образом распределяли в одну из трех экспериментальных групп. Одна группа мышей получала базальный корм с концентрацией селена <0,01 мг/кг (SD), а вторая группа получала корм, идентичный корму SD, но содержащий 1,0 мг/кг селена, добавляемого в форме дрожжей обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена ((SP),  
 10 SELPLEX, ALLTECH, Inc. Лексингтон, штат Кентукки, США). Окончательная концентрация селена в корме SP составляла одну (1) миллионную долю. Концентрацию селена в кормовых готовых смесях оценивали посредством атомно-абсорбционной спектроскопии (см., например, Connolly, Power, Hynes, 2004); в экспериментальных кормах - с помощью Covance Inc. (Мэдисон, штат Висконсин, США). Базальный SD-  
 15 корм содержал 15 г/100 г общего жира, а также 538,6 г/кг сахарозы, 300 г/кг дрожжей Torula, 140 г/кг кукурузного масла, 3,0 г/кг DL-метионина, 15,4 г/кг минеральной смеси (содержащей, в г/кг, карбонат кальция, 2,02; хлорид натрия, 2,6; цитрат калия (моногидрат), 7,7; сульфат калия, 1,82; оксид магния, 0,84; цитрат железа (III), 0,21; карбонат марганца, 0,12; карбонат цинка, 0,056; сульфат калия-хрома, 0,019; карбонат меди (II), 0,011; иодат калия, 0,0004) и 3,0 г/кг смеси витаминов (содержащей, в мг/кг, битартрат холина, 2800; ниацин, 30; пантотенат кальция, 16; пиридоксин-HCl, 7; тиамин-HCl, 6; рибофлавин, 6; фолиевую кислоту, 2; биотин, 0,2; витамин B-12 (0,1% в манните, 25; ацетат dl- $\alpha$ -токоферола (500 мкг), 100; пальмитат витамина A (500000 ед/г), 8, холекальциферол (500000 ед/г), 0,4; филлохинон, 3).
- 20 Из каждой экспериментальной группы шесть мышей умерщвляли через 60 дней и шесть - через 400 дней (называя их POLG-молодыми и POLG-старыми мышами, соответственно). Мышей обеих групп умерщвляли путем смещения шейных позвонков и собирали их ткани. Эксперименты выполняли по меньшей мере в двух повторностях.
- 25 Получение тканей.

30 Для исследования экспрессии генов в различных тканях собирали образцы сердца, печени и икроножной мышцы, быстро замораживали их в жидким азоте и хранили при -80°C. Для исследования экспрессии в головном мозге отделяли кору больших полушарий от окружающих тканей головного мозга, быстро замораживали ее в жидким азоте и хранили при -80°C.

35 Выделение РНК.

Образцы замороженных тканей гомогенизировали с помощью аппарата для разрушения тканей QIAGEN Tissue Ruptor (QIAGEN, Валенсия, штат Калифорния, США) и выделяли общую РНК с помощью набора RNEASY Mini kit (QIAGEN) согласно протоколам, рекомендуемым компанией. Целостность и чистоту выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, штат Делавэр, США) и дополнительно подтверждали с помощью биоанализатора AGILENT 2100 Bioanalyzer System (AGILENT Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния, США). Очищенную РНК преобразовывали в двуцепочечную кДНК с помощью набора реагентов для одностадийной амплификации кДНК GENECHIP Expression 3'-Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit (AFFYMETRIX, Санта-Клара, штат Калифорния, США) с праймером T7-(dT)<sub>24</sub> и промотором РНК-полимеразы T7. Двуцепочечную кДНК преобразовывали в кРНК, меченую биотином, с помощью набора для мечения мицелии AFFYMETRIX GENECHIP Expression 3'-Amplification One-

Cycle Target Labeling Kit (AFFYMETRIX) согласно процедурам, рекомендованным производителем. кРНК, меченую биотином, очищали с помощью модуля очистки образцов GENECHIP и фрагментировали нагреванием (35 мин при 94°C).

Микрочип и биоинформатика для анализа метаболических путей

- 5 Меченую кРНК гибридизовали с геномом мыши на чипах MG-430\_2.0 GENECHIP (AFFYMETRIX) в течение 16 ч при 45°C с последующей промывкой, окрашиванием стрептавидин-фикаэритрином (SAPE) и, наконец, сканированием на сканере GENECHIP Scanner 3000 7G (AFFYMETRIX). GENESPRING GX 12.5 (AGILENT) использовали для валидации и нормировки данных микрочипа и выполнения статистического анализа и
- 10 анализа картины экспрессии генов. Вкратце, нормировку выполняли, вначале масштабируя интенсивность набора зондов на чипах по средней интенсивности мишени, равной 500, а затем преобразуя исходный уровень в медианное значение для всех образцов данного исследования. Поправку на шум выполняли с помощью MAS5 на основании конструкции зондов микрочипа Perfect Match (PM, «полное совпадение») и
- 15 Mis-Match (MM, «несовпадение»). Для минимизации возможности получения неправильных результатов наборы зондов с низкой интенсивностью сигнала и наборы зондов, помеченные алгоритмом AFFYMETRIX MAS5 при обработке всех образцов как «Отсутствующий», исключили из дальнейшего анализа. Дифференциально экспрессируемые гены отфильтровали с помощью графиков типа «вулкан», где гены
- 20 с  $P<0,05$  и соответствующим кратным изменением интенсивности сигнала ( $FC>1,2$  или  $FC<-1,2$  считали значительно различающимися.

Для анализа биологических объектов, представленных измененными профилями транскрипции, применяли два независимых подхода к анализу метаболических путей. Во-первых, выполняли параметрический анализ представленности генов (PAGE),

- 25 методику расчетов, которая позволяет определить значительные изменения в определенном наборе генов (см., например, Kim & Volsky, 2005) с целью выявления сильно измененных биологических процессов и сигнальных путей за счет питания. Анализировали только компоненты генной онтологии (GO), содержащие по меньшей мере 10 и не более 1000 генов и характеризовавшиеся 3 или более низким уровнем. Для
- 30 дальнейшего выявления функциональных кластеров, характеризующих изменения транскрипции, связанные с содержанием Se в рационе, значительно измененные гены дополнительно сгруппировали в сети, функции и канонические пути с помощью программного обеспечения Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Редвуд-Сити, штат Калифорния, США). Точный критерий Фишера использовали для
- 35 определения значимости ассоциации между генами и заданной сетью, биологической функцией или каноническим путем.

ПЦР-анализ в реальном времени:

- ПЦР-анализ в реальном времени выполняли с использованием готовых праймеров и зондов TAQMAN производства Applied-Bioscience (INVITROGEN) согласно процедурам, рекомендованным производителем. Данные нормировали по уровню Actb в каждом образце и представляли как среднее  $\pm$  SEM для количества образцов.

Определение общего белка:

- Навески ткани сердца взвешивали на электронных весах, а затем гомогенизировали в соответствии с описанием (см., например, Lan et al., Biol Reprod, 1998. 58(1): p. 197-206).
- 45 Уровень белка в гомогенатах определяли с помощью набора для анализа белка при 660 нм Pierce (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Рокфорд, штат Иллинойс, США) согласно протоколу производителя. Уровень общего белка в каждом примере нормировали по массе ткани.

### Вестерн-блоттинг:

Для вестерн-блоттинга равное количество белка сердца мышей PolG, обработанных SD или SP, разделяли электрофорезом в ДСН-ПААГ, а затем переносили на ПВДФ-мембранны, как описано ранее (см., например, Lan et al., Biol Reprod, 1998. 58(1): p. 197-206; Adhikari et al, Hum Mol Genet, 2010. 19(3): p. 397-410); Reddy et al., Science, 2008. 319 (5863): p. 611-3). Затем мембранны для блоттинга блокировали в физиологическом растворе с фосфатным буфером, содержащем 5% (масс/об) бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури, США) с последующим инкубированием со специфическими антителами против Myh7 (Santa Cruz), Ankrd1 (Santa Cruz), GSK3 $\beta$  (Cell Signaling), Foxo3a (Cell Signaling), кальциневрина (Abcam), фосфорилированного NFATc2, фосфорилированного NFATc3 (Santa Cruz), Actb или бета-тубулина (Li-COR). Положительные сигналы на мембранных для блоттинга обнаруживали с помощью реагентов для обнаружения результатов вестерн-блоттинга с использованием усиленной хемилюминесценции производства Amersham (GE healthcare) или вторичных антител, меченых флуоресцентной меткой (LI-COR). Изображения этих сигналов регистрировали с помощью системы LI-COR Odyssey Fc Image. Плотность белковых полос определяли с использованием программного обеспечения Li-COR Image studio или NIH ImageJ, а затем нормировали по уровню Actb или бета-тубулина в каждом образце. Данные представлены в виде среднее  $\pm$  SEM для количества образцов, указанного в условных обозначениях к фигуре. Эксперименты выполняли по меньшей мере в двух повторностях.

### Статистический анализ.

Для ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга рассчитывали t-критерий Стьюдента с целью определения статистических различий между двумя группами, в то время как для определения различий между несколькими группами выполняли 25 односторонний дисперсионный анализ с последующим расчетом t-критерия Стьюдента. Значение Р менее 0,05 считали значимым.

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, ингибирует экспрессию Myh7 и Ankrd1 в сердечной мышце старых мышей PolG

ДНК-полимераза с (POLG), кодируемая ядерными генами, является единственной известной ДНК-полимеразой в митохондриях клеток животных. Мутации в гене POLG человека связаны с многочисленными заболеваниями, ассоциированными с целым рядом симптомов, включая офтальмоплегию, катаракту, прогрессирующую мышечную слабость, паркинсонизм, преждевременную недостаточность яичников, мужское бесплодие, потерю слуха (пресбиакузис) и кардиологическую дисфункцию (см., например, 30 Kujoth et al., PLoS Genetics, 2007. 3(2)). Модель мыши PolG<sup>(D257A)</sup> демонстрирует прогрессирующее снижение дыхательной функции комплексов, кодируемых митохондриальными генами, в возрасте 12 недель, что приводит к пониженному потреблению кислорода и снижению продукции АТФ (см., например, Kujoth et al., PLoS Genetics, 2007. 3(2)). Сообщалось, что мыши PolG демонстрируют фенотипы с 35 ускоренным старением сердца, выраженной гипертрофией сердца, на которую указывает увеличенный размер сердца и кардиомиоцитов в возрасте 13-14 месяцев (см., например, Dai et al 2010, Kujoth et al., 2005 и фигуру 22А).

Гипертрофическая кардиомиопатия (HCM) является наиболее распространенной моногенно наследуемой формой сердечных заболеваний и наиболее распространенной 45 причиной внезапной сердечной смерти у людей моложе 35 лет (см., например, Frey et al., Nat Rev Cardiol, 2012. 9(2): p. 91-100). Генетические мутации, лежащие в основе HCM, хорошо изучены, причем большинство из этих мутаций кодируют саркомерные белки, например, миозин-7 (также известный как тяжелая цепь  $\beta$ -миозина сердечной мышцы;

MYH7) (мм., например, Frey et al., Nat Rev Cardiol, 2012. 9(2): p. 91-100).

Сердечный белок с анкириновым повтором (CARP) кодируется геном ANKRD1, и экспрессия гена ANKRD1 и ядерный фактор CARP вовлечены в гипертрофию левого желудочка, сердечную недостаточность у человека, дилатационную кардиомиопатию (DCM) и адиамицин-индуцированную кардиомиопатию (см., например, Duboscq-Bidot et al., Archives of Cardiovascular Diseases, 2009. 102, Supplement 1(0): p. S73). В соответствии с описанными фенотипами, возрастная экспрессия маркеров гипертрофии сердца Myh7 и Ankrd1 была повышена в ткани сердца старых мышей POLG по сравнению с молодыми мышами POLG (см. фигуру 22В).

Во время разработки вариантов реализации настоящей заявки были проведены эксперименты с целью определить, может ли введение селена изменить экспрессию веществ, ассоциированных с гипертрофией. Обнаружено, что экспрессия маркеров гипертрофии - тяжелой бета-цепи миозина (Myh7) и сердечного белка с анкириновым повтором (Ankrd1) ингибировалась у старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, богатых селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами PolG, получавшими контрольный корм SD. С целью подтвердить данное наблюдение выполнили количественную ПЦР в реальном времени (QRT-ПЦР), и экспрессия Myh7 (фигура 23А, верхний график) и Ankrd1 (фигура 23В, верхний график) значительно ингибировалась у старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, богатых селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами PolG, получавшими контрольный корм SD. Выполнили вестерн-блоттинг с использованием специфических антител против Myh7 и Ankrd1, и уровень белков Myh7 и Ankrd1 в сердце старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, богатых селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, был значительно ниже, чем у мышей PolG, получавших контрольный корм SD (см. фигуру 23А-В, нижние графики). Таким образом, в настоящей заявке показано, что дрожжи, обогащенные селеном (например, дрожжи, обогащенных селеном и содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них) при введении субъекту ингибируют накопление белков гипертрофии Myh7 и Ankrd1 (например, тем самым подавляя и/или предотвращая старение и гипертрофию сердечной мышцы).

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, модифицирует сигнальные пути, индуцирующие гипертрофию сердца, за счет регуляции фосфорилирования и уровня белков NFAT, Gsk3 $\beta$  и S6K у старых мышей PolG

Сигнальный путь кальциневрин-NFAT активируется при патологической гипертрофии сердца и сердечной недостаточности (см., например, Molkentin, Cardiovascular Research, 2004. 63(3): p. 467-475). Кальциневрин первоначально считали сигнальным фактором гипертрофии на основании его экспрессии в сердце трансгенных мышей. Мыши, экспрессирующие активированную мутантную форму кальциневрина, демонстрировали выраженную гипертрофическую реакцию (увеличение размера сердца в 2-3 раза), которая быстро прогрессировала в сердечную недостаточность с дилатацией сердца в течение 2-3 месяцев (см., например, Molkentin, Cardiovascular Research, 2004. 63(3): p. 467-475). Основной механизм действия Сп заключается в стимуляции дефосфорилирования ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) в цитозоле, что приводит к повышению уровня нефосфорилированного NFAT в ядре. В ядре Т-клеток члены семейства NFAT участвуют в индукции транскрипции различных генов иммунного ответа (см. фигуру 24А). Существуют четыре фактора транскрипции NFAT, регулируемых кальциневрином - NFATc1-c4, каждый из которых активируется только кальциневрином

и экспрессируется в миокарде (см., например, Molkentin, *Cardiovascular Research*, 2004. 63(3): р. 467-475). Таким образом, выполнили дополнительные эксперименты с целью определить, может ли селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, снижать экспрессию Сn и тем самым изменить 5 сигнальный путь Сn/NFAT (например, с целью предотвращения или снижения гипертрофии сердца).

Вестерн-блоттинг выполнили с целью сравнения уровней белка кальциневрина-А (Cn-A), а также статуса фосфорилирования четырех субъединиц NFAT (NFATC1, C2, C3 и C4) в сердце старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных 10 селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, и старых мышей PolG, получавших контрольный корм SD. Как показано на фигуре 24В, уровни Cn-A у старых мышей PolG не изменились; вместе с тем, уровни фосфорилированного NFATc2 (pNFATc2) в сердце старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, были повышены по 15 сравнению с старыми мышами POLG, получавшими контрольный корм SD (фигуры 24В и 24С). Повышенные уровни фосфорилированного NFATc3 также обнаружены у субъектов, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, в то время как фосфорилированных NFATc1 и C4 не обнаружили.

20 Действие кальциневрина и кругооборот NFAT в ядре антагонистичны по отношению к GSK3β, поскольку он непосредственно фосфорилирует N-концевой регуляторный домен NFATc1 (см., например, Crabtree et al., 2002). Повышенная экспрессия GSK3β снижала гипертрофический рост кардиомиоцитов, и у трансгенных мышей с 25 конститутивной или индуцибельной экспрессией GSK3β в сердце снижалась гипертрофия сердца в ответ на активированный кальциневрин (см., например, Molkentin, *Cardiovascular Research*, 2004 63(3): р. 467-475). В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью выявления возможного влияния введения селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее 30 неорганического селена, на уровень GSK3β в сердце. Как показано на фигурах 24В и 24С, обнаружено, что в сердце старых мышей POLG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, была значительно повышена экспрессия GSK3β по сравнению со старыми мышами POLG, получавшими контрольный корм SD.

35 Недавние исследования показали, что ингибирование мишени рапамицина (mTor) у млекопитающих и потеря S6K может продлить продолжительность жизни мышей, даже несмотря на то, что последнее явление наблюдается только у самцов мышей (см., например, Selman et al., *Science*, 2009. 326(5949): р. 140-4); Harrison et al., *Nature*, 2009. 460 (7253): р. 392-5). Сообщалось, что S6K ингибировал активность GSK3β в других клетках (см., например, Cohen and Frame, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(10): р. 769-76). Поэтому 40 выполнили эксперименты с целью проверить изменение уровня фосфорилированного белка S6K (pS6K1), mTor и его следующей мишени в пути синтеза белка (p4E-BP) и PI3K-компонентов сигнального пути - pPDK1 и pAkt у старых мышей POLG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее 45 неорганического селена, по сравнению со старыми мышами POLG, получавшими контрольный корм SD. Обнаружено, что уровни pS6K1, но не mTOR и не других фосфорилированных компонентов PDK1/Akt/4E-BP, были значительно понижены у старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами

POLG, получавшими контрольный корм SD (фигуры 24А и 24В).

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, усиливает экспрессию Foxo3, но не Foxo1 или Foxo4

Недавние исследования показали, что гены семейства факторов транскрипции с

5 доменом forkhead-бокс (Foxo) Foxo1, Foxo3 и Foxo4 имеют важное значение для гипертрофии сердца и/или выживании в условиях окислительного стресса (см., например, Ni et al, Circulation, 2006. 114(11): p. 1159-68; Sengupta et al, J Biol Chem, 2011. 286(9): p. 7468-78).

Соответственно, выполнили эксперименты с целью выявления возможного влияния

10 введения селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, на факторы транскрипции семейства Foxo. Использование ПЦР в реальном времени позволило установить отсутствие возрастной стимуляции или ингибирования экспрессии каждого гена Foxo, проанализированного в ткани сердца мышей POLG. Кроме того, несмотря на отсутствие значительного влияния на экспрессию

15 Foxo1 или Foxo4, у старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, имело место значительное повышение экспрессии Foxo3 (на уровне как мРНК, так и белка) по сравнению со старыми мышами POLG, получавшими контрольный корм SD (см. фигуру 25).

Гипертрофию сердца продемонстрировали у мышей с нуль-мутацией Foxo3, но не у 20 мышей с нуль-мутацией Foxo4 (см., например, Ni et al, Circulation, 2006. 114(11): p. 1159-68). Таким образом, в настоящей заявке показано, что повышение экспрессии Foxo3 стимулировало транскрипционную активность в сердце.

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, регулирует сигнальный путь Atm/Gadd45g в сердце старых мышей PolG

25 Сигнальный путь Atm/Gadd45 является критическим для остановки клеточного цикла и репарации ДНК [13, 14]. В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования экспрессии Atm и Gadd45 в сердце старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами

30 POLG, получавшими контрольный корм SD. С помощью QRT-ПЦР обнаружили, что существует возрастное снижение экспрессии Atm в сердце мыши PolG (см. фигуру 26А). Интересно, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, устранило возрастное снижение экспрессии гена Attn в сердце старых мышей PolG (см. фигуру 26А). Кроме того, экспрессия Gadd45,

35 следующей мишени пути Atm/Trp53 (p53 - общеизвестный фактор суппрессии опухолей, играющий ключевую роль при остановке клеточного цикла и репарации ДНК), значительно стимулировалась в сердце старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами POLG, получавшими контрольный корм SD (см. фигуру 26В).

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, регулирует митохондриальный Ucp2 в кардиомиоцитах

40 Разобщение белков в митохондриях (МТ) имеет решающее значение для термогенеза и поддержания потенциалов или целостности МТ (см., например, Sena et al., Mol Cell, 2012. 48(2): p. 158-67; Krauss et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(3): p. 248-61). В документах описано, что потеря Ucp2 приводит к снижению продолжительности жизни и повышенной продукции активных форм кислорода (АФК) в МТ (см., например, Andrews et al. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. 296(4): p. E621-7; Andrews et al., Curr Aging Sci,

2010. 3(2): р. 102-12). В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования экспрессии Ucp1, 2 и Ucp3 у старых мышей POLG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержавших 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами POLG,

5 получавшими контрольный корм SD. С помощью QRT-ПЦР обнаружено, что уровень Ucp2 был значительно повышен у старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержавших 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами POLG, получавшими контрольный корм SD (см. фигуру 27).

10 Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, ингибирует экспрессию липокалина 2 (Lcn2), маркера сердечной недостаточности, имеющего важное значение для сократительной способности сердечной мышцы

Lcn2 является биомаркером сердечной недостаточности и имеет важное значение для сокращения сердечной мышцы (см., например, Yang et al., Am J Transl Res. 4(1): р.

15 60-71; Xu et al., J Biol Chem. 287(7): р. 4808-17)). При старении человека сердце теряет эластичность за счет увеличения кардиомиоцитов и снижения сократимости мышечных клеток, что является основными причинами сердечной недостаточности. В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования экспрессии Lcn2 в ткани сердца старых мышей PolG, получавших селен

20 в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержавших 2% или менее неорганического селена, по сравнению со старыми мышами POLG, получавшими контрольный корм SD. С помощью QRT-ПЦР обнаружено значительное и резкое увеличение экспрессии Lcn2 у старых мышей PolG, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержавших 2% или менее неорганического селена (см. фигуру 28). Это наблюдение

25 согласуется с другими результатами, описанными в настоящем документе по отношению к повышенному уровню pNFAT2/3 (например, инактивацией активности NFAT при транскрипции генов) (см. фигуру 24), поскольку Lcn2 является мишенью NFAT (см., например, Gaudineau et al., J Cell Sci, 2012. 125(Pt 19): р. 4475-86).

### ПРИМЕР 3

30 Селенсодержащие композиции облегчают саркопению

Материалы и способы

Животные и обработка

Самцов мышей C57BL/6J содержали поодиночке и поддерживали в совместном виварии для взрослых грызунов в мемориальном медицинском центре Управления социального обеспечения бывших военнослужащих им. Уильяма С. Миддлтона (Мэдисон, штат Висконсин, США). В помещении поддерживали постоянную температуру и влажность. Комнатное освещение контролировали, обеспечивая 12-ч цикл светлого и темного периодов. Мышей обеспечивали водой и экспериментальными кормами без ограничений. Экспериментальные корма (производства Harlan Teklad, 40 Мэдисон, штат Висконсин, США) хранили в темноте при 4°C. Свежий корм добавляли в кормушку дважды в неделю.

Одна группа мышей получала базальный корм с концентрацией селена <0,01 мг/кг (SD); вторая группа получала корм, идентичный корму SD, но содержащий 1,0 мг/кг селена, добавляемого в виде селенита натрия (SS); третья группа получала корм, 45 идентичный корму SD, но содержащий 1,0 мг/кг селена, добавляемого в виде селенметионина (SM); а четвертая группа получала корм, идентичный корму SD, но содержащий 1,0 мг/кг селена, добавляемого в виде дрожжей обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена ((SP), SELPLEX, ALLTECH, Inc.

Лексингтон, штат Кентукки, США). Окончательная концентрация селена в каждом из кормов SS, SM и SP составляла одну (1) миллионную долю. Концентрацию селена в кормовых готовых смесях оценивали посредством атомно-абсорбционной спектроскопии (Connolly, Power, Hynes, 2004); в экспериментальных кормах - с помощью Covance Inc.

- 5 (Мэдисон, штат Висконсин, США). Базальный SD-корм содержал 15 г/100 г общего жира, а также 538,6 г/кг сахарозы, 300 г/кг дрожжей Torula, 140 г/кг кукурузного масла, 3,0 г/кг DL-метионина, 15,4 г/кг минеральной смеси (содержащей, в г/кг, карбонат кальция, 2,02; хлорид натрия, 2,6; цитрат калия (моногидрат), 7,7; сульфат калия, 1,82; оксид магния, 0,84; цитрат железа (III), 0,21; карбонат марганца, 0,12; карбонат цинка, 10 0,056; сульфат калия-хрома, 0,019; карбонат меди (II), 0,011; иодат калия, 0,0004) и 3,0 г/кг смеси витаминов (содержащей, в мг/кг, битартрат холина, 2800; ниацин, 30; пантотенат кальция, 16; пиридоксин-HCl, 7; тиамин-HCl, 6; рибофлавин, 6; фолиевую кислоту, 2; биотин, 0,2; витамин B-12 (0,1% в манните, 25; ацетат dl- $\alpha$ -токоферола (500 мкг), 100; пальмитат витамина А (500000 ед/г), 8, холекальциферол (500000 ед/г), 0,4; 15 филлохинон, 3).

После получения вышеописанных кормов (SD, SM, SS или SP) в течение трех месяцев мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, а затем собирали ткани.

#### Получение тканей:

- Для исследования экспрессии генов в различных тканях собирали образцы сердца, 20 печени и икроножной мышцы, быстро замораживали их в жидком азоте и хранили при -80°C. Для исследования экспрессии в головном мозге отделяли кору больших полушарий от окружающих тканей головного мозга, быстро замораживали ее в жидком азоте и хранили при -80°C.

#### Выделение РНК

- 25 Образцы замороженных тканей гомогенизировали с помощью аппарата для разрушения тканей QIAGEN Tissue Ruptor (QIAGEN, Валенсия, штат Калифорния, США) и выделяли общую РНК с помощью набора RNEASY Mini kit (QIAGEN) согласно протоколам, рекомендуемым компанией. Целостность и чистоту выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NANODROP ND-1000 (Thermo Scientific, 30 Уилмингтон, штат Делавэр, США) и дополнительно подтверждали с помощью биоанализатора AGILENT 2100 Bioanalyzer System (AGILENT Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния, США).

- Очищенную РНК преобразовывали в двуцепочечную кДНК с помощью набора реагентов для одностадийной амплификации кДНК GeneChip Expression 3'-Amplification 35 Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit (AFFYMETRIX, Санта-Клара, штат Калифорния, США) с праймером T7-(dT)<sub>24</sub> и промотором РНК-полимеразы T7. Двуцепочечную кДНК преобразовывали в кРНК, меченую биотином, с помощью набора для мечения мишени AFFYMETRIX GeneChip Expression 3'-Amplification One-Cycle Target Labeling Kit (AFFYMETRIX) согласно процедурам, рекомендованным производителем. кРНК, 40 меченую биотином, очищали с помощью модуля очистки образцов GeneChip и фрагментировали нагреванием (35 мин при 94°C).

#### Микрочип и анализ метаболического пути

- Меченую кРНК гибридизовали с геномом мыши на чипах MG-430\_2.0 GeneChip (AFFYMETRIX) в течение 16 ч при 45°C с последующей промывкой, окрашиванием 45 стрептавидин-фикаэритрином (SAPE) и, наконец, сканированием на сканере GeneChip Scanner 3000 7G (AFFYMETRIX).

GeneSpring GX 12.5 (Agilent) использовали для валидации и нормировки данных микрочипа и выполнения статистического анализа и анализа картины экспрессии генов.

Вкратце, нормировку выполняли, вначале масштабируя интенсивность набора зондов на чипах по средней интенсивности мишени, равной 500, а затем преобразуя исходный уровень в медианное значение для всех образцов данного исследования. Поправку на шум выполняли с помощью MAS5 на основании конструкции зондов микрочипа Perfect Match (PM, «полное совпадение») и Mis-Match (MM, «несовпадение»). Для минимизации возможности получения неправильных результатов наборы зондов с низкой интенсивностью сигнала и наборы зондов, помеченные алгоритмом AFFYMETRIX MAS5 при обработке всех образцов как «Отсутствующий», исключили из дальнейшего анализа. Дифференциальную экспрессию генов отфильтровали с помощью графиков типа «вулкан», где гены с  $P < 0,05$  считали значительно различающимися.

Для анализа биологических задач, представленных измененными профилями транскрипции, применяли два независимых подхода к анализу метаболических путей. Во-первых, выполняли параметрический анализ представленности генов (PAGE), методику расчетов, которая позволяет определить значительные изменения в определенном наборе генов (см., например, Kim & Volsky, 2005) с целью выявления сильно измененных биологических процессов и сигнальных путей за счет питания. Анализировали только компоненты генной онтологии (GO), содержащие по меньшей мере 10 и не более 1000 генов и характеризовавшиеся 3 или более низким уровнем. Для дальнейшего выявления функциональных кластеров, характеризующих изменения транскрипции, связанные с содержанием Se в рационе, значительные гены дополнительно сгруппировали в сети, функции и канонические пути с помощью программного обеспечения Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Редвуд-Сити, штат Калифорния, США). Точный критерий Фишера использовали для определения значимости ассоциации между генами и заданной сетью, биологической функцией или каноническим путем.

Определение общего белка.

Навески ткани икроножной мышцы взвешивали на электронных весах, а затем гомогенизировали в соответствии с описанием (см., например, Lan et al., 1998). Уровень белка в гомогенатах определяли с помощью набора для анализа белка при 660 нм Pierce (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Рокфорд, штат Иллинойс, США) согласно протоколу производителя. Уровень общего белка в каждом примере нормировали по массе ткани. Данные представлены в виде среднее $\pm$ SEM для количества образцов. Эксперименты выполняли в двух повторностях.

Статистический анализ

Т-критерий Стьюдента рассчитывали с целью определения статистических различий между двумя группами, в то время как для определения различий между несколькими группами выполняли односторонний дисперсионный анализ с последующим расчетом t-критерия Стьюдента. Значение Р менее 0,05 считали значимым.

Субъекты, обработанные селеном в виде дрожжей, обогащенных селеном,

демонстрируют повышенный уровень белка в скелетных мышцах

С целью исследования возможности влияния введения селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, на состав и/или массу скелетных мышц выполнили мониторинг общего белка скелетных мышц у мышей, получавших корм с добавлением селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, (SP) по сравнению с мышами, получавшими

корн без добавления селена (SD), в течение трех месяцев. Как показано на фигуре 29, уровень общего белка в мышцах значительно повышался у мышей, получавших SP-корм, по сравнению с мышами, получавшими SD-корм. Эти данные показывают, что селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, повышал уровень общего белка в

скелетных мышцах.

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, активирует созревание и/или образование сателлитных клеток мышц и регенерацию скелетных мышц

Отсутствие активации сателлитных (стволовых) клеток мышц с получением зрелых

мышечных клеток в ответ на сигналы, обусловленные питанием, является одной из причин саркопении (см., например, Ryall et al., 2008). В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнили эксперименты с целью исследования активации сателлитных (стволовых) клеток мышц в скелетных мышцах субъектов, обработанных селеном, по сравнению с контрольными субъектами, путем измерения экспрессии генов маркеров активированных сателлитных клеток, миогенного фактора 6 (Myf6) и десмина (Des). Обнаружено, что экспрессия этих генов маркеров активированных сателлитных клеток подвергалась значительной стимуляции в скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), и селенита натрия (SS), по сравнению с контрольными мышами (см. фигуру 34). Таким образом, в настоящей заявке показано, что селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них) стимулирует созревание сателлитных клеток мышц (например, с получением зрелых мышечных клеток), тем самым ослабляя саркопению.

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, изменяет сигнальные пути, контролирующие синтез белка в скелетных мышцах

Сигнальные пути mTOR/S6K и MAPK/S6K

Сигнальные пути с участием mTOR влияют на несколько основных клеточных функций и могут положительно и отрицательно влиять на поведение клеток, например, на их рост (накопление массы) и пролиферацию (см., например, Laplante, Cell. 2012, 149(2):274-93). Синтез белка является одним из наиболее изученных процессов, контролируемых mTOR. Активация S6K за счет mTOR является важным этапом синтеза белка посредством сигнального пути mTOR (см., например, Laplante, Cell. 2012, 149(2): 274-93). Помимо активации S6K за счет пути mTOR, синтез белка также можно стимулировать путем активации S6K за счет MAPK/ERK2-опосредованного пути (см., например, Kenessey and Ojamaa, J Biol Chem, 2006, 281(30) 20666-20672). Киназа 2 митоген-активируемой протеинкиназы (MAP2K2) - фермент, активирующий путь MAPK1/ERK2; в организме человека его кодирует ген MAP2K2 (см., например, Biochim Biophys Acta. 2007, 1773(8): 1150-60). MAPK затем активирует RSK, которая, в свою очередь, фосфорилирует рибосомный белок S6K (см., например, Pende et al. Mol Cell Bio, 2004. 24(8): р. 3112-3124). Негативным регулятором путей, ассоциированных с синтезом белка, является GSK3β. Ингибирование GSK3β блокирует эукариотический фактор инициации 2B (eIF2B), который участвует в синтезе белка. Показано, что экспрессия неактивной формы GSK3β вызывает резкое усиление гипертрофии мышечных трубочек скелетных мышц, а сверхэкспрессия GSK3β дикого типа в сердце индуцирует 30% снижение размера сердца (см., например, Santri, Physiology (Bethesda). 2008; 23:160-70).

В скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном (SP), по сравнению с контрольными мышами наблюдали значительное снижение уровня экспрессии генов mTOR (см. фигуру 31). Еще более резкое снижение уровня экспрессии гена MAP2K2 наблюдали в скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном (SP), что приводило к изменению его экспрессии в - 3,03 раза по сравнению с мышами, получавшими SD-корм (фигура 36).

Вывод о том, что введение дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или

менее неорганического селена (SELPLEX), ингибировало экспрессию S6K по сравнению с контрольными субъектами (см., например, фигуру 31), коррелировал с открытием, что SELPLEX снижал экспрессию mTOR и MAPK2K в скелетных мышцах мышей. В то же время вывод о том, что SELPLEX значительно ингибирует экспрессию GSK3 $\beta$  в

5 ткани икроножной мышцы мышей, получавших SELPLEX, был неожиданным с учетом того, что инактивация GSK-3 $\beta$  может стимулировать синтез белка. Эти результаты показывают, что несмотря на ингибирование генов, стимулирующих синтез белка в мышцах (например, mTOR, MAPK2K и S6K), дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена (или одна или более из селенсодержащих

10 композиций, присутствующих в них), увеличивает уровень общего белка в скелетных мышцах (например, массу скелетных мышц) за счет другого(их) пути(ей).

Ampk, ингибитор mTor, также участвует в синтезе белка (см., например, Gordon et al., 2008; Thomson et al., 2008). В скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, наблюдали повышенную экспрессию Prkaa2

15 (субъединицы Ampk) по сравнению с контрольными мышами, что согласовывалось с пониженной экспрессией S6k и mTOR (см. фигуру 31). Соответственно, в некоторых вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или селенсодержащих соединений, являющихся их компонентами) применяли, в соответствии с описанием, приведенным в настоящем

20 документе, с целью увеличения массы скелетных мышц у субъекта.

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, стимулирует экспрессию кальциневрина при формировании массы скелетных мышц

#### Сеть Calcinurin/NFAT

Сигнальный путь кальциневрина/ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT)

25 является ключевым путем, ассоциированным с увеличением массы скелетных мышц в ответ на физическую нагрузку и сигнальные пути с участием кальция (см., например, Glass, 2003). В ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования экспрессии сигнальных молекул кальциневрина/ NFAT, контролирующих гены гипертрофии. Обнаружено, что экспрессия генов,

30 кодирующих каталитические субъединицы кальциневрина (Ppp3cb и Ppp3cc и субъединицу Ppp3rl кальциневрина В), была значительно повышена в скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, по сравнению с контрольными мышами (см. таблицу 6 ниже). Кроме того, наблюдали тенденцию к повышению экспрессии Ppp3r2, другой субъединицы

35 кальциневрина В (см. таблицу 6 ниже).

	Гены	SP (по сравнению с SD-группой)
Кальциневрин	Ppp3ca	Нет
	Ppp3cb	↑
	Ppp3cc	↑
	Ppp3rl	↑
	Ppp3r2	↑ (тенденция)

5	NFAT	Nfatc1 (NFAT2)	Нет
		Nfatc2 (NFAT1)	Нет
		Nfatc3 (NFAT4)	Нет
		Nfatc4 (NFAT3)	Нет
		Nfat5	Нет

10	Кальциневрин	Гены	SP (по сравнению с SD-группой)
		Ppp3ca	Нет
		Ppp3cb	↑
		Ppp3cc	↑
		Ppp3rl	↑
		Ppp3r2	↑ (тенденция)

20 Таблица 6. Повышенный уровень кальциневрина в скелетных мышцах здоровых мышей, получавших в течение трех месяцев корм с добавлением селена в форме дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (SP), по сравнению с контрольным кормом без добавления селена.

25 Кроме того, в скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, отмечена стимуляция нескольких генов, кодирующих факторы элонгации белка (Eefla1, Eeflb2, Eefle1, Eef1g, Eef2), способствующие повышению уровня белка и росту скелетных мышц, по сравнению с контрольными мышами (см. фигуру 30).

30 Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, изменяет сигнальные сети, ингибирующие синтез белка в скелетных мышцах

#### Сеть миостатина/Acvr2b

35 Миостатин и его рецептор, активин А, представляют собой еще один важный путь, контролирующий атрофию мышц. Генетической ablации Acvr2b (специфической для мышечных волокон) было достаточно для индукции мышечной гипертрофии даже в отсутствие активации сателлитных клеток (см., например, Lee et al, PNAS 2012). Кроме того, комплекс миостатин/Acvr2b ингибирует синтез белка, нарушая сигнальный путь Akt/mTOR (см., например, Sakuma and Yamaguchi, J Aging, 2012).

40 Соответственно, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования экспрессии Acvr в скелетных мышцах субъектов, получавших контрольный корм по сравнению с кормом, содержащим селен. У субъектов, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, обнаружено значительное ингибирование экспрессии Acvr2b (см. фигуру 33).

45 Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, подавляет экспрессию генов атрофии и ингибирует разложение белка в скелетных мышцах

Документально показано, что повышенная экспрессия генов атрофии, например, белка 63, содержащего трехчастный мотив (Trim63), и атрогина-1 убиквитинлигазы E3 (Fbxo32) приводила к разложению белка при саркопении (см., например, Sakuma and Yamaguchi, 2012). Так, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки

выполнили эксперименты с целью исследования экспрессии генов атрофии в скелетных мышцах субъектов, получавших экспериментальный корм, по сравнению с субъектами, получавшими корм с недостатком селена. В скелетных мышцах мышей, получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее

5 неорганического селена, обнаружено ингибирование как Trim63, так и Fbxo32 по сравнению с контрольными мышами (см. фигуру 32). Пониженная экспрессия Trim63 и Fbxo32 также описана в скелетных мышцах здоровых мышей, в течение двух лет получавших селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, по сравнению с контрольными мышами.

10 Соответственно, в некоторых вариантах реализации селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или селенсодержащих соединений, являющихся их компонентами) применяли, в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, с целью ингибирования атрофии скелетных мышц.

15 Пример 4

Введение селенсодержащих композиций значительно снижает экспрессию молекул, связанных с ожирением

Саркопения и ожирение представляют собой два независимых, но взаимосвязанных состояния, которые оказывают большее влияние на продолжительность жизни и расходы

20 на здравоохранение в развитых странах. Сочетание пониженной мышечной массы с повышенной жировой массой называют «саркопеническим ожирением» (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113). Ожирение усугубляет саркопению, поскольку оно стимулирует накопление жировой массы и липидов, что предотвращает включение аминокислот и снижает синтез белка в мышцах (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013.

25 74: p. 109-113). В свою очередь, поскольку скелетная мышечная масса имеет важное значение для метаболического здоровья и играет основную роль в утилизации глюкозы во всем организме и в чувствительности к инсулину, саркопения усугубляет ожирение (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113). В дополнение к саркопении, ожирение часто представляет собой побочный эффект, связанный с другими

30 метаболическими заболеваниями, например, диабетом II типа, гипергликемией и др. Вполне понятно, что генетическая предрасположенность и экспрессия молекул, связанных с ожирением, также представляют собой способствующий фактор. Ожирение оказывает возрастающее влияние на продолжительность жизни и расходы на здравоохранение в развитых странах (см., например, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113).

35 Ген, связанный с жировой массой и ожирением (FTO), обычно называемый «геном ожирения», тесно ассоциирован с увеличением индекса массы тела и предрасположенностью к ожирению у детей и взрослых (см., например, Gulati et al, PNAS, 2013. 110(7): p. 2557-2562). Ген FTO экспрессируется во всем организме, однако 40 уровни его мРНК в головном мозге особенно высоки в гиппокампе, мозжечке и гипоталамусе, что указывает на потенциальную роль FTO головного мозга в контроле потребления пищи, общем метаболизме организма и ожирении (см., например, Church, PLoS Genetics, 2009).

45 Во время разработки вариантов реализации настоящей заявки были проведены эксперименты с целью определить, может ли введение селена субъекту изменить экспрессию FTO.

При использовании моделей животных, описанных в примере 3, установили, что субъекты, получавшие селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2%

или менее неорганического селена, демонстрировали заметно пониженный уровень экспрессии гена FTO не только в ткани коры (кратное изменение = -1,70), но и в ткани икроножной мышцы (кратное изменение = -3,33) по сравнению с субъектами, получавшими SD-корм (см. фигуры 36 и 37).

5 Пример 5

Обратная связь между экспрессией альфа-1-коактиватора (PGC-1 $\alpha$ ) гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR $\gamma$ ) в скелетных мышцах и печени при введении дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена

10 Материалы и способы

Животные и обработка

Самцов мышей C57BL/6J содержали поодиночке и поддерживали в совместном виварии для взрослых грызунов в мемориальном медицинском центре Управления социального обеспечения бывших военнослужащих им. Уильяма С. Миддлтона

15 (Мэдисон, штат Висконсин, США). В помещении поддерживали постоянную температуру и влажность. Комнатное освещение контролировали, обеспечивая 12-ч цикл светлого и темного периодов. Мышей обеспечивали водой и экспериментальным кормом без ограничений. Экспериментальные корма (производства Harlan Teklad, Мэдисон, штат Висконсин, США) хранили в темноте при 4°C. Свежий корм добавляли 20 в кормушку дважды в неделю.

Одна группа мышей получала базальный корм с концентрацией селена <0,01 мг/кг (SD); вторая группа получала корм, идентичный корму SD, но содержащий 1,0 мг/кг селена, добавляемого в виде селенита натрия (SS); третья группа получала корм, идентичный корму SD, но содержащий 1,0 мг/кг селена, добавляемого в виде

25 селенметионина (SM); а четвертая группа получала корм, идентичный корму SD, но содержащий 1,0 мг/кг селена, добавляемого в виде дрожжей обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена ((SP), SELPLEX, ALLTECH, Inc.

Лексингтон, штат Кентукки, США). Окончательная концентрация селена в каждом из кормов SS, SM и SP составляла одну (1) миллионную долю. Концентрацию селена в 30 кормовых готовых смесях оценивали посредством атомно-абсорбционной спектроскопии (Connolly, Power, Hynes, 2004); в экспериментальных кормах - с помощью Covance Inc. (Мэдисон, штат Висконсин, США). Базальный SD-корм содержал 15 г/100 г общего жира, а также 538,6 г/кг сахарозы, 300 г/кг дрожжей Torula, 140 г/кг кукурузного масла, 3,0 г/кг DL-метионина, 15,4 г/кг минеральной смеси (содержащей, в г/кг, карбонат

35 кальция, 2,02; хлорид натрия, 2,6; цитрат калия (моногидрат), 7,7; сульфат калия, 1,82; оксид магния, 0,84; цитрат железа (III), 0,21; карбонат марганца, 0,12; карбонат цинка, 0,056; сульфат калия-хрома, 0,019; карбонат меди (II), 0,011; иодат калия, 0,0004) и 3,0 г/кг смеси витаминов (содержащей, в мг/кг, битартрат холина, 2800; ниацин, 30; пантотенат кальция, 16; пиридоксин-HCl, 7; тиамин-HCl, 6; рибофлавин, 6; фолиевую

40 кислоту, 2; биотин, 0,2; витамин B-12 (0,1% в манните, 25; ацетат dl- $\alpha$ -токоферола (500 мкг), 100; пальмитат витамина А (500000 ед/г), 8, холекальциферол (500000 ед/г), 0,4; филлохинон, 3).

Мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков, а затем собирали их ткани.

Получение тканей:

45 Для исследования экспрессии генов в различных тканях собирали образцы сердца, печени и икроножной мышцы, быстро замораживали их в жидким азоте и хранили при -80°C. Для исследования экспрессии в головном мозге отделяли кору больших полушарий от окружающих тканей головного мозга, быстро замораживали ее в жидким

азоте и хранили при -80°C.

#### Выделение РНК

Образцы замороженных тканей гомогенизировали с помощью аппарата для разрушения тканей QIAGEN Tissue Ruptor (QIAGEN, Валенсия, штат Калифорния, США)

и выделяли общую РНК с помощью набора RNEASY Mini kit (QIAGEN) согласно протоколам, рекомендуемым компанией. Целостность и чистоту выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NANODROP ND-1000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, штат Делавэр, США) и дополнительно, подтверждали с помощью биоанализатора AGILENT 2100 Bioanalyzer System (AGILENT Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния, США).

Очищенную РНК преобразовывали в двуцепочечную кДНК с помощью набора реагентов для одностадийной амплификации кДНК GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit (AFFYMETRIX, Санта-Клара, штат Калифорния, США) с праймером T7-(dT)<sub>24</sub> и промотором РНК-полимеразы T7. Двуцепочечную

кДНК преобразовывали в кРНК, меченую биотином, с помощью набора для мечения мишени AFFYMETRIX GeneChip Expression 3'-Amplification One-Cycle Target Labeling Kit (AFFYMETRIX) согласно процедурам, рекомендованным производителем. кРНК, меченую биотином, очищали с помощью модуля очистки образцов GeneChip и фрагментировали нагреванием (35 мин при 94°C).

Микрочип и биоинформатика для анализа метаболических путей

Меченую кРНК гибридизовали с геномом мыши на чипах MG-430\_2.0 GeneChip (AFFYMETRIX) в течение 16 ч при 45°C с последующей промывкой, окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином (SAPE) и, наконец, сканированием на сканере GeneChip Scanner 3000 7G (AFFYMETRIX).

GeneSpring GX 12.5 (Agilent) использовали для валидации и нормировки данных микрочипа и выполнения статистического анализа и анализа картины экспрессии генов. Вкратце, нормировку выполняли, вначале масштабируя интенсивность набора зондов на чипах по средней интенсивности мишени, равной 500, а затем преобразуя исходный уровень в медианное значение для всех образцов данного исследования. Поправку на шум выполняли с помощью MAS5 на основании конструкции зондов микрочипа Perfect Match (PM, «полное совпадение») и Mis-Match (MM, «несовпадение»). Для минимизации возможности получения неправильных результатов наборы зондов с низкой интенсивностью сигнала и наборы зондов, помеченные алгоритмом AFFYMETRIX MAS5 при обработке всех образцов как «Отсутствующий», исключили из дальнейшего анализа. Дифференциально экспрессируемые гены отфильтровали с помощью графиков типа «вулкан», где гены с  $P < 0,05$  и соответствующим кратным изменением интенсивности сигнала ( $FC > 1,2$  или  $FC < -1,2$ ) считали значимо различающимися.

Для анализа биологических задач, представленных измененными профилями транскрипции, применяли два независимых подхода к анализу метаболических путей.

Во-первых, выполняли параметрический анализ представленности генов (PAGE), методику расчетов, которая позволяет определить значительные изменения в определенном наборе генов (см., например, Kim & Volsky, 2005) с целью выявления сильно измененных биологических процессов и сигнальных путей за счет питания.

Анализировали только компоненты генной онтологии (GO), содержащие по меньшей мере 10 и не более 1000 генов и характеризовавшиеся 3 или более низким уровнем. Для дальнейшего выявления функциональных кластеров, характеризующих изменения транскрипции, связанные с содержанием Se в рационе, значительно измененные гены дополнительно сгруппировали в сети, функции и канонические пути с помощью

программного обеспечения Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Редвуд-Сити, штат Калифорния, США). Точный критерий Фишера использовали для определения значимости ассоциации между генами и заданной сетью, биологической функцией или каноническим путем.

5 ПЦР-анализ в реальном времени.

ПЦР-анализ в реальном времени выполняли с использованием готовых праймеров и зондов TAQMAN производства Applied-Bioscience (INVITROGEN) согласно процедурам, рекомендованным производителем. Данные нормировали по уровню Actb в каждом образце и представляли как среднее  $\pm$  sem для количества образцов.

10 Статистический анализ

Для ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга рассчитывали t-критерий Стьюдента с целью определения статистических различий между двумя группами, в то время как для определения различий между несколькими группами выполняли односторонний дисперсионный анализ с последующим расчетом t-критерия Стьюдента.

15 Значение Р менее 0,05 считали значимым.

Предпосылки

Скелетные мышцы и печень являются двумя ключевыми инсулин-чувствительными органами в поддержании гомеостаза глюкозы. Переход этих органов в состояние инсулинрезистентности обуславливает большую часть изменений метаболизма глюкозы,

20 наблюдаемых у пациентов с сахарным диабетом II типа (см., например, Lowell and Shulman, 2005). Скелетные мышцы являются более важным из этих двух органов с точки зрения последствий развития инсулинрезистентности. Это обусловлено тем, что скелетные мышцы, как обнаружено, утилизируют или перерабатывают от 80 до 90% ежедневно потребляемой глюкозы (см., например, DeFronzo et al., 1985).

25 Документально показано, что митохондриальные гены окислительного фосфорилирования (OXPHOS) демонстрируют пониженную экспрессию у лиц с преддиабетом и диабетом по сравнению с здоровыми контрольными субъектами, и что значительное количество генов OXPHOS регулируются коактиватором транскрипции PGC1- $\alpha$  (см., например, Mootha et al., 2003). В этих исследованиях типичное снижение экспрессии генов OXPHOS было умеренным (примерно 20%), но очень постоянным; 30 89% исследованных генов демонстрировали пониженную экспрессию у лиц с нарушением переносимости глюкозы или диабетом II типа по сравнению с лицами с обычной переносимостью глюкозы. В качестве подтверждения важности экспрессии молекул OXPHOS известно, что аэробные упражнения, которые являются лучшим 35 нефармакологическим вмешательством при лечении диабета, увеличивают количество митохондрий и стимулируют экспрессию генов OXPHOS.

Соответственно, во время разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования возможности изменения активности OXPHOS в печени и/или скелетной мышце субъекта за счет введения селена (например, 40 в качестве терапевтического средства для лечения сахарного диабета II типа). Эмпирические данные, полученные при разработке вариантов реализации настоящей заявки, позволили обнаружить, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному 45 усилению экспрессии PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах по сравнению с контрольными субъектами (Кон) (см. фигуру 38).

Как описано в настоящем документе, PGC1- $\alpha$  является мощным коактиватором транскрипции, усиливающим митохондриальную активность в скелетных мышцах. В то же время экспрессия повышенного уровня PGC1- $\alpha$  в других тканях, помимо скелетных

мышц, может оказывать вредоносное и/или повреждающее воздействие на субъект. Например, в печени PGC1- $\alpha$  выполняет другую роль, чем в скелетных мышцах. В частности, повышенный уровень PGC1- $\alpha$  в печени приводит к усилению глюконеогенеза (продукции глюкозы; см., например, Liang and Ward, 2006), что является крайне неблагоприятным для субъектов с диабетом и нарушенной чувствительностью к инсулину, которые не могут усваивать глюкозу.

Так, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки были проведены эксперименты с целью исследования возможного влияния введения селена субъектам на экспрессию PGC1- $\alpha$  в тканях, не относящихся к скелетным мышцам. Как ни странно, обнаружено, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному снижению экспрессии PGC1- $\alpha$  в ткани печени по сравнению с контрольными субъектами (контроль) (см. фигуру 39). Это открытие было неожиданным и основывалось на наблюдении того, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, приводило к значительному усилению экспрессии PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах по сравнению с контрольными субъектами. Таким образом, в настоящей заявке предложены композиции, содержащие дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена (или одно или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них, для применения в способах усиления экспрессии PGC1- $\alpha$  в скелетных мышцах субъекта при одновременном снижении экспрессии PGC1- $\alpha$  в печени субъекта (например, тем самым обеспечивая повышение утилизации глюкозы в скелетных мышцах субъекта (например, за счет повышенного уровня OXPHOS) и подавление продукции глюкозы в печени).

В целях дальнейшего исследования и проверки способности композиции, содержащей дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, оказывать неравномерное влияние на экспрессию одного и того же вещества (например, PGC1- $\alpha$ ) в различных тканях субъекта выполнили эксперименты с целью анализа экспрессии фактора транскрипции COUP 2 (также известного как 2 член группы F2 подсемейства ядерных рецепторов (Nr2F2)) у субъектов, получавших селенсодержащую композицию. Nr2F2 является гипотетическим прямым ингибитором PGC1- $\alpha$  (см., например, Lin et al., 2011).

Как и в предыдущем случае, было неожиданно обнаружено, что введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (Эксп), приводило к значительному снижению экспрессии Nr2F2 в скелетных мышцах по сравнению с контрольными субъектами (Кон) (см. фигуру 38), и вместе с тем к значительному усилению экспрессии Nr2F2 в ткани печени по сравнению с контролем (см. фигуру 39). Эти данные представляют собой первое доказательство полезности композиции, содержащей селен в виде дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена (или одной или более из их водорастворимых фракций или одной или более из нерастворимых в воде фракций или одного или более из селенсодержащих соединений, присутствующих в них или получаемых из них) для применения при регуляции гомеостаза глюкозы в различных тканях (например, ткани скелетных мышц и ткани печени) у субъекта.

#### Пример 6

Введение селена в виде дрожжей, обогащенных селеном, усиливает экспрессию молекул, участвующих в утилизации глюкозы

На животной модели, описанной в примере 2, выполнили эксперименты с целью анализа экспрессии молекул, регулирующих окислительное фосфорилирование

(OXPHOS) в печени субъектов, получавших селенсодержащую композицию. Обнаружено, что можно предпочтительно и дифференцированно регулировать специфическую для печени митохондриальную активность посредством введения дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, в то время как введение селена в виде селенита или селенметионина было значительно менее эффективным. В частности, наблюдали, что мыши, получавшие дрожжи, обогащенные селеном, содержащие 2% или менее неорганического селена, демонстрировали значительное усиление экспрессии АТФ-синтазы; Н<sup>+</sup>-транспортной субъединицы V1 А АТФазы; субъединицы Va цитохромом с-оксидазы; цитохрома с-1, субкомплекса 10 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; субкомплекса 1 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; субкомплекса 3 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; субкомплекса 4 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; субкомплекса aase НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; субкомплекса 4 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 бета; субкомплекса 8 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 бета; субкомплекса 10 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 бета; Fe-S-белка 4 НАДН-убихинондиногидрогеназы; Fe-S-белка 6 НАДН-убихинондиногидрогеназы; и субъединицы С сукцинатдегидрогеназы; а также значительное снижение экспрессии ингибирующего фактора 1 АТФазы; Н<sup>+</sup>-транспортной лизосомальной субъединицы V1 Н АТФазы; субкомплекса 4 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; и белка 2, содержащего домены цинкового пальца и ССНС.

В отличие от этого, мыши, получавшие селенит натрия, демонстрировали значительное усиление экспрессии Н<sup>+</sup>-транспортной субъединицы V1 А АТФазы; Н<sup>+</sup>-транспортной субъединицы V1 D АТФазы; субъединицы Va цитохромом с-оксидазы; субкомплекса 10 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; субкомплекса 1 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа; субкомплекса 10 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 бета; и субъединицы С сукцинатдегидрогеназного комплекса; а также значительное снижала экспрессию ингибирующего фактора 1 АТФазы; Н<sup>+</sup>-транспортной лизосомальной субъединицы V1 Н АТФазы; и субкомплекса 4 НАДН-убихинондиногидрогеназы 1 альфа.

Мыши, получавшие селенметионин, демонстрировали значительное усиление экспрессии АТФ-синтазы и субъединицы Va цитохромом с-оксидазы; а также значительное снижение экспрессии ингибирующего фактора 1 АТФазы; АТФазы, Н<sup>+</sup>-транспортной лизосомальной субъединицы V1 Н АТФазы; Н<sup>+</sup>-транспортной субъединицы V1 А АТФазы.

### 35 Пример 7

Выделенные селенсодержащие соединения регулируют активность митохондрий В любой сложной биологической смеси возможно неаддитивное действие групп молекул, присутствующих в ней; вместо этого они могут действовать синергетически или даже антагонистически, регулируя активность конечного препарата. Например, биологическая активность дрожжей, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, описанных в настоящем документе, может быть обусловлена суммой эффектов некоторых или всех разновидностей селена/селенсодержащих соединений, являющихся ее компонентами.

Как описано выше в примере 1, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью исследования характеристик метаболома и протеома дрожжей, богатых селеном. В примере 1 показано выявление и исследование характеристик Se-содержащих соединений (например, молекул, метаболитов и белков/пептидов), принадлежность и характеристики которых до сих пор оставались

неизвестными.

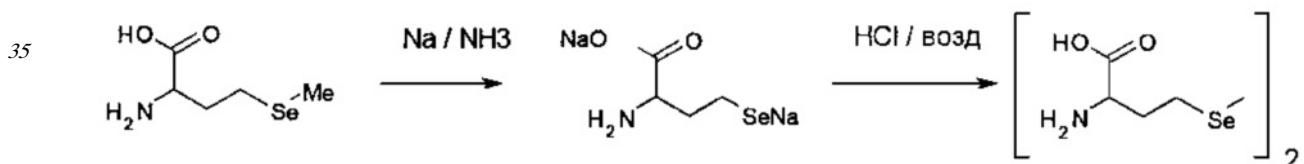
Так, во время разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью определить, обладают ли конкретные селенсодержащие соединения, выявленные в примере 1, биологической активностью (например,

5 определить, проявляют ли селенсодержащие соединения биологическую активность и/или могут ли селенсодержащие соединения быть более (или менее) биологически активными при выделении и очистке от компонентов дрожжевых клеток и/или внутренней смеси других, не содержащих селена, клеточных компонентов).

Синтезировали или получили ряд наиболее распространенных селенсодержащих 10 соединений и молекул, обнаруженных в дрожжах, обогащенных селеном, в примере 1. Одним из центров внимания экспериментов являлся водорастворимый экстракт, содержащий, согласно описанию, приведенному в примере 1, до 25% общего селена, присутствующего в дрожжах, обогащенных селеном. Предполагалось, что селенсодержащие соединения водорастворимого экстракта должны в первую очередь 15 высвобождаться/гидролизоваться из дрожжей, обогащенных селеном, после их потребления субъектом и прохождения через кишечник. Кроме того, в примере 1 выше описано, что селенсодержащие белки, присутствующие в дрожжах, обогащенных селеном, были выявлены с использованием компьютерного прогностического моделирования. Кроме того, эксперименты выявили небольшие селенсодержащие 20 пептиды, высвобождающиеся под действием пищеварительных ферментов (например, трипсина).

Получили панель из девяти селенсодержащих соединений для анализа и исследования их характеристик. Эта панель включала следующие селенсодержащие соединения: LVSe-MR ( $C_{16}H_{33}N_6O_4Se$ ) (№5); LVSe-MR ( $C_{22}H_{44}N_7O_5Se$ ) (№6); LTGSe-MAFR (№25) ( $C_{35}H_{59}N_{10}O_9Se$ ) (№7); димер селенглутатионина ( $C_{20}H_{32}N_6O_{12}Se_2$ ) (№8); метилселенаденозин ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9); глутамилселенцистеин ( $C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$ ) (№10); дрожжи, pH 6,0 (№25); (3X) глутатион, окисленный (получен из Sigma Aldrich) (№28); и глутамилцистеин (получен из Sigma Aldrich) (№30).

Использованные селенсодержащие соединения (и произвольно присвоенные 30 каждому из них номера) представляли собой: (№1) L-селенцистеин ( $C_6H_{12}N_2O_4Se_2$ ) получили из Sigma-Aldrich, № по каталогу 545996, чистота 97%; (№2) L-селенгомоцистин ( $C_8H_{16}N_2O_4Se_2$ ). Использовали следующую схему и методологию синтеза:



К раствору E-(+)-селенметионина (1,96 г, 10,0 мМ) в жидким аммиаке (80 мл, 60 г) 40 при температуре -78°C (баня с сухим льдом-ацетоном) при перемешивании осторожно добавляли небольшие кусочки металлического натрия (0,575 г, 25,0 мМ) в течение 80 мин, пока раствор не оставался синим в течение 15 мин. Раствор перемешивали в течение 50 мин при температуре -78°C и добавляли твердый хлорид аммония (3,0 г, 56 мМ) для нейтрализации амида натрия. Реакционную смесь открывали для доступа воздуха и 45 медленно нагревали до комнатной температуры в течение ночи. Полученное желтое твердое вещество смешивали с 100 мл воды и доводили pH с ~9,0 до 6,7 путем добавления 1 н. HCl (6,0 мл). Добавляли метанол (50 мл) и энергично перемешивали смесь в потоке воздуха с 9:00 (28.04.11) до 9:00 (29.04.11). Бледно-желтый осадок собирали фильтрацией

(1,652 г, выход 91,2%); он состоял из чистого селенгомоцистина ( $R_f=0,52$ ) без примесей селенметионина ( $R_f=0,8$ ). TCX :  $\text{SiO}_2$ ;  $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_4\text{OH}/18:2:0,2$ ). Желтые пятна после обработки 5%  $\text{KMnO}_4$  и нагревания. MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ )=433. ЯМР, 400 МГц, 1 н. DCl в <sup>5</sup>  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta=0,0$  м.д. ( $\text{Me}_3\text{Si-CD}_2\text{CD}_2\text{CO}_2\text{Na}$ ): 5,238 ш.с. все  $\text{ND}_3^+$ , 7,13 H/D; 4,259 т,  $J=6,4$  Гц, 1H, C-1; 3,058 дт,  $J=3,2$  и 6,4 Гц, 2H, C-3; 2,446 дп,  $J=6,4$  и 13,6 и 6,4, 2H, C-2 (оптически активный).

(№3) метилселен-L-цистеин ( $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2\text{Se}$ ) получили из Sigma-Aldrich в виде <sup>10</sup> гидрохлорида, № по каталогу M6680, чистота 95%. (№4) L-селенметионин ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$ ) получили из Sigma-Aldrich, № по каталогу S3132, чистота 98%. (№5) VSe-MR ( $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_4\text{Se}$ ) синтезирован в и получен из Biomatik, Уилмингтон, штат Делавэр, США). (№6) LVSe-MR ( $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_2\text{Se}$ ) синтезирован в и получен из Biomatik, Уилмингтон, штат Делавэр, США).

(№7) LTGSe-MAFR ( $\text{C}_{35}\text{H}_{59}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{Se}$ ) синтезирован в и получен из Biomatik, Уилмингтон, штат Делавэр, США).

(№8) Димер селенглутатиона ( $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{Se}_2$ ) синтезирован в и получен из Biomatik, Уилмингтон, штат Делавэр, США). Использовали следующую схему и методологию <sup>20</sup> синтеза:

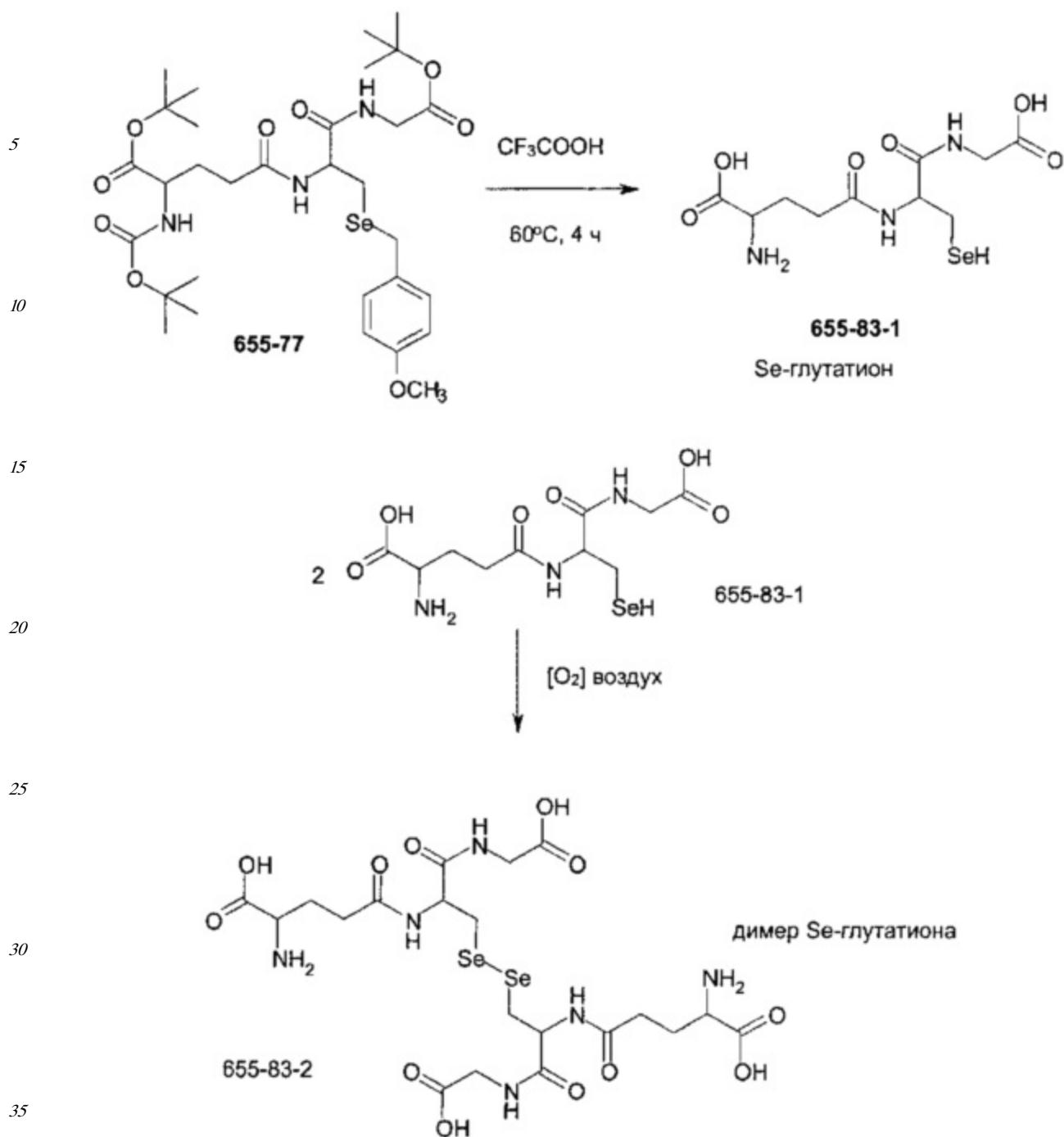
25

30

35

40

45



### Синтез МОВ-сelenцистеина (665-71)

3,341 г селенцистина (10 ммоль) растворяли в 10 мл 0,5 н. раствора гидроксида натрия

40 (ледяная баня, Ar<sup>0</sup>, 30 мин, желтое окрашивание раствора), а затем порциями добавляли 1,35 г (30 ммоль) боргидрида натрия до полного обесцвечивания. К реакционной смеси добавляли 2 н. гидроксид натрия (30 мл) при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке и вносили чистый р-метоксибензилхлорид (7,831 г, 50 ммоль) при охлаждении льдом. Перемешивание, охлаждение и поток Ar<sup>0</sup> поддерживали в течение 4 ч. По истечении этого времени добавляли ~7,0 мл конц. соляной кислоты, доводя pH реакционной смеси до 8,5. Образующийся белый осадок отфильтровывали и промывали 2×10 мл и 5×10 мл этилового эфира. Продукт высушивали в течение 20 ч над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в

глубоком вакууме, получая 8,29 г аморфного белого осадка, который использовали на следующей стадии синтеза без дополнительной очистки.

**Синтез Boc-Glu(OtBu)-Se(MOB)CysOH (655-72)**

Раствор 6,55 г (16,357 ммоль) Boc-Glu(OtBu)-NHS эфира в 50 мл 1,4-диоксана

- 5 добавляли при перемешивании на магнитной мешалке к суспензии 4,68 г (16,25 ммоль) МОВ-селенцистеина в смеси 12,5 мл воды и 2,3 мл (16,5 ммоль) триэтиламина при температуре окружающей среды (22°C) и оставляли на 50 ч при эффективном перемешивании. По истечении этого времени смесь охлаждали на бане со льдом и по каплям добавляли смесь 1,4 мл конц. соляной кислоты и 8,6 мл воды. Избыток 10 растворителя удаляли на вакуумном роторном испарителе при T<25°C, раствор разбавляли 20 мл воды (pH 6,5) и экстрагировали 3×50 мл этилового эфира, 3×50 мл этилацетата и 3×50 мл дихлорметана. Растворы выпаривали досуха, получая 9,2 г неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии синтеза без дополнительной очистки.

15 **Синтез Boc-Glu(OtBu)-Se(MOB)Cys-NHS эфира (655-75)**

Boc-Glu(OtBu)-Se(MOB)CysOH (9,2 г, 16,0 ммоль), N-гидроксисукцинимид (1,841 г, 16,0 ммоль) и N,N-диметилбензиламин (130 мкл) растворяли/суспендировали в 200 мл безводного этилового эфира. Затем добавляли раствор дициклогексилкарбоимида (3,404 г, 16,5 ммоль) в 100 мл безводного этилового эфира при интенсивном

- 20 перемешивании через капельную воронку (с уравновешиванием воздухом) при температуре окружающей среды (22°C). Реакционную смесь оставляли при перемешивании на 24 ч, образующийся белый осадок отфильтровывали, промывали 3×20 мл безводного этилового эфира и выбрасывали. Фильтраты концентрировали, получая 12,95 г желтого вязкого масла, которое использовали на следующей стадии 25 синтеза без дополнительной очистки. Синтез полностью защищенного селенглутатиона (см. схему, 655-77)

Весь Boc-Glu(OtBu)-Se(MOB)Cys-NHS эфир с предыдущего этапа, (12,97 г, ~16 ммоль), 3,2 г (19,1 ммоль) глицингидрохлорид-O-tBu эфира и 4,2 мл триэтиламина растворяли в 130 мл безводного этилового эфира и оставляли при перемешивании и температуре 30 окружающей среды (22°C) на выходные. Образующийся белый осадок (гидрохлорид триэтиламина) отделяли фильтрованием и промывали на фильтре 2×25 мл безводного эфира. Фильтрат концентрировали в вакууме с помощью роторного испарителя, получая 12,9 г масла, которое разбавляли 11 мл смеси растворителей : толуол : этилацетат :

ацетонитрил (7:2:1) и наносили на ЖХ-колонку с  $\text{SiO}_2$  (50-см основание),

- 35 изготовленную из суспензии 350 мл  $\text{SiO}_2$  в 400 мл аналогичной смеси растворителей. Низкополярные примеси собирали в первых 500 мл элюента. Продукт собирали посредством элюирования колонки 500 мл смеси толуол : этилацетат : ацетонитрил (5: 2:1), а затем 400 мл смеси этих же растворителей (4:2:1).  $R_f$  продукта составил 0,55 в 40 смеси растворителей 4:2:1. Пятна проявляли путем погружения пластины в 5%  $\text{KMnO}_4$  (желтое окрашивание). Все фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали в вакууме с помощью роторного испарителя и, наконец, высушивали в высоком вакууме, получая 4,658 г продукта с MW=686,7 m/e, что полностью совпадало с рассчитанным значением для формулы селенглутатиона:  $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_9\text{Se}$ .

45 **Синтез димера селенглутатиона (655-83)**

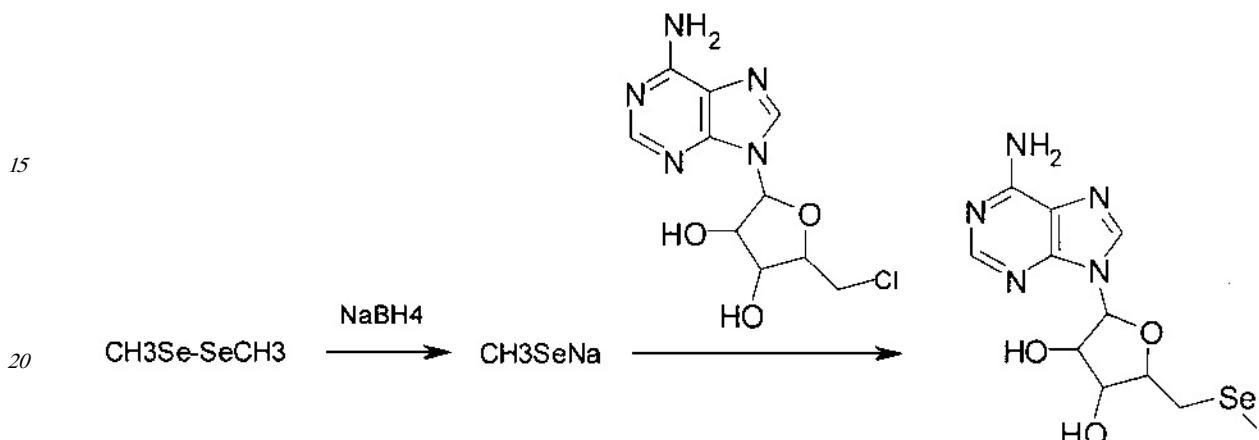
Гидрофобный очищенный с помощью ЖХ продукт, полученный на предыдущей стадии, растворяли в смеси 30 мл тиоанизола и 50 мл трифтормукусной кислоты.

Полученный раствор перемешивали и нагревали до 60°C в течение 5 ч. По истечении

этого времени выделение газов прекратилось. Затем смесь перемешивали в течение 5 ночи при комнатной температуре. На следующее утро трифторуксусную кислоту удаляли в вакууме при  $T < 37^\circ\text{C}$  с помощью роторного испарителя. Маслянистый остаток добавляли  $\sim 1,5$ -мл порциями при интенсивном механическом перемешивании в 400 мл безводного этилового эфира. Супернатант отбрасывали, а осадок промывали  $4 \times 50$  мл 10 порциями безводного этилового эфира и, наконец, высушивали в глубоком вакууме. Полученный белый осадок (3,16 г) очищали с помощью препаративной ВЭЖХ, получая 1,1 г чистого димера селеноглутатиона (MW 594,87) m/e.

(№9) Метилселенаденозин ( $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_3\text{Se}$ ). Использовали следующую схему и

10 методологию синтеза:

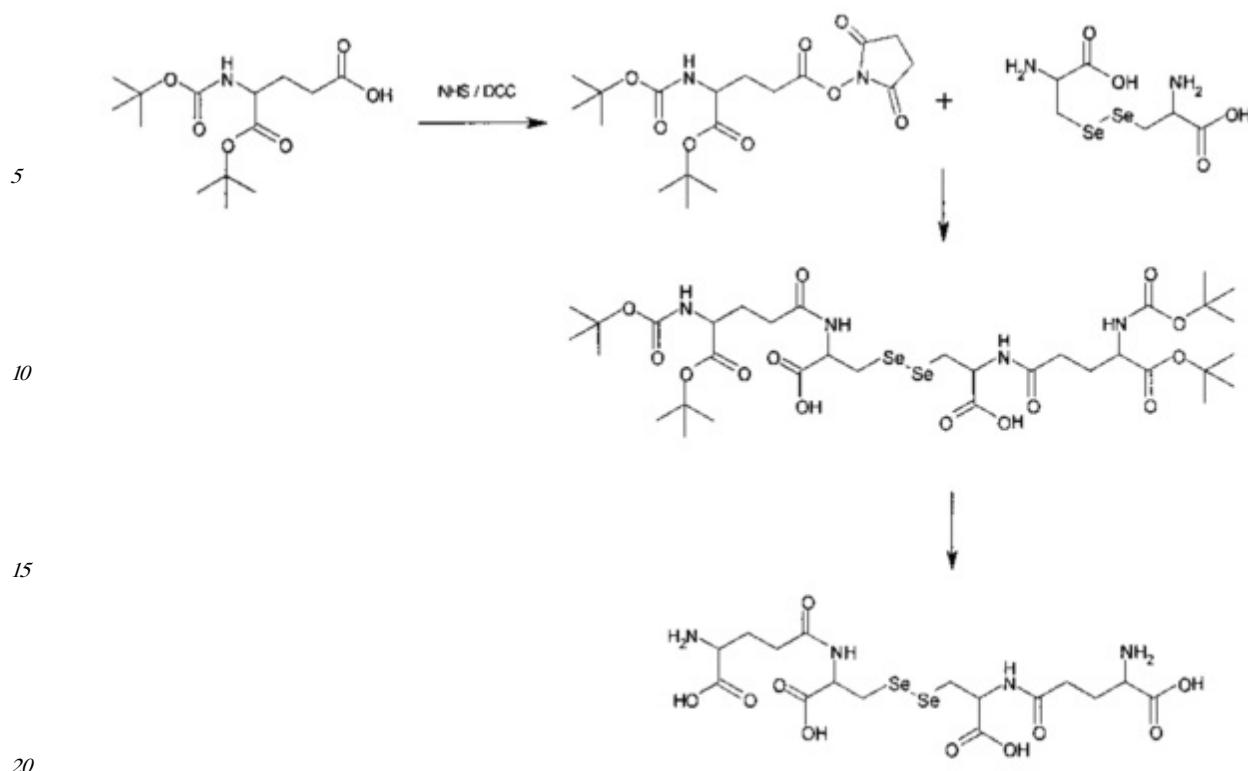


Боргидрид натрия (227 мг, 6,0 мМ, в атмосфере  $\text{Ar}^0$ ) помещали в 200-мл круглодонную 25 колбу, содержащую 20 мл безводного этилового спирта, оборудованную магнитной мешалкой и расположенную на ледяной бане. Из шприца добавляли диметилдиселенид (190 мкл, 376 мг, 2,0 мМ) при охлаждении, перемешивании и в потоке Ar. После обесцвечивания желтоватого раствора добавляют твердый 5'-хлор-5'-дезоксиаденозин (1,143 г, 4,0 мМ). 5'-Cl-Ade очень плохо растворим в этиловом спирте. Для растворения осадка добавляли еще 100 мл этилового спирта. Перемешивание смеси при комнатной 30 температуре продолжали в течение следующих четырех дней. Для мониторинга преобразования использовали МС. За 5 дней достигалось  $\sim 75\%$  преобразование. Растворители выпаривали, 3,22 г продукта (с  $\sim 20\%$  SM) собирали и очищали с помощью обращенно-фазовой (C-8) препаративной хроматографии, получая 1,1 г чистого 35 продукта, молекулярную массу которого подтверждали масс-спектрометрией.

(№10) Димер глутамилселеномоцистеина ( $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Se}_2$ ). Использовали следующую схему и методологию синтеза:

40

45



### Синтез N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu (639-37)

25 N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OH (2,712 г, 9,0 мМ), N-гидроксисукцинид (1,047 г, 9,1 мМ) и дициклогексилкарбодиимид (1,888 г, 9,15 мМ) суспендировали/растворяли в 300 мл безводного этилового эфира и добавляли в реакционную смесь 50 мкл диметилэтилбензиламина из шприца. Перемешивание при комнатной температуре поддерживали в течение 24 ч. Смесь фильтровали, осадок промывали 3×20 мл этилового эфира. Фильтрат концентрировали и высушивали в глубоком вакууме, получая белый кристаллический продукт (3,6 г, выход 100%). MS (M+Na<sup>+</sup>)=423,17; ЯМР 400 МГц Varian, CDCl<sub>3</sub>, м.д.: 5,152 2H, д, J=7,6 Гц, NH; 4,255 1H, кв, J=4,4 Гц; 2,838 4H, шс; 2,734 1H, ддд (?) 7 линий; 2,673 1H, ддд(?) 7 линий; 2,272 1H, октет, J=5,2 Гц; 2,021 1H, м; 1,478 9H, с; 1,450 9H, с.

30 35 Синтез димера N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-L-Secys-OH (639-39)

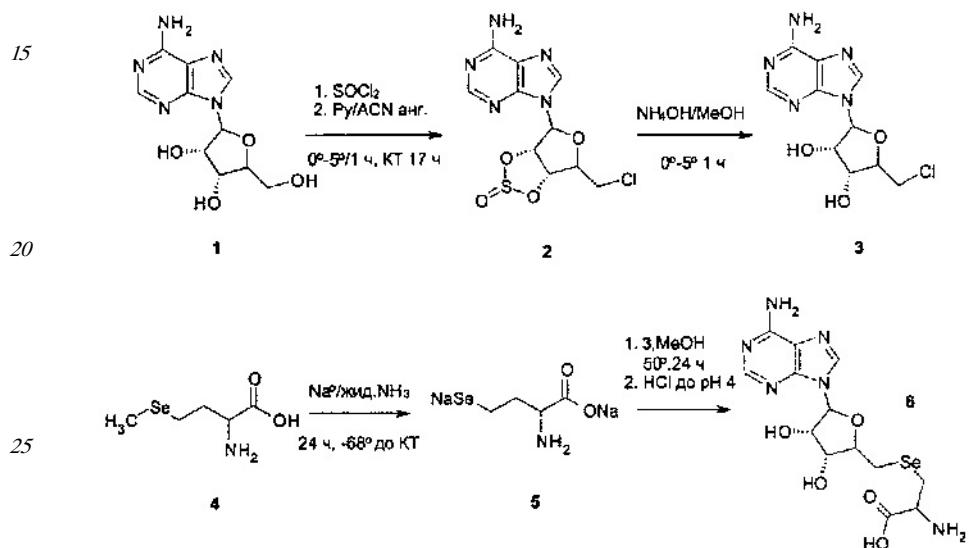
Селенцистин (1,5 г, 4,49 мМ) растворяли/суспендировали в воде (25 мл). Смесь охлаждали в бане со льдом при перемешивании на магнитной мешалке и добавляли триэтиламин (1,324 мл, 0,961 г, 9,5 мМ). Раствор N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu (3,6 г, 8,99 мМ) в 50 мл 1,4-диоксана получали и добавляли по каплям в перемешиваемую и охлажденную реакционную смесь. Реакционную смесь оставляли при перемешивании на ночь при комнатной температуре. Некоторое количество желтого осадка отделяли от раствора и отфильтровывали. Фильтрат выпаривали в вакууме и высушивали в глубоком вакууме, получая белое твердое вещество (5,388 г). Это вещество растворяли в 8 мл метилового спирта и передавали для хроматографии на SiO<sub>2</sub> с использованием 40 45 2:1→1:2/AcOEt:MeOH + 0,5% AcOH. Димер N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-L-Secys-OH (1,212 г после высушивания KOH/в глубоком вакууме) выделяли в виде одной фракции (R<sub>f</sub>=0,32, 1:1/AcOEt:MeOH + 0,5% AcOH). MS (M+H<sup>+</sup>)=909,11; ЯМР 400 МГц Varian, ДМСО d<sup>6</sup>,

м.д.: 7,658 1H, д, J=6,4 Гц, NH; 7,206 1H, д, J=7,2 Гц, NH; 4,20 1H, м; 3,759 1H, м; 3,455 1H, часть А ABX<sub>2</sub>; 3,404 часть В ABX<sub>2</sub>; 2,18 2H, ш пент; 1,877 1H, м; 1,75 1H, м; 1,391 9H, с; 1,379 9H, с.

Синтез димера L-Glu-Secys-OH (639-46)

Смесь ТФУК : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : тиоанизол : H<sub>2</sub>O/47:47:3:3 (25 мл) добавляли к твердому димеру N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-L-Secys-OH (1,21 г) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 3,5 ч и выливали в воду (50 мл). Водный (верхний) слой отделяли и промывали 5×50 мл этилового эфира. Водный слой выпаривали в вакууме при температуре ниже 40°C и высушивали в глубоком вакууме над гранулами NaOH. Димер L-Glu-Se-Cys-OH (0,717 г, выход 99,8%). MS (M+H<sup>+</sup>)=592,92.

(№11) Селенаденозилгомоцистеин (C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Se). Использовали следующую схему и методологию синтеза:



5'-хлор-5'-дезоксиаденозин (639-62)

Поместите 89 г (0,366 моль, 1 экв.) аденоцина, 59,3 мл (58 г, 1,833 моль, 2 экв.) безводного пиридина и 1 л безводного ацетонитрила в высушенную в печи 2 л 4-х горлую колбу, оснащенную капельной воронкой, мешалкой, патрубком для подвода/отвода газа и термометром. Набор реагентов помещали на ледяную/солевую баню. Начинали перемешивание и при падении температуры раствора ниже 3°C начинали очень медленное добавление тионилхлорида (сильно экзотермическая реакция!). Температуру реакционной смеси во время добавления тионилхлорида и в течение еще 4 ч необходимо поддерживать ниже 5°C (в это время раствор являлся желтым и содержал бело-желтый осадок на дне). Затем реакционную оставляли на ночь при комнатной температуре. На следующее утро объемный осадок отфильтровывали через фильтр из пористого стекла и промывали на фильтре тремя 100-мл объемами сухого ацетонитрила; при этом цвет осадка менялся на белый. Затем влажный осадок переносили обратно в 2 л реакционную колбу, содержащую смесь 800 мл метанола и 160 мл воды, в которую по каплям добавляли 80 мл концентрированного раствора гидроксида аммония при механическом перемешивании и охлаждении на водяной бане. Смесь перемешивали в течение 45 минут при комнатной температуре, полученный белый осадок отделяли от жидкости вакуумной фильтрацией. Фильтрат концентрировали досуха с помощью вакуумного роторного испарителя, осадок кристаллизовали из ~560 мл горячей воды, охлаждали на ледяной бане, первую порцию кристаллов отфильтровывали и лиофилизировали. Затем этот фильтрат использовали в качестве растворителя при

криSTALLизации твердых веществ, полученных при роторном испарении первого фильтрата, получая вторую порцию продукта, которую также лиофилизовали (2 сут). На конечном этапе обе порции кристаллов высушивали в течение двух дней над пентоксидом фосфора в вакуумном эксикаторе. Получали 84 г белых кристаллов (80,5% выход). MS (286-M+H), температура плавления 187°C.

5 Селенаденозилгомоцистеин (655-40)

9,806 г (50 mM, 1 экв.) L-селенметионина загружали в 2 л трехгорлую колбу, оснащенную термометром, большим охлаждающим «пальцем» (с барботажным измерителем на выходе), впускным патрубком для газобразного аммиака (достигающего 10 дна колбы) и магнитной мешалкой, и помещали в 2,5 л сосуд Дьюара, содержащий охлаждающую баню с CO<sub>2</sub>-ацетоном. Перед добавлением твердого CO<sub>2</sub> в баню с

15 ацетоном и охлаждающий «палец» через колбу пропускали Ar<sup>0</sup>. Когда температура внутри колбы падала ниже -35°C, запускали поток безводного (газообразного) аммиака, а когда уровень жидкого аммиака достигал объема 800 мл, поток газа останавливали.

20 В это время к тщательно перемешиваемому раствору добавляли небольшие кусочки металлического натрия до появления сине-фиолетового окрашивания раствора на ~30 с. В общей сложности добавляли 2,645 г (115 mM, 2,3 экв.) натрия в течение 45 мин.

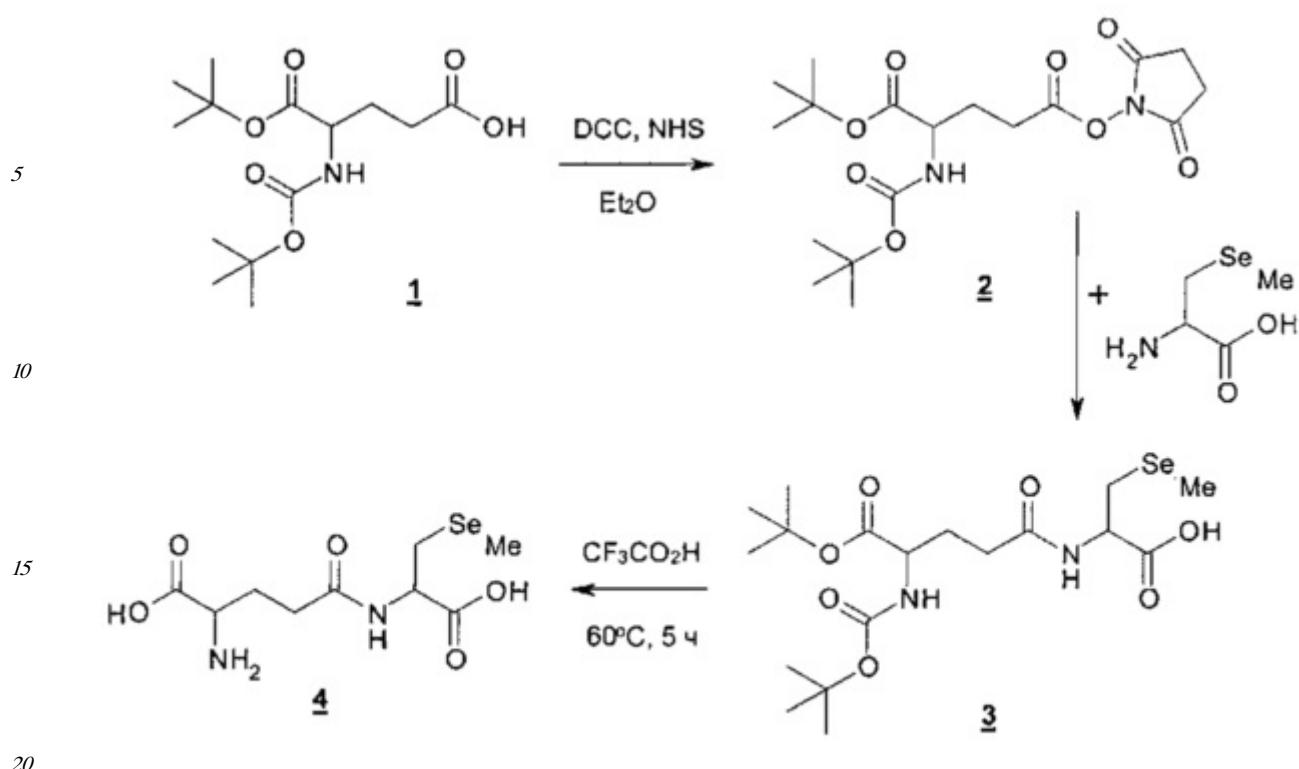
Перемешивание и охлаждение поддерживали в течение еще 30 мин. В это время все 25 компоненты находились в растворе. Добавляли 14,856 г (52 mM, 1,04 экв.) безводного 5'-хлор-5'-дезоксиаденозина одной порцией, и реакционную смесь оставляли при

перемешивании и очень медленном потоке Ar<sup>0</sup> на ночь. На следующее утро (после расходования всего аммиака) к белому твердому веществу, присутствующему в колбе, добавляли 350 мл безводного метанола. Колбу помещали на масляную баню,

25 устанавливали конденсатор с обратным холодильником, поддерживали поток Ar<sup>0</sup> и нагревали масляную баню до 50°C в течение следующих 24 ч. В это время 1 мл раствора подкисляли до pH 3,5 добавлением нескольких капель 0,1 н. HCl и анализировали образец на предмет присутствия субстратов посредством масс-спектрометрии. Если их содержание было ниже 5%, смесь можно подкислить 1 н. HCl до pH 3,5, отфильтровать

30 от солей, концентрировать досуха с помощью вакуумного роторного испарителя и очистить неочищенный продукт кристаллизацией из смеси вода-этанол. Чистота 15,98 г (выход 74%) первой порции кристаллов селенаденозилгомоцистеина составляла ~95%; их можно использовать в биологических исследованиях без дополнительной очистки.

35 (№39) γ-глутамилметилселенцистейн (C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Se). Использовали следующую схему и методологию синтеза:



#### Синтез N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu (655-90)

N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OH (303 мг, 1,0 ммоль), N-гидроксисукцинимид (121 мг, 1,05

ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (227 мг, 1,1 ммоль) суспендировали/растворяли в 15 мл безводного этилового эфира и добавляли в реакционную смесь 10 мкл диметилэтилбензиламина из шприца. Перемешивание при комнатной температуре (22°C) поддерживали в течение 48 часов. Смесь фильтровали, осадок промывали 10×10 мл этилового эфира. Фильтрат концентрировали и высушивали в глубоком вакууме, получая белый кристаллический продукт (570 мг, выход 90%). MS (M+Na<sup>+</sup>)=423,17;

#### Синтез N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-MeSe-Cys-OH (655-90)

N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu (570 мг, 0,9 ммоль), метилсelenцистеин (175 мг, 0,8 ммоль), триэтиламин (152 мг, 209 мкл, 1,5 ммоль) добавляли к смеси 6 мл 1,4-диоксана и 2 мл воды. Перемешивание реакционной смеси с помощью магнитной мешалки поддерживали

в течение 100 ч. По истечении этого времени добавляли 1,21 н. HCl (1,65 мл), полученную постреакционную смесь экстрагировали 3×20 мл этилового эфира, а экстракт концентрировали досуха с помощью вакуумного роторного испарителя, получая 649 мг воскообразного продукта, который подвергали препаративной ВЭЖХ. Собирали 283 мг продукта (выход 75,6%). Масс-спектр подтвердил молекулярную массу продукта и наличие одного атома Se в нем. Рассчитанная Ms для C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Se = 468,42;

обнаружено 469,24 m/e (M+H<sup>+</sup>) и 491,24 m/e (M+Na<sup>+</sup>).

#### Синтез $\gamma$ -глутамилметилсelenцистеина (655-92)

Смесь 283 мг (0,6 ммоль) N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-MeSe-Cys-OH, 2 мл тиоанизола и 5 мл трифторуксусной кислоты нагревали при перемешивании на магнитной мешалке на масляной бане в течение 6 ч и при температуре 63°C и оставляли на ночь при комнатной температуре (22°C). По истечении этого времени реакционную смесь добавляли (по каплям) в энергично перемешиваемый этиловый эфир (20 мл). Образовывался осадок,

который промывали 2×20 мл этилового эфира, получая 138,3 мг кремообразного осадка, который затем очищали препаративной ВЭЖХ.

(№25) Экстракт дрожжей, не обогащенных селеном, получали в соответствии с описанием в патентной публикации США №20120164234 A1 при pH 6,0. №28) (3X)

5 Окисленный глутатион. Получали из Sigma Aldrich.

(№30) Глутамилцистеин. Получали из Sigma Aldrich.

Селенсодержащие соединения идентифицировали по номеру на фигуре 40 и в таблице 7 ниже.

С целью определения наличия и характера потенциального действия отдельных

10 селенсодержащих соединений на биоэнергетику митохондрий селенсодержащие соединения непосредственно анализировали с использованием выделенных митохондрий. Митохондрии, выделенные из головного мозга крысы, выбрали для этой цели по ряду причин, включая а) легкость, с которой митохондрии можно выделить из мягких тканей, например, головного мозга, и б) тот факт, что ткани мозга характеризуются высокой 15 потребностью в глюкозе и кислороде.

Выполнили следующие эксперименты: тестировали различные концентрации селенсодержащих соединений, начиная с низких (50 миллиардных долей), средних (500 миллиардных долей) и высоких (1 м.д.). На основании отсутствия наблюдаемой токсичности по отношению к митохондриям при средних концентрациях для скрининга/ 20 анализа активности применяли концентрацию 500 миллиардных долей (5 мкМ) с использованием митохондриальной биоэнергетики в качестве основного конечного показателя. Митохондрии выделяли из головного мозга взрослых крыс с помощью фиколла и инкубировали с отдельными селенсодержащими соединениями в течение 30 минут при 37°C до загрузки в проточный анализатор Seahorse Biosciences в трех 25 повторностях. Параметры OCR (скорости потребления кислорода) измеряли при трех дыхательных состояниях, включая синтез АТФ (состояние III), зависимую от комплекса I (НАДН-зависимую) максимальную дыхательную емкость (состояние V<sub>FCCP</sub>) и зависимую от комплекса II (ФАДН-зависимую) максимальную дыхательную емкость (состояние V<sub>succ</sub>). Анализ Sea Horse выполняли в соответствии с описанием (см., 30 например, Sauerbeck et al., J Neurosci Methods. 2011 May 15; 198(1): 36-43; Seahorse XF, Seahorse Bioscience Inc).

Результаты оценки биоэнергетики митохондрий представлены на фигуре 40. Отмечено, что два из девяти соединений (селенсодержащие пептиды LVSe-MR (C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Se) 35 (№6) и метилселенаденозин (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Se) (№9)) демонстрировали положительное усиление всех трех дыхательных состояний и повышенные профили митохондриальной биоэнергетики (см. фигуру 40а, в качестве контроля использовали равное количество выделенных митохондрий, инкубированных без селенсодержащего соединения). В частности, LVSe-MR (C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Se) усиливал состояние III (10,3%), состояние V<sub>FCCP</sub> 40 (21,2%) и состояние V<sub>succ</sub> (7,6%) по сравнению с контролем. Метилселенаденозин усиливал состояние III (17,3%), состояние V<sub>FCCP</sub> (15,6%) и состояние V<sub>succ</sub> (25%) по сравнению с контролем.

Биологическую активность селенсодержащего пептида LVSe-MR (C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Se) 45 (№6) и метилселенаденозина (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Se) (№9) анализировали с использованием oxytherm (электрода Кларка) (см., например, Chance and Williams, J Biol Chem, 1955, 217, 383-393; Sullivan et al., J. Bioenerg. Biomembr. 36, 353-356.). Oxytherm-анализ позволял определять поглощение кислорода или выполнять измерения динамики в широком

диапазоне вариантов применения, включая дыхание митохондрий и клеток. Для данного эксперимента 60 мкг белка митохондрий совместно инкубировали с соединением LVSe-MR ( $C_{22}H_{44}N_7O_5Se$ ), метилселенаденозином (500 миллиардных долей) или соответствующими эквивалентными концентрациями соответствующих контрольных соединений (LVMR и метилтиоаденозина, соответственно) за 30 минут до инъекции в камеру oxytherm. Митохондриальную активность (измеренную и представленную в виде скорости митохондриального дыхания, наблюдаемой как % изменение в нмоль  $O_2/\text{мин}/\text{мг}$  митохондриального белка) измеряли в присутствии каждого соединения. Как показано на фигуре 40В, селенсодержащий пептид LVSe-MR усиливал состояние III (7,7%), состояние  $V_{\text{FCCP}}$  (13,3%) и состояние  $V_{\text{succ}}$  (9,6%) по сравнению с контролем. Метилселенаденозин ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9) усиливал состояние III (29,9%), состояние  $V_{\text{FCCP}}$  (17,3%) и состояние  $V_{\text{succ}}$  (15,3%) по сравнению с контролем.

Соответственно, в настоящей заявке предложены селенсодержащие соединения

(например, LVSe-MR ( $C_{22}H_{44}N_7O_5Se$ ), метилселенаденозина ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) и других соединений, выявленных выше в примере 1) и композиций, содержащих указанные соединения, с целью их применения при модуляции активности/биоэнергетики митохондрий у субъекта (например, субъекта, нуждающегося в этом (например, субъекта с диабетом 2 типа)).

Данные и информация, полученные в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки, являются уникальными и беспрецедентными результатами. В частности, в настоящей заявке предложены новые композиции и способы лечения (например, профилактического и терапевтического лечения) митохондриальной дисфункции или недостаточности (например, связанных с диабетом (например, диабетом II типа), ожирением, инсулинрезистентностью, диабетической кардиомиопатией и т.д.).

	СОСТОЯНИЕ III		СОСТОЯНИЕ V		СОСТОЯНИЕ $V_{\text{succ}}$	
		% изменение		% изменение		% изменение
КОНТРОЛЬ	<b>432,6</b>		<b>182,1</b>		<b>350,1</b>	
№ 5 <sup>2</sup>	445,9	3,0	187,8	3,2	292,5	-16,4
№ 6 <sup>1</sup>	477,5 <sup>1</sup>	10,3 <sup>1</sup>	220,6 <sup>1</sup>	21,2 <sup>1</sup>	376,4 <sup>1</sup>	7,6 <sup>1</sup>
№ 7 <sup>3</sup>	372,5	-14,0	147,1	-19,2	288,0	-17,7
№ 8 <sup>4</sup>	424,0	-2,1	192,3	5,7	371,0	6,0
№ 9 <sup>1</sup>	507,8 <sup>1</sup>	17,3 <sup>1</sup>	210,3 <sup>1</sup>	15,6 <sup>1</sup>	437,1 <sup>1</sup>	24,9 <sup>1</sup>
№ 10 <sup>3</sup>	352,1	-18,7	112,7	-38,1	254,4	-27,3
№ 25 <sup>3</sup>	419,0	-3,2	136,2	-25,2	309,3	-11,6
№ 28 <sup>2</sup>	451,6	4,3	149,6	-17,8	319,3	-8,8
№ 30 <sup>2</sup>	423,2	-2,3	153,8	-15,5	305,4	-12,7

Положительная тенденция<sup>1</sup>

Положительная/отрицательная тенденция<sup>2</sup>

Отрицательная тенденция<sup>3</sup>

Без изменений<sup>4</sup>

Таблица 7. Влияние селенсодержащих соединений на биоэнергетику митохондрий (митохондрии, выделенные из головного мозга крысы, 5 мкг/лунку).

Еще один неожиданный вывод заключался в том, что хотя некоторые селенсодержащие соединения (например, LVSe-MR ( $C_{22}H_{44}N_7O_5Se$ ) (№6) и метилселенаденозин ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9)) обладали свойствами, усиливающими митохондриальную активность, при инкубировании с митохондриями; эти свойства были не характерны для ряда других выявленных и исследованных селенсодержащих соединений. Например, как показано в таблице 7, три селенсодержащих соединения

(например, LTGSe-MAFR ( $C_{35}H_{59}N_{10}O_9Se$ ) (№7); глутамилселенцистеин ( $C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$ ) (№10); и дрожжи, pH 6,0 (№25) демонстрировали отрицательное воздействие на митохондриальную активность при оценке с помощью прибора Seahorse.

В частности, неожиданный вывод заключался в том, что несколько селенсодержащих соединений, обладающих некоторым сходством в общей структуре, проявляли самые разные результаты по отношению к активации митохондриальной активности.

Например, глутамилселенцистеин ( $C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$ ) (№10) снижал синтез АТФ (состояние III) почти на 19%, несмотря на то, что его общая структура аналогична/не сильно отличается от метилселенаденозина ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9), который увеличивал синтез АТФ на 17,3%; влияние этих двух селенсодержащих соединений, присутствующих в дрожжах, обогащенных селеном, на митохондриальную активность различалось более чем 36% (см. таблицу 7). Соответственно, в некоторых вариантах настоящей заявки предложена композиция, содержащая два или более селенсодержащих соединений (например, водорастворимой фракции дрожжей, обогащенных селеном, нерастворимой в воде фракции дрожжей, обогащенных селеном, селенсодержащего соединения, присутствующего в дрожжах, обогащенных селеном, и/или получаемого из них), объединенных для получения композиции, обладающей желательной, специфической способностью усиливать митохондриальную активность.

#### Пример 8

Выделенные селенсодержащие соединения, присутствующие в дрожжах, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, значительно повышали активность пируватдегидрогеназного ферментного комплекса и митохондриального комплекса I

Эксперименты, выполненные при разработке вариантов реализации настоящей заявки, позволили обнаружить и исследовать характеристики (например, с использованием биоэнергетики митохондрий) селенсодержащих соединений, присутствующих в дрожжах, обогащенных селеном, которые в выделенном состоянии проявляли биологическую активность, которая могла положительно регулировать энергетический метаболизм (например, усиливая дыхание митохондрий и/или продукцию АТФ в митохондриях) (см. примеры 1 и 7). Например, как описано в настоящем документе, оба из селенсодержащих соединений LVSe-MR ( $C_{22}H_{44}N_7O_5Se$ ) (№6) и метилселенаденозина ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9) в концентрации 500 миллиардных долей могли заметно повышать профили биоэнергетики митохондрий.

Так, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнили дополнительные эксперименты с целью дальнейшего исследования способности селенсодержащих соединений, выделенных или полученных из дрожжей, обогащенных селеном, изменять митохондриальную активность. Например, дополнительные эксперименты с использованием метилселенаденозина ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9) описаны ниже.

Для измерения активности пируватдегидрогеназного комплекса (PDHC), а также митохондриального комплекса I выделили митохондрии из коры взрослых SD крыс с использованием градиента фиколла. Метилселенаденозин тестировали в четырех диапазонах концентраций (0, 50, 500 и 1000 миллиардных долей). Все анализы выполняли в трех повторностях с совместным инкубированием отдельных соединений с митохондриями (60 мкг митохондриального белка/лунку) в 100-мкл системе анализа с использованием стандартных методик и 96-луночного флуоресцентного планшет-ридера.

Активность ферментов митохондрий в присутствии 0, 50, 500 и 1000 миллиардных долей (PPB) метилселенаденозина ( $C_{11}H_{15}N_5O_3Se$ ) (№9) или контрольного соединения метилтиоаденозина (№31) показана на фигуре 41. Соединение №9 (0-1000 миллиардных долей) значительно повышало активность фермента PDHC на ~30-57% по сравнению с активностью фермента, не являющегося PDHC, в отсутствие метилселенаденозина, в зависимости от концентрации ( $p<0,05$  при концентрации 1000 миллиардных долей). В присутствии протестированных концентраций изменений в ферментативной активности комплекса IV не обнаружили. Метилтиоаденозин не изменял активность PDHC, комплекса I или комплекса IV.

Данные эксперименты документально показали, что метилселенаденозин повышал активность митохондриального комплекса I и PDHC. Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложена композиция (например, фармацевтическая композиция), содержащая селенсодержащее соединение (например, выявленное в примере 1). В некоторых вариантах реализации настоящей заявки предложен способ повышения активности фермента PDHC и/или повышения активности митохондриального комплекса I у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом (например, субъекту с диабетом II типа), эффективного количества композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей селенсодержащее соединение (например, описанное в примере 1), повышающее активность митохондриального комплекса I и/или PDHC (например, тем самым усиливая митохондриальное дыхание у субъекта (например, в скелетных мышцах и/или печени)).

#### Пример 9

Выделенные селенсодержащие соединения, присутствующие в дрожжах, обогащенных селеном, содержащих 2% или менее неорганического селена, значительно повышали активность антиоксидантный потенциал и митохондриальную активность

Эксперименты, выполненные при разработке вариантов реализации настоящей заявки, позволили обнаружить, что некоторые выделенные селенсодержащие соединения, присутствующие в дрожжах, обогащенных селеном, или полученные из них, усиливали митохондриальную активность (например, усиливая продукцию АТФ, активность митохондриального комплекса I и/или PDHC) (см. примеры 1, 6-8). Так, выполнили дополнительные эксперименты с целью дальнейшего исследования характеристик селенсодержащих соединений, описанных в настоящем документе (например, с целью выявления биологической активности (при ее наличии) соединений (например, стимулирующей активности, ингибиторной активности, синергетической активности, антагонистической активности и т.д. (например, с целью выявления селенсодержащих соединений, демонстрирующих желательное влияние на митохондриальную активность))).

В связи с тем, что несколько селенсодержащих композиций согласно настоящей заявке проявляли возможность повышения активности митохондриального комплекса I, были выполнены эксперименты с целью определения возможности стимуляции митохондрий за счет удаления вредных активных форм кислорода (АФК) селенсодержащими соединениями. Таким образом, в ходе разработки вариантов реализации настоящей заявки выполнены эксперименты с целью оценки антиоксидантного потенциала селенсодержащих соединений.

Таким образом, набор для анализа антиоксидантной активности (способности поглощать кислородные радикалы (ORAC) использовали для выявления селенсодержащих соединений согласно настоящей заявке, обладавших/проявлявших антиоксидантные свойства. В использованном наборе для анализа ORAC (BioTek, штат

Вермонт, США) антиоксидантные свойства тролокса являлись стандартом, с которым сравнивали антиоксидантную емкость ряда веществ. Таким образом, результаты анализа ORAC часто называют эквивалентами тролокса (TE), рассчитанными путем сравнения результатов с калибровочной кривой тролокса. При выполненных анализах в качестве 5 внутреннего стандарта использовали кверцетин (известный мощный антиоксидант).

Вкратце, образцы селенсодержащих соединений (например, выявленных в примере 1) анализировали с использованием набора для анализа тролокса согласно инструкциям производителя. Соединения тестирували по отдельности или в комбинации (в 10 концентрациях от 0,05 до 5 мк) для оценки потенциальной синергии, антагонизма или чисто аддитивных эффектов. Типичные результаты показаны в Таблице 8.

Соединение	Значение TE	TE кверцетина	Теоретический аддитивный эффект	Отношение синергии эксп/теор
№ 3 L-метилселенцистеин	1,075	6,451	4,014	1,72
№ 26 Селенаденозилгомоцистеин	2,939			
№ 3 + № 26	6,899			
№ 9 Метилселенаденозин	0,722	3,87	1,95	1,2
№ 4 Селенметионин	1,228			
№ 9 + № 4	2,332			

25

30

№ 26 Селенаденозилгомоцистеин	2,012	3,222	2,961	-1,14
№ 39 Гамма-глутамилметилцистеин	0,949			
№ 26 + № 39	2,592			

Таблица 8: Антиоксидантная активность различных селенсодержащих соединений.

Как показывают данные, приведенные в таблице 8, обнаружено, что некоторые из селенсодержащих соединений проявляют/обладают антиоксидантной емкостью 40 (например, положительным значением TE). Кроме того, некоторые из селенсодержащих соединений обладают/проявляют антиоксидантной емкостью, которая является аддитивной или слегка синергетической (например, №9 и №4 в комбинации); слегка антагонистической (№26 и №39 в комбинации) или синергетической (№3 и №26 в комбинации) (например, с точки зрения способности к удалению кислородных 45 радикалов). В случае комбинации соединений №3 и №26 увеличение было приблизительно на 70% большим, чем влияние этих соединений при чисто аддитивном эффекте.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящий

документ посредством ссылок. Для специалистов в данной области техники должны быть очевидны различные модификации и изменения описанных способов и композиций согласно настоящей заявке без отступления от сущности настоящей заявки. Хотя настоящая заявка описана в связи с конкретными предпочтительными вариантами 5 реализации, следует понимать, что настоящую заявку не следует необоснованно ограничивать такими конкретными вариантами реализации. Фактически следует считать, что различные модификации описанных режимов для осуществления настоящей заявки, очевидные для специалистов в соответствующих областях техники, находятся в рамках следующей формулы изобретения.

10

(57) Формула изобретения

1. Способ усиления функции митохондрий в клетке субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей выделенный 5'-метилселенаденозин, селенаденозилгомоцистеин, лейцин-валин-селенметионин-аргинин 15 или их комбинации, причем эффективное количество усиливает функцию митохондрий в клетке по сравнению с клеткой, не подвергаемой воздействию композиции, причем указанную композицию вводят в дозе, обеспечивающей получение субъектом от 25 до 800 мкг селена в день.

15

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что композиция находится в высушенной 20 форме или в форме капсул.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что композицию вводят перорально.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что композиция содержит носитель.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит эффективное количество выделенного соединения, выбранного из группы, состоящей 25 из селен-(гидрокси)-сelenофен-(3'-дезоксиаденозина), N-ацетилцистеинсelenогомоцистеина, аллилселенаденозилгомоцистеина, селенгидроксиаденозилгомоцистеина, селенаденозина, селенаденозил-Se-(метил)-сelenоксида, adenозилгидроксисelenоксида, этилселенаденозина, селен-(гидрокси)-сelenофен-(3'-дезоксиаденозина), adenозилгидроксисelenоксида, селенаденозил-Se-(метил)-сelenоксида и их комбинаций.

30

6. Композиция для применения для усиления функции митохондрий в клетке субъекта, причем композиция содержит эффективное количество выделенного соединения, выбранного из группы, состоящей из 5'-метилселенаденозина, селенаденозилгомоцистеина, лейцин-валин-селенметионин-аргинина и их комбинаций.

35

7. Композиция по п. 6, отличающаяся тем, что композиция содержит выделенное соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-метилселенаденозина, селенаденозилгомоцистеина и их комбинаций.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную композицию вводят в дозе, обеспечивающей получение субъектом от 200 до 500 мкг селена в день.

40

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная композиция представлена в форме порошка, таблетки, пилюли, капсулы, геля, сиропа, раствора, саше, драже или супензии.

45

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

&lt;110&gt; Alltech, Inc.

&lt;120&gt; СЕЛЕНОСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ИЛИ СОСТОЯНИЙ, СВЯЗАННЫХ С МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ

&lt;130&gt; 00076.0008wou1

<140> PCT/US2014/029328  
<141> 14.03.2014<150> US 61/788 133  
<151> 15.03.2013

&lt;160&gt; 46

&lt;170&gt; Версия PatentIn 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 1

Met Val Ala Glu Ala Glu Lys  
1 5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 2

Asp Tyr Met Gly Ala Ala Lys  
1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 3

Tyr Met Gly Ala Ala Lys  
1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 4

Glu Leu Gln Asp Ile Ala Asn Pro Ile Met Ser Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 5

Asn Gln Ala Ala Met Asn Pro Ser Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 6

Asn Phe Thr Pro Glu Gln Ile Ser Ser Met Val Leu Gly Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 7

Met Val Ser Glu Ala Glu Lys  
1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 8

Pro Glu Val Gln Gly Asp Met Lys  
1 5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 9

Glu Leu Gln Asp Ile Ala Asn Pro Ile Met Ser Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 10

Ala Met Ser Ser Arg  
1 5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Дрожжи

&lt;400&gt; 11

Val Gln Gly Ser Val Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Ala  
 1 5 10 15

Val Ala Ile Met Glu Gly Lys  
 20

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи  
 <400> 12

Ala Ala Ala Glu Gly Pro Met Lys  
 1 5

<210> 13  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи  
 <400> 13

Leu Thr Gly Met Ala Phe Arg  
 1 5

<210> 14  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи  
 <400> 14

Pro Phe Val Ser Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Val Lys  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи  
 <400> 15

Ala Phe Gly Ile Glu Glu Gly Leu Met Thr Thr Val His Ser Leu Thr  
 1 5 10 15

Ala Thr Gln Lys  
 20

<210> 16  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи  
 <400> 16

Pro Phe Ile Thr Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys  
 1 5 10

<210> 17

<211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи

<400> 17

Pro Gly Met Val Val Thr Phe Ala Pro Ala Gly Val Thr Thr Glu Val  
 1 5 10 15

Lys

<210> 18  
 <211> 24  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи

<400> 18

Val Glu Thr Gly Val Ile Lys Pro Gly Met Val Val Thr Phe Ala Pro  
 1 5 10 15

Ala Gly Val Thr Thr Glu Val Lys  
 20

<210> 19  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи

<400> 19

Ala Ala Ala Thr Ala Ala Met Thr Lys  
 1 5

<210> 20  
 <211> 18  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи

<400> 20

Ser Ile Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Val His Glu Ala Leu Glu  
 1 5 10 15

Met Arg

<210> 21  
 <211> 4  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Дрожжи

<400> 21

Trp Met Gly Lys  
 1

<210> 22  
 <211> 18

<212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 22

Ser Ile Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Val His Glu Ala Leu Glu  
 1 5 10 15

Met Arg

<210> 23  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 23

Ala Met Pro Gln Lys  
 1 5

<210> 24  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 24

Ala Ala Met Ala Lys  
 1 5

<210> 25  
 <211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 25

His Val Gly Asp Met Glu Ile Arg  
 1 5

<210> 26  
 <211> 13  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 26

Val Ile Glu Glu Pro Ile Thr Ser Glu Thr Ala Met Lys  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 27

Val Leu Gln Ala Leu Glu Glu Ile Gly Ile Val Glu Ile Ser Pro Lys  
 1 5 10 15

<210> 28  
 <211> 15  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 28

Leu Pro Ala Ala Ser Leu Gly Asp Met Val Met Ala Thr Val Lys  
 1 5 10 15

<210> 29  
 <211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 29

Ala Gly Met Thr Thr Ile Val Arg  
 1 5

<210> 30  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 30

Met Leu Met Pro Lys  
 1 5

<210> 31  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 31

Thr Met Gly Ala Lys  
 1 5

<210> 32  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 32

Met Asn Ala Gly Arg  
 1 5

<210> 33  
 <211> 6  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 33

Thr Tyr Glu Asn Met Lys  
 1 5

<210> 34  
 <211> 9

<212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 34

Met Gly His Asp Gln Ser Gly Thr Lys  
 1 5

<210> 35

<211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 35

Gly Glu Ala Ile Met Ala Pro Lys  
 1 5

<210> 36

<211> 6  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 36

Met Asn Val Phe Gly Lys  
 1 5

<210> 37

<211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 37

Ala Met Glu Val Val Ala Ser Glu Arg  
 1 5

<210> 38

<211> 4  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 38

Ile Val Met Arg  
 1

<210> 39

<211> 4  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<220>

<221> ПРОЧЕЕ  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X=I или L

<400> 39

Met Ala Xaa Arg  
 1

<210> 40  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<220>  
 <221> ПРОЧЕЕ  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X должен представлять собой любую аминокислоту

<400> 40

Ala Met Xaa Ala Lys  
 1 5

<210> 41  
 <211> 10  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 41

Asp Leu Glu Thr Leu Thr Met His Thr Lys  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 4  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 42

Leu Val Met Arg  
 1

<210> 43  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 43

Leu Thr Gly Met Ala Phe Arg  
 1 5

<210> 44  
 <211> 25  
 <212> БЕЛОК  
 <213> дрожжи

<400> 44

Ser Arg Pro Asn Val Glu Val Val Ala Leu Asn Asp Pro Phe Ile Thr  
 1 5 10 15

Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys  
 20 25

<210> 45

<211> 24  
<212> БЕЛОК  
<213> дрожжи

<400> 45

Val Ile Asn Asp Ala Phe Gly Ile Glu Glu Gly Leu Met Thr Thr Val  
1 5 10 15

His Ser Leu Thr Ala Thr Gln Lys  
20

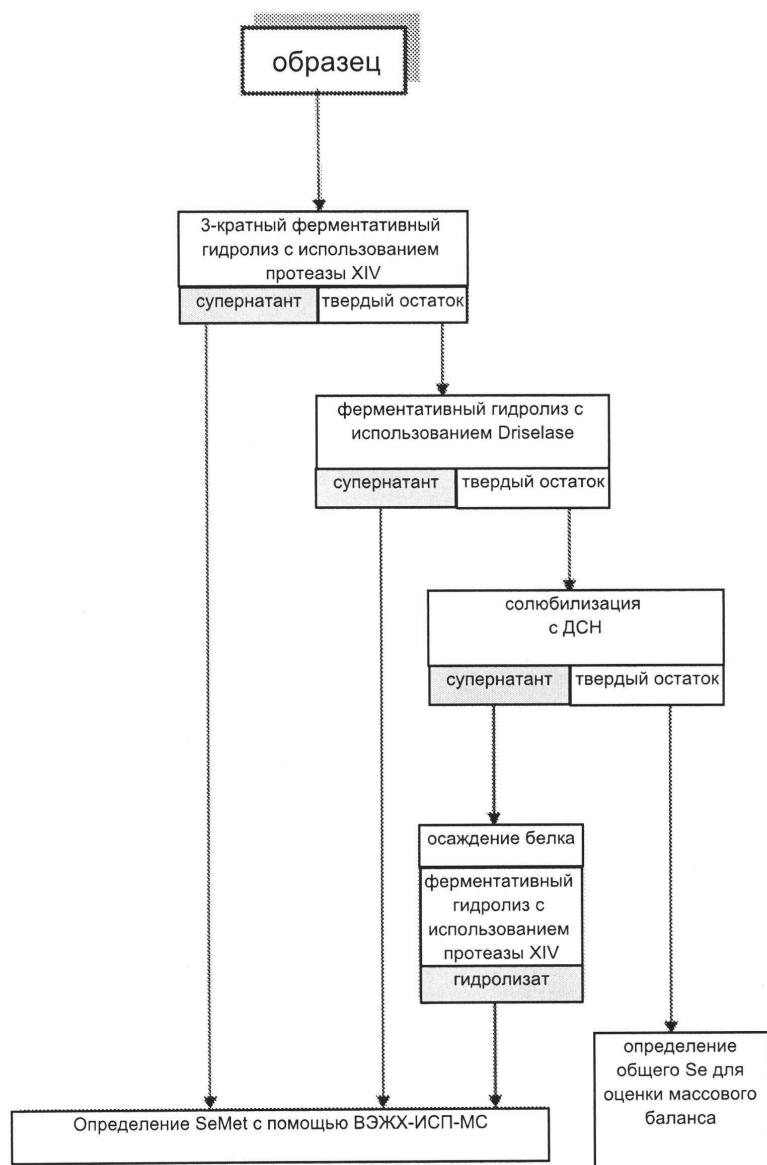
<210> 46

<211> 4  
<212> БЕЛОК  
<213> дрожжи

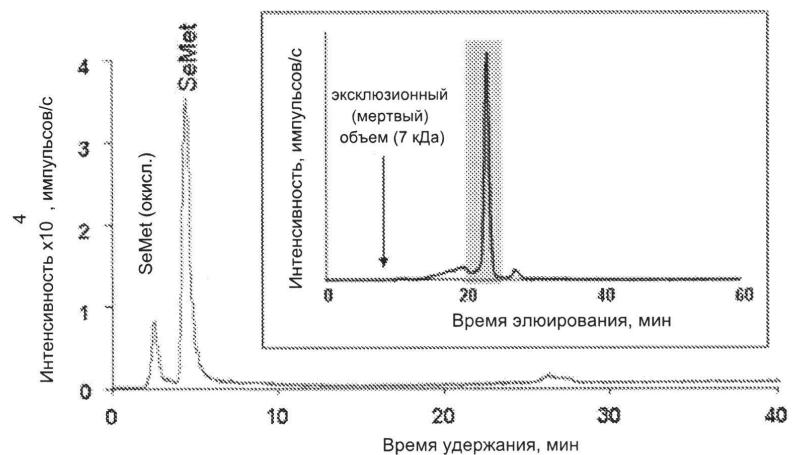
<400> 46

Met Arg Phe Ala  
1

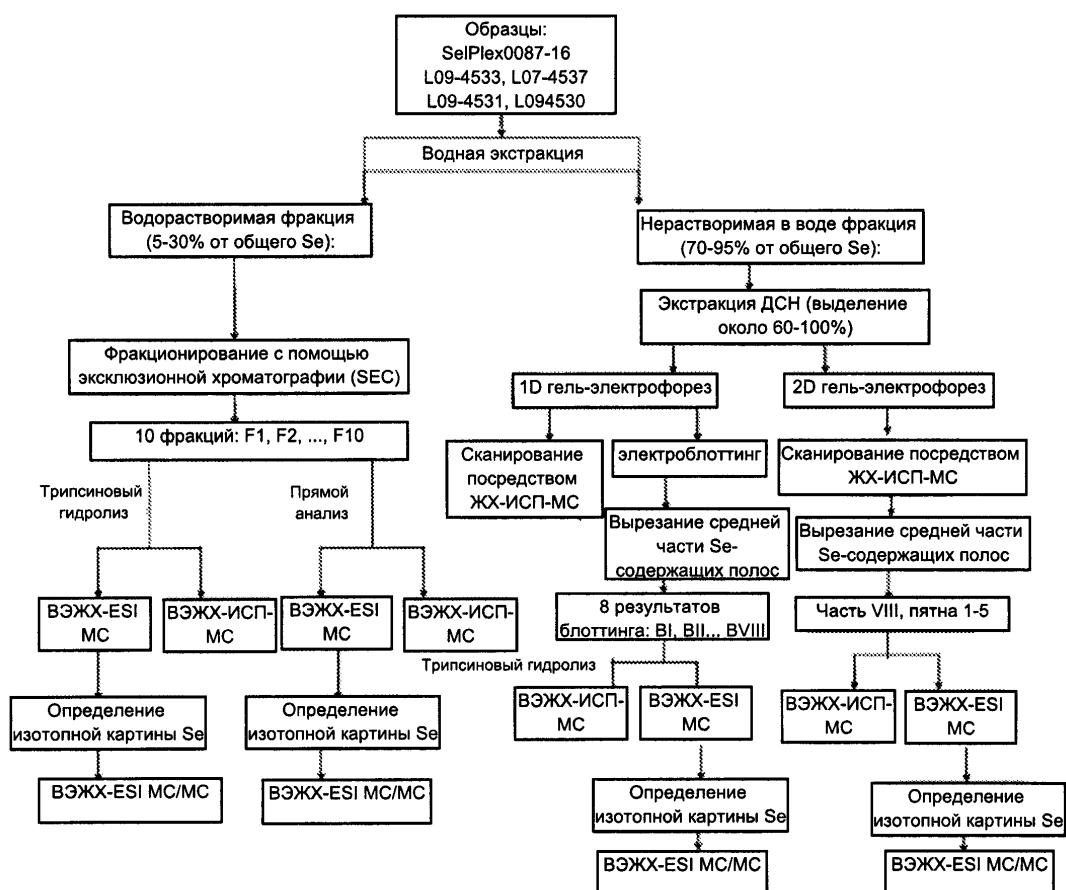
ФИГУРА 1



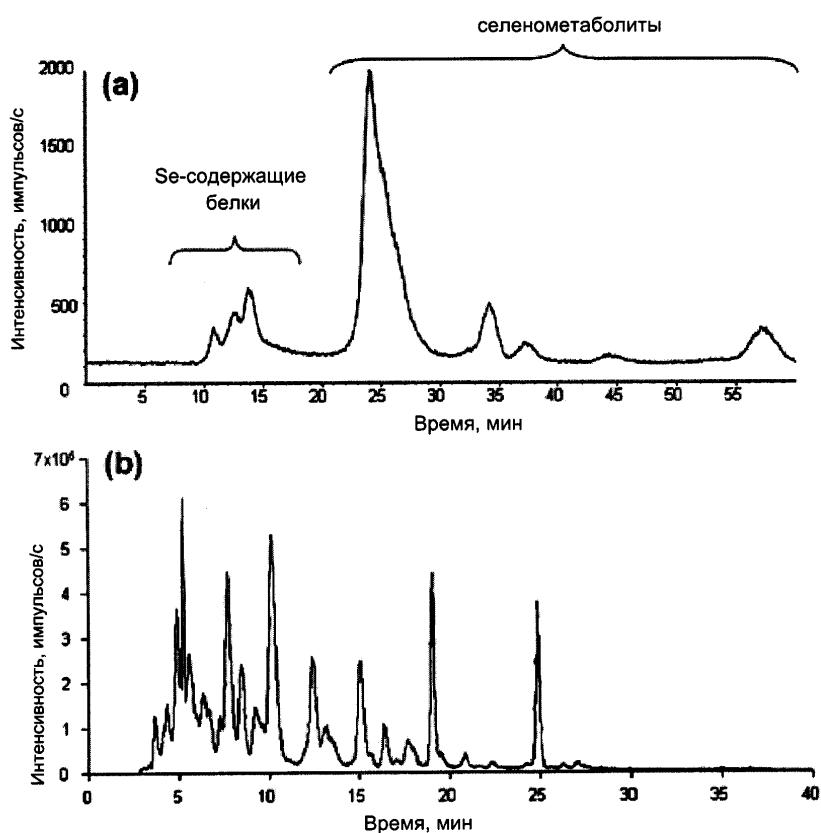
ФИГУРА 2



## ФИГУРА 3

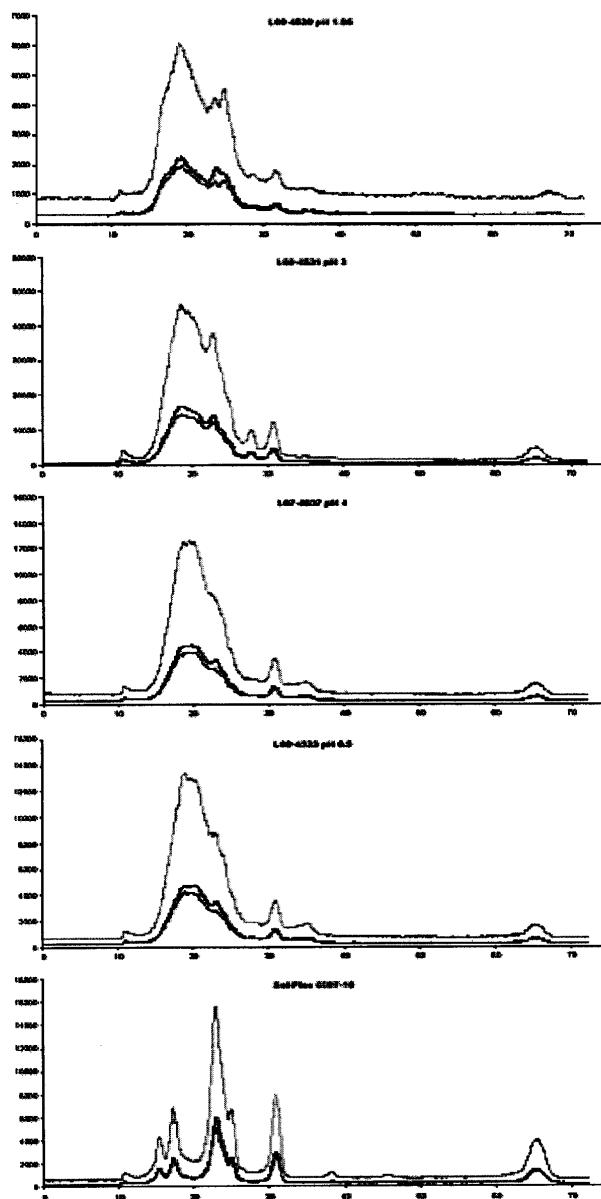


ФИГУРА 4



5/53

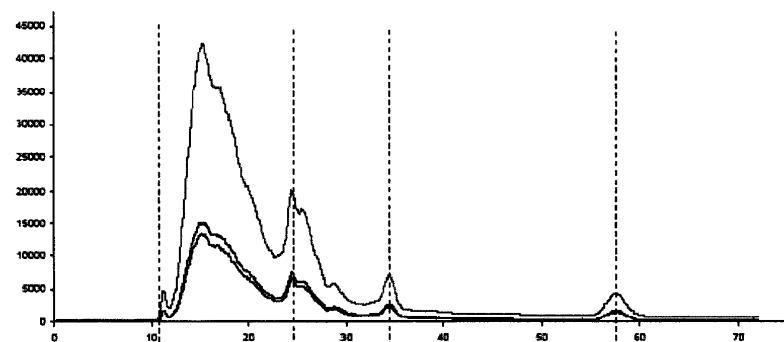
ФИГУРА 5



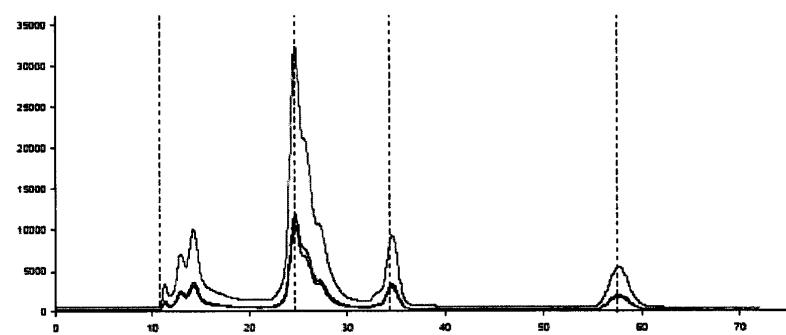
6/53

ФИГУРА 6

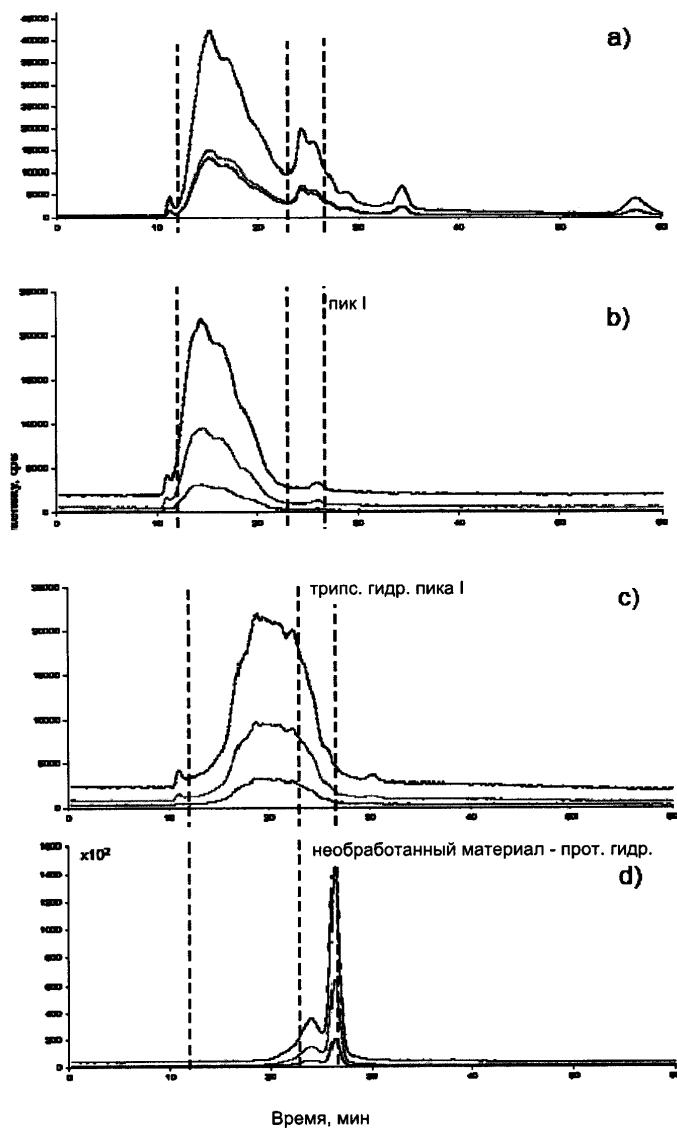
A



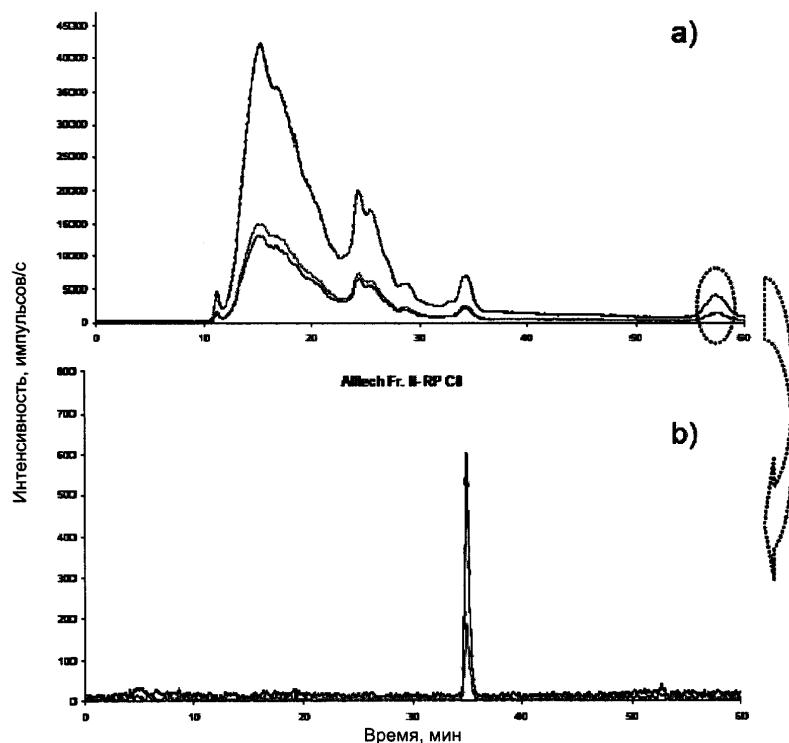
B



ФИГУРА 7



ФИГУРА 8

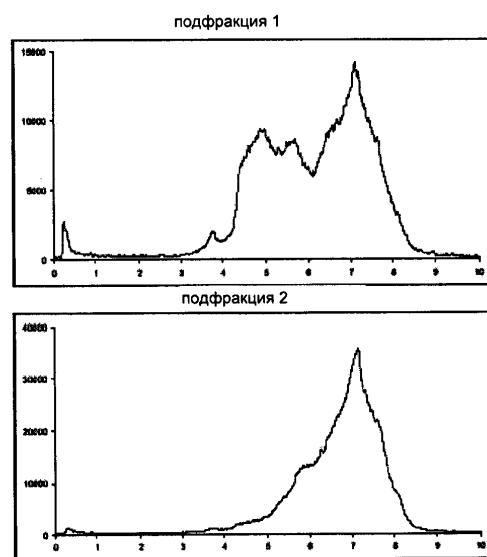


## ФИГУРА 9

Эксперимен- тальная масса	Теоретическая масса	Формула	Название	МС-спектр	Структура
346.04025	346.04129	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Se	Se-метил-Se-аденозин	<img alt="Mass spectrum of Se-methyl-Se-adenosine. The x-axis represents mass-to-charge ratio (m/z) and the y-axis represents relative abundance. The base peak is at m/z 346. Other significant peaks are at m/z 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410, 412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 562, 564, 566, 568, 570, 572, 574, 576, 578, 580, 582, 584, 586, 588, 590, 592, 594, 596, 598, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 736, 738, 740, 742, 744, 746, 748, 750, 752, 754, 756, 758, 760, 762, 764, 766, 768, 770, 772, 774, 776, 778, 780, 782, 784, 786, 788, 790, 792, 794, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 824, 826, 828, 830, 832, 834, 836, 838, 840, 842, 844, 846, 848, 850, 852, 854, 856, 858, 860, 862, 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, 1086, 1088, 1090, 1092, 1094, 1096, 1098, 1100, 1102, 1104, 1106, 1108, 1110, 1112, 1114, 1116, 1118, 1120, 1122, 1124, 1126, 1128, 1130, 1132, 1134, 1136, 1138, 1140, 1142, 1144, 1146, 1148, 1150, 1152, 1154, 1156, 1158, 1160, 1162, 1164, 1166, 1168, 1170, 1172, 1174, 1176, 1178, 1180, 1182, 1184, 1186, 1188, 1190, 1192, 1194, 1196, 1198, 1200, 1202, 1204, 1206, 1208, 1210, 1212, 1214, 1216, 1218, 1220, 1222, 1224, 1226, 1228, 1230, 1232, 1234, 1236, 1238, 1240, 1242, 1244, 1246, 1248, 1250, 1252, 1254, 1256, 1258, 1260, 1262, 1264, 1266, 1268, 1270, 1272, 1274, 1276, 1278, 1280, 1282, 1284, 1286, 1288, 1290, 1292, 1294, 1296, 1298, 1300, 1302, 1304, 1306, 1308, 1310, 1312, 1314, 1316, 1318, 1320, 1322, 1324, 1326, 1328, 1330, 1332, 1334, 1336, 1338, 1340, 1342, 1344, 1346, 1348, 1350, 1352, 1354, 1356, 1358, 1360, 1362, 1364, 1366, 1368, 1370, 1372, 1374, 1376, 1378, 1380, 1382, 1384, 1386, 1388, 1390, 1392, 1394, 1396, 1398, 1400, 1402, 1404, 1406, 1408, 1410, 1412, 1414, 1416, 1418, 1420, 1422, 1424, 1426, 1428, 1430, 1432, 1434, 1436, 1438, 1440, 1442, 1444, 1446, 1448, 1450, 1452, 1454, 1456, 1458, 1460, 1462, 1464, 1466, 1468, 1470, 1472, 1474, 1476, 1478, 1480, 1482, 1484, 1486, 1488, 1490, 1492, 1494, 1496, 1498, 1500, 1502, 1504, 1506, 1508, 1510, 1512, 1514, 1516, 1518, 1520, 1522, 1524, 1526, 1528, 1530, 1532, 1534, 1536, 1538, 1540, 1542, 1544, 1546, 1548, 1550, 1552, 1554, 1556, 1558, 1560, 1562, 1564, 1566, 1568, 1570, 1572, 1574, 1576, 1578, 1580, 1582, 1584, 1586, 1588, 1590, 1592, 1594, 1596, 1598, 1600, 1602, 1604, 1606, 1608, 1610, 1612, 1614, 1616, 1618, 1620, 1622, 1624, 1626, 1628, 1630, 1632, 1634, 1636, 1638, 1640, 1642, 1644, 1646, 1648, 1650, 1652, 1654, 1656, 1658, 1660, 1662, 1664, 1666, 1668, 1670, 1672, 1674, 1676, 1678, 1680, 1682, 1684, 1686, 1688, 1690, 1692, 1694, 1696, 1698, 1700, 1702, 1704, 1706, 1708, 1710, 1712, 1714, 1716, 1718, 1720, 1722, 1724, 1726, 1728, 1730, 1732, 1734, 1736, 1738, 1740, 1742, 1744, 1746, 1748, 1750, 1752, 1754, 1756, 1758, 1760, 1762, 1764, 1766, 1768, 1770, 1772, 1774, 1776, 1778, 1780, 1782, 1784, 1786, 1788, 1790, 1792, 1794, 1796, 1798, 1800, 1802, 1804, 1806, 1808, 1810, 1812, 1814, 1816, 1818, 1820, 1822, 1824, 1826, 1828, 1830, 1832, 1834, 1836, 1838, 1840, 1842, 1844, 1846, 1848, 1850, 1852, 1854, 1856, 1858, 1860, 1862, 1864, 1866, 1868, 1870, 1872, 1874, 1876, 1878, 1880, 1882, 1884, 1886, 1888, 1890, 1892, 1894, 1896, 1898, 1900, 1902, 1904, 1906, 1908, 1910, 1912, 1914, 1916, 1918, 1920, 1922, 1924, 1926, 1928, 1930, 1932, 1934, 1936, 1938, 1940, 1942, 1944, 1946, 1948, 1950, 1952, 1954, 1956, 1958, 1960, 1962, 1964, 1966, 1968, 1970, 1972, 1974, 1976, 1978, 1980, 1982, 1984, 1986, 1988, 1990, 1992, 1994, 1996, 1998, 2000, 2002, 2004, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014, 2016, 2018, 2020, 2022, 2024, 2026, 2028, 2030, 2032, 2034, 2036, 2038, 2040, 2042, 2044, 2046, 2048, 2050, 2052, 2054, 2056, 2058, 2060, 2062, 2064, 2066, 2068, 2070, 2072, 2074, 2076, 2078, 2080, 2082, 2084, 2086, 2088, 2090, 2092, 2094, 2096, 2098, 2100, 2102, 2104, 2106, 2108, 2110, 2112, 2114, 2116, 2118, 2120, 2122, 2124, 2126, 2128, 2130, 2132, 2134, 2136, 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2184, 2186, 2188, 2190, 2192, 2194, 2196, 2198, 2200, 2202, 2204, 2206, 2208, 2210, 2212, 2214, 2216, 2218, 2220, 2222, 2224, 2226, 2228, 2230, 2232, 2234, 2236, 2238, 2240, 2242, 2244, 2246, 2248, 2250, 2252, 2254, 2256, 2258, 2260, 2262, 2264, 2266, 2268, 2270, 2272, 2274, 2276, 2278, 2280, 2282, 2284, 2286, 2288, 2290, 2292, 2294, 2296, 2298, 2300, 2302, 2304, 2306, 2308, 2310, 2312, 2314, 2316, 2318, 2320, 2322, 2324, 2326, 2328, 2330, 2332, 2334, 2336, 2338, 2340, 2342, 2344, 2346, 2348, 2350, 2352, 2354, 2356, 2358, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2498, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540, 2542, 2544, 2546, 2548, 2550, 2552, 2554, 2556, 2558, 2560, 2562, 2564, 2566, 2568, 2570, 2572, 2574, 2576, 2578, 2580, 2582, 2584, 2586, 2588, 2590, 2592, 2594, 2596, 2598, 2600, 2602, 2604, 2606, 2608, 2610, 2612, 2614, 2616, 2618, 2620, 2622, 2624, 2626, 2628, 2630, 2632, 2634, 2636, 2638, 2640, 2642, 2644, 2646, 2648, 2650, 2652, 2654, 2656, 2658, 2660, 2662, 2664, 2666, 2668, 2670, 2672, 2674, 2676, 2678, 2680, 2682, 2684, 2686, 2688, 2690, 2692, 2694, 2696, 2698, 2700, 2702, 2704, 2706, 2708, 2710, 2712, 2714, 2716, 2718, 2720, 2722, 2724, 2726, 2728, 2730, 2732, 2734, 2736, 2738, 2740, 2742, 2744, 2746, 2748, 2750, 2752, 2754, 2756, 2758, 2760, 2762, 2764, 2766, 2768, 2770, 2772, 2774, 2776, 2778, 2780, 2782, 2784, 2786, 2788, 2790, 2792, 2794, 2796, 2798, 2800, 2802, 2804, 2806, 2808, 2810, 2812, 2814, 2816, 2818, 2820, 2822, 2824, 2826, 2828, 2830, 2832, 2834, 2836, 2838, 2840, 2842, 2844, 2846, 2848, 2850, 2852, 2854, 2856, 2858, 2860, 2862, 2864, 2866, 2868, 2870, 2872, 2874, 2876, 2878, 2880, 2882, 2884, 2886, 2888, 2890, 2892, 2894, 2896, 2898, 2900, 2902, 2904, 2906, 2908, 2910, 2912, 2914, 2916, 2918, 2920, 2922, 2924, 2926, 2928, 2930, 2932, 2934, 2936, 2938, 2940, 2942, 2944, 2946, 2948, 2950, 2952, 2954, 2956, 2958, 2960, 2962, 2964, 2966, 2968, 2970, 2972, 2974, 2976, 2978, 2980, 2982, 2984, 2986, 2988, 2990, 2992, 2994, 2996, 2998, 3000, 3002, 3004, 3006, 3008, 3010, 3012, 3014, 3016, 3018, 3020, 3022, 3024, 3026, 3028, 3030, 3032, 3034, 3036, 3038, 3040, 3042, 3044, 3046, 3048, 3050, 3052, 3054, 3056, 3058, 3060, 3062, 3064, 3066, 3068, 3070, 3072, 3074, 3076, 3078, 3080, 3082, 3084, 3086, 3088, 3090, 3092, 3094, 3096, 3098, 3100, 3102, 3104, 3106, 3108, 3110, 3112, 3114, 3116, 3118, 3120, 3122, 3124, 3126, 3128, 3130, 3132, 3134, 3136, 3138, 3140, 3142, 3144, 3146, 3148, 3150, 3152, 3154, 3156, 3158, 3160, 3162, 3164, 3166, 3168, 3170, 3172, 3174, 3176, 3178, 3180, 3182, 3184, 3186, 3188, 3190, 3192, 3194, 3196, 3198, 3200, 3202, 3204, 3206, 3208, 3210, 3212, 3214, 3216, 3218, 3220, 3222, 3224, 3226, 3228, 3230, 3232, 3234, 3236, 3238, 3240, 3242, 3244, 3246, 3248, 3250, 3252, 3254, 3256, 3258, 3260, 3262, 3264, 3266, 3268, 3270, 3272, 3274, 3276, 3278, 3280, 3282, 3284, 3286, 3288, 3290, 3292, 3294, 3296, 3298, 3300, 3302, 3304, 3306, 3308, 3310, 3312, 3314, 3316, 3318, 3320, 3322, 3324, 3326, 3328, 3330, 3332, 3334, 3336, 3338, 3340, 3342, 3344, 3346, 3348, 3350, 3352, 3354, 3356, 3358, 3360, 3362, 3364, 3366, 3368, 3370, 3372, 3374, 3376, 3378, 3380, 3382, 3384, 3386, 3388, 3390, 3392, 3394, 3396, 3398, 3400, 3402, 3404, 3406, 3408, 3410, 3412, 3414, 3416, 3418, 3420, 3422, 3424, 3426, 3428, 3430, 3432, 3434, 3436, 3438, 3440, 3442, 3444, 3446, 3448, 3450, 3452, 3454, 3456, 3458, 3460, 3462, 3464, 3466, 3468, 3470, 3472, 3474, 3476, 3478, 3480, 3482, 3484, 3486, 3488, 3490, 3492, 3494, 3496, 3498, 3500, 3502, 3504, 3506, 3508, 3510, 3512, 3514, 3516, 3518, 3520, 3522, 3524, 3526, 3528, 3530, 3532, 3534, 3536, 3538, 3540, 3542, 3544, 3546, 3548, 3550, 3552, 3554, 3556, 3558, 3560, 3562, 3564, 3566, 3568, 3570, 3572, 3574, 3576, 3578, 3580, 3582, 3584, 3586, 3588, 3590, 3592, 3594, 3596, 3598, 3600, 3602, 3604, 3606, 3608, 3610, 3612, 3614, 3616, 3618, 3620, 3622, 3624, 3626, 3628, 3630, 3632, 3634, 3636, 3638, 3640, 3642, 3644, 3646, 3648, 3650, 3652, 3654, 3656, 3658, 3660, 3662, 3664, 3666, 3668, 3670, 3672, 3674, 3676, 3678, 3680, 3682, 3684, 3686, 3688, 3690, 3692, 3694, 3696, 3698, 3700, 3702, 3704, 3706, 3708, 3710, 3712, 3714, 3716, 3718, 3720, 3722, 3724, 3726, 3728, 3730, 3732, 3734, 3736, 3738, 3740, 3742, 3744, 3746, 3748, 3750, 3752, 3754, 3756, 3758, 3760, 3762, 3764, 3766, 3768, 3770, 3772, 3774, 3776, 3778, 3780, 3782, 3784, 3786, 3788, 3790, 3792, 3794, 3796, 3798, 3800, 3802, 3804, 3806, 3808, 3810, 3812, 3814, 3816, 3818, 3820, 3822, 3824, 3826, 3828, 3830, 3832, 3834, 3836, 3838, 3840, 3842, 3844, 3846, 3848, 3850, 3852, 3854, 3856, 3858, 3860, 3862, 3864, 3866, 3868, 3870, 3872, 3874, 3876, 3878, 3880, 3882, 3884, 3886, 3888, 3890, 3892, 3894, 3896, 3898, 3900, 3902, 3904, 3906, 3908, 3910, 3912, 3914, 3916, 3918, 3920, 3922, 3924, 3926, 3928, 3930, 3932, 3934, 3936, 3938, 3940, 3942, 3944, 3946, 3948, 3950, 3952, 3954, 3956, 3958, 3960, 3962, 3964, 3966, 3968, 3970, 3972, 3974, 3976, 3978, 3980, 3982, 3984, 3986, 3988, 3990,	

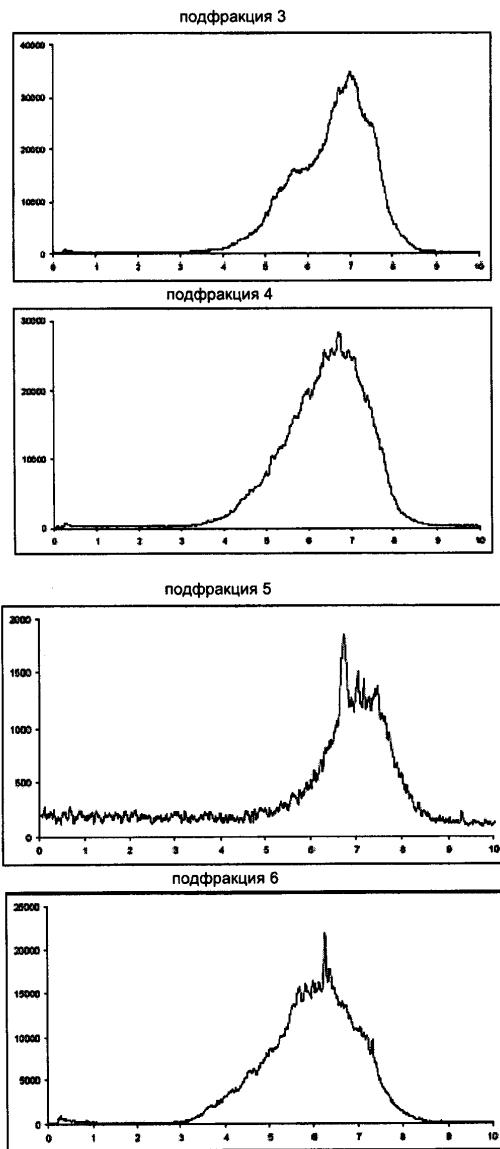
10/53

ФИГУРА 10



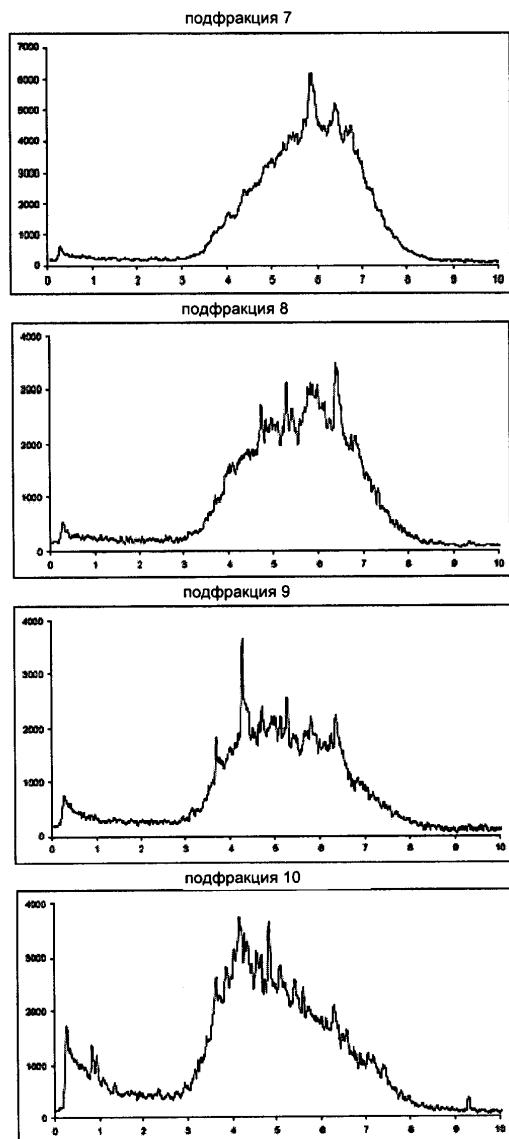
11/53

ФИГУРА 10 продолжение



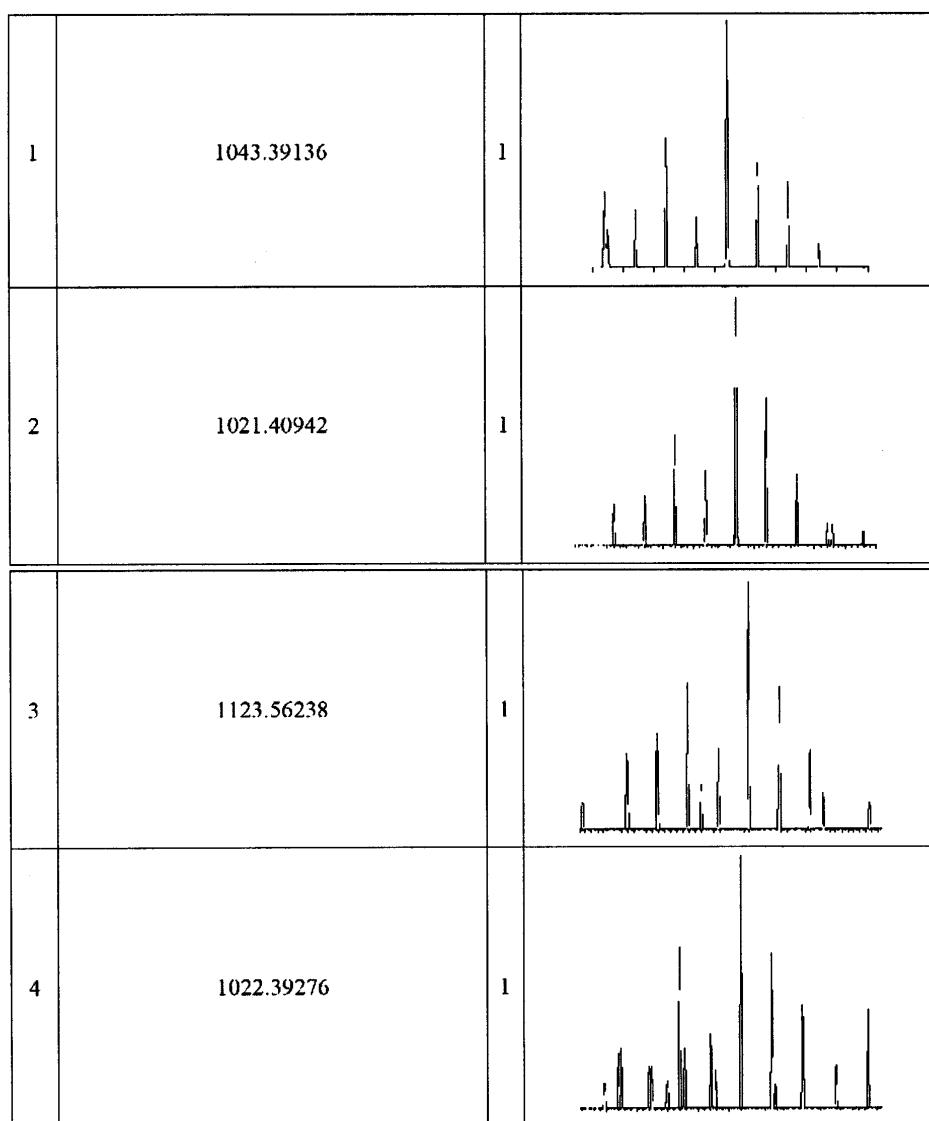
12/53

## ФИГУРА 10 продолжение



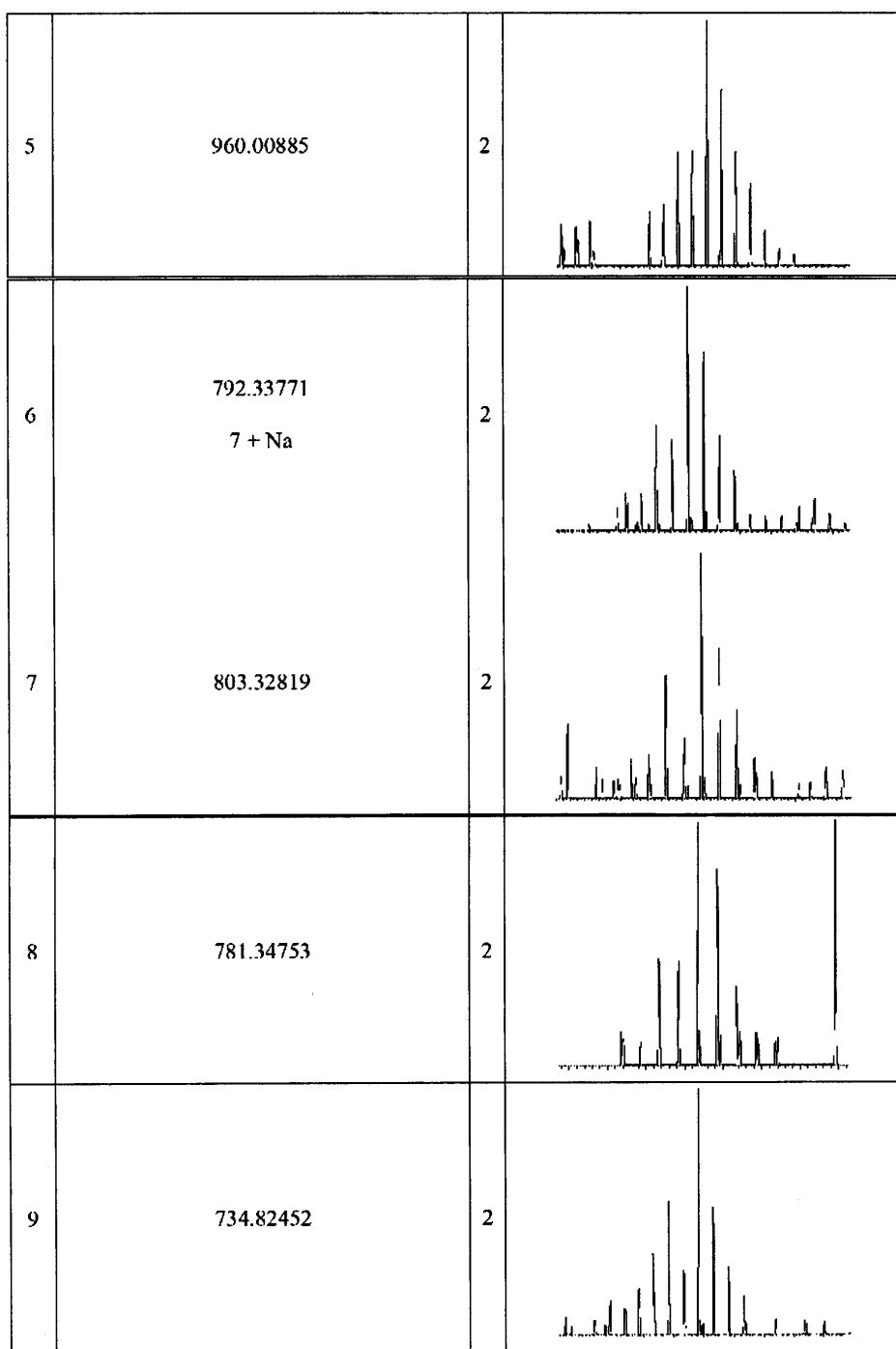
13/53

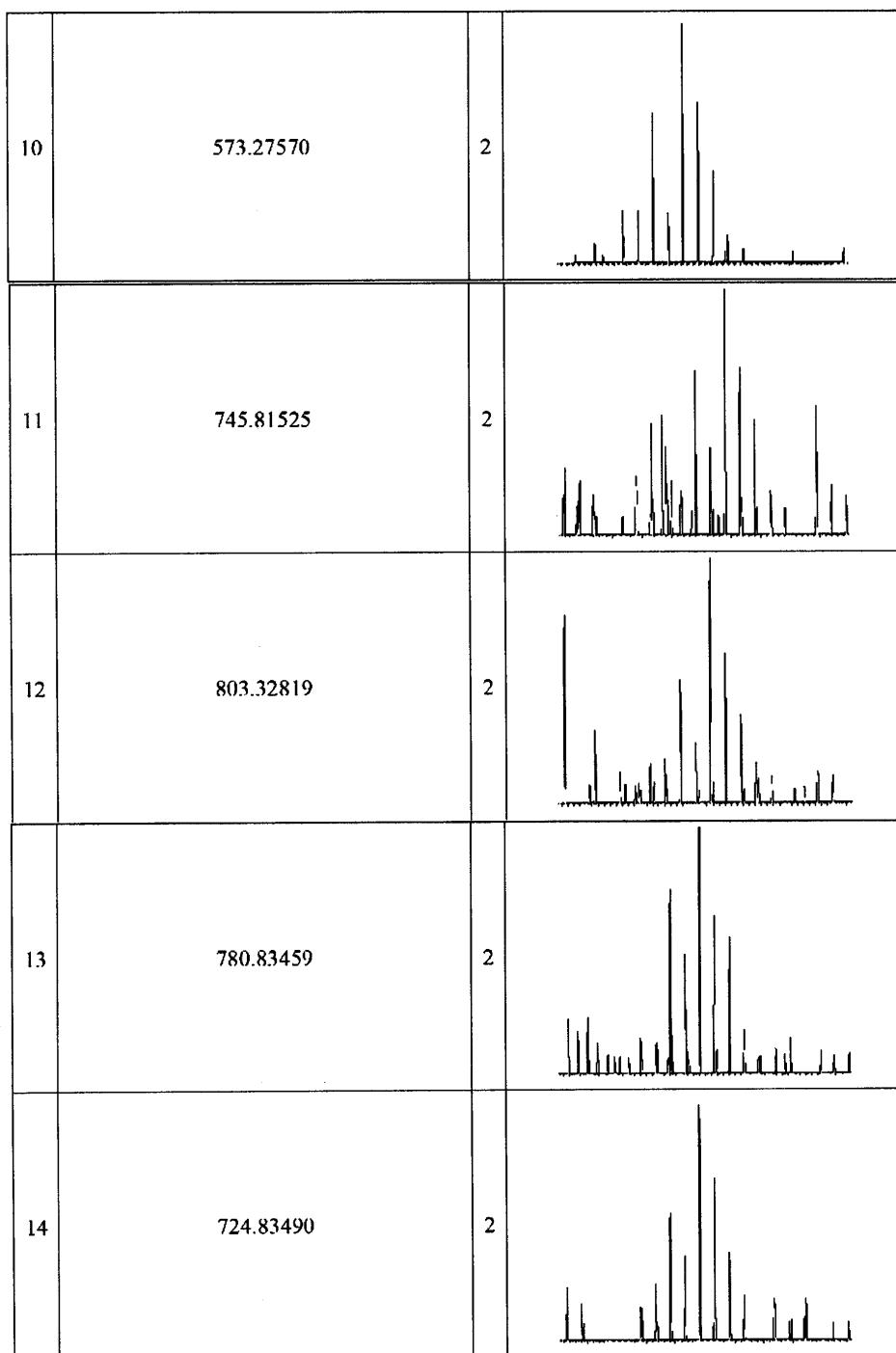
## ФИГУРА 11



14/53

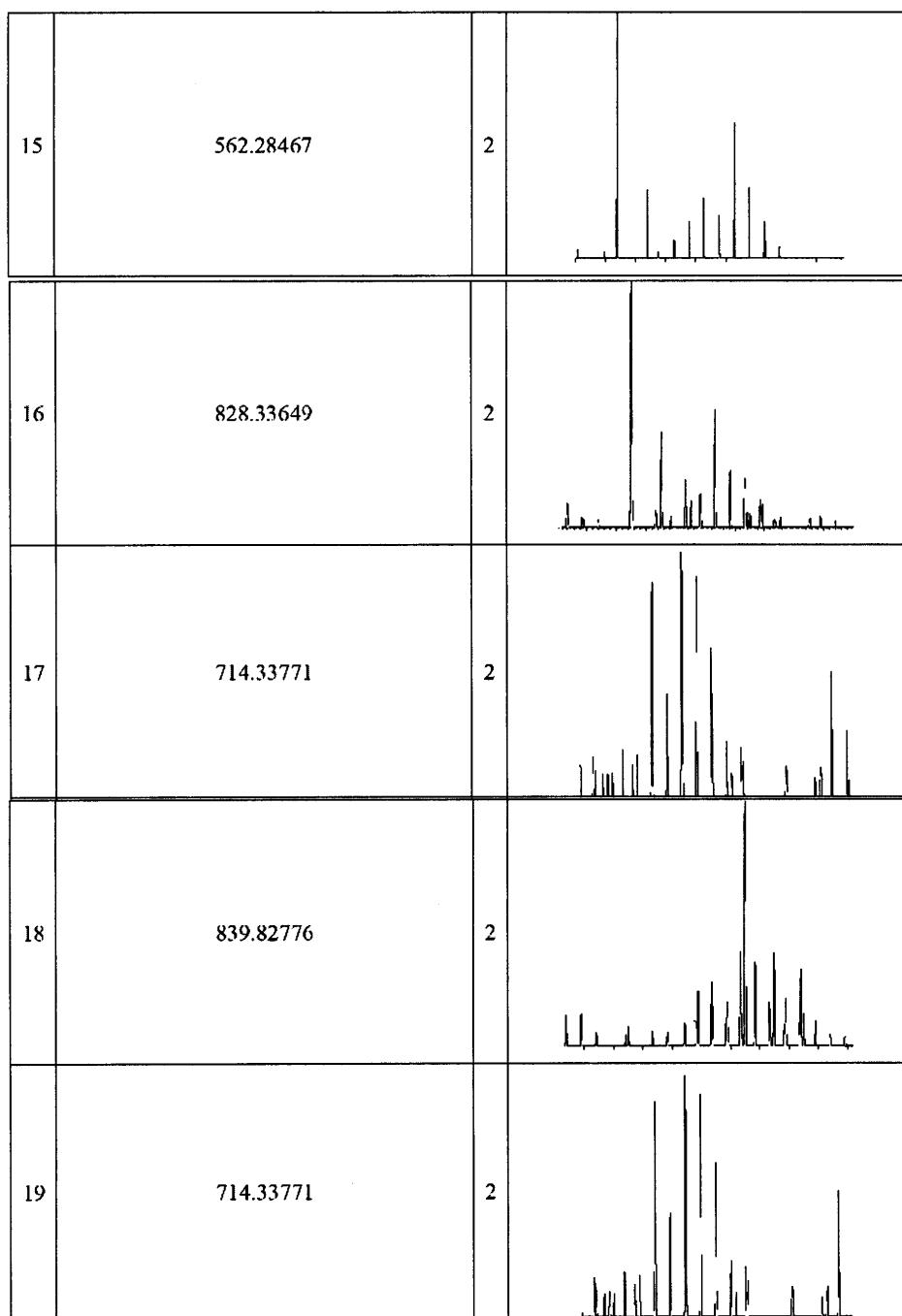
### ФИГУРА 11 продолжение



15/53  
ФИГУРА 11 продолжение

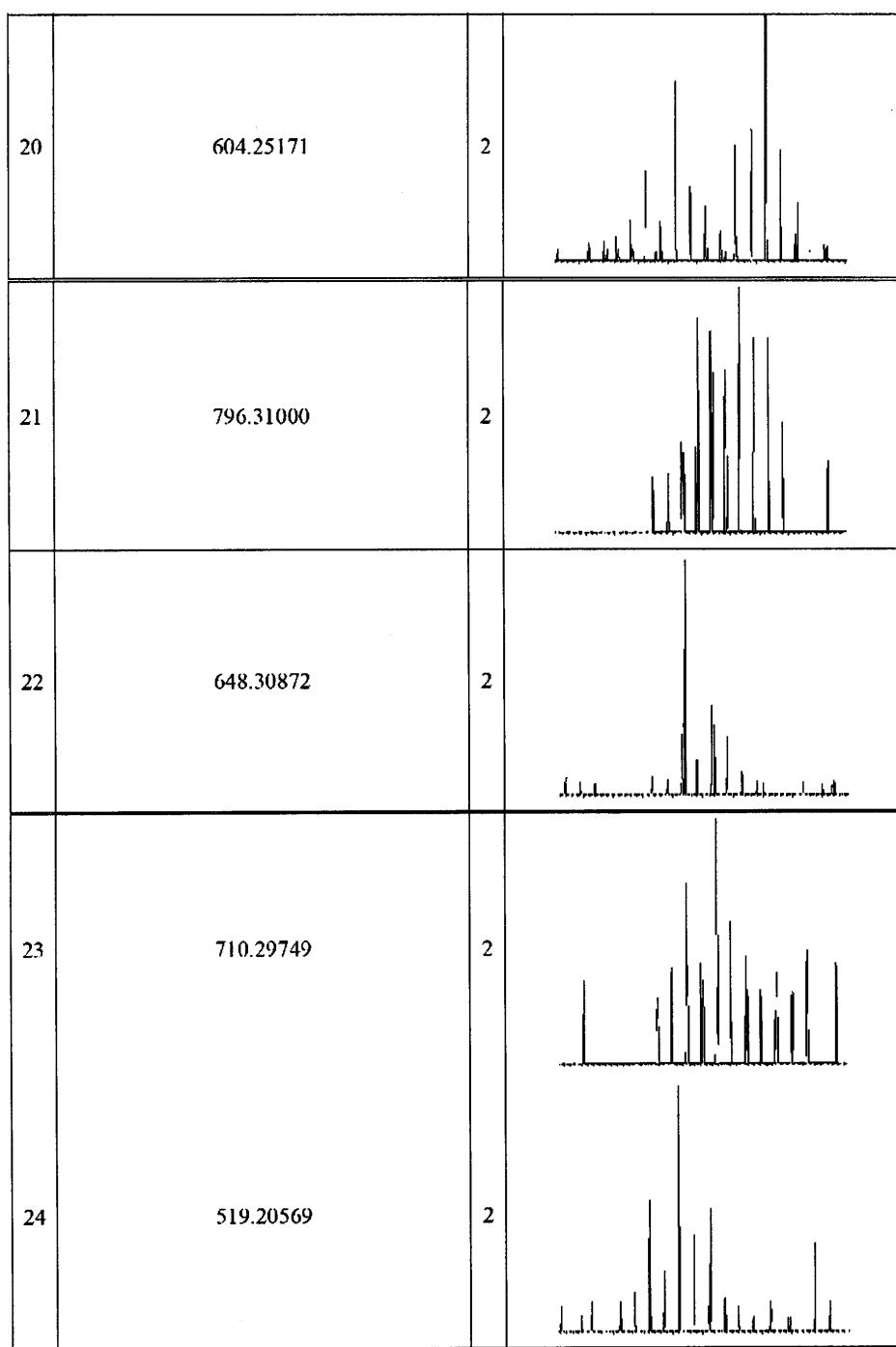
16/53

### ФИГУРА 11 продолжение



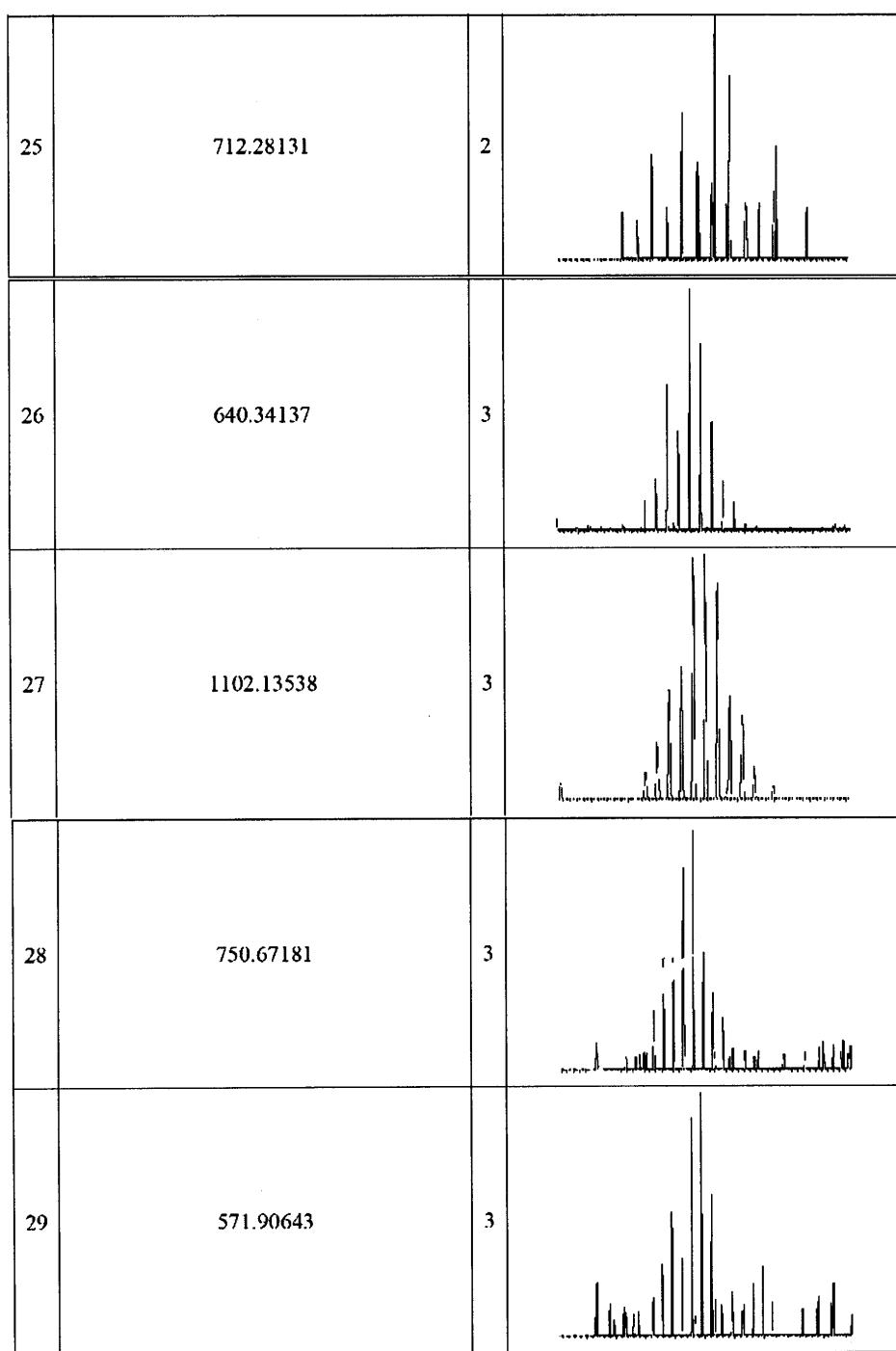
17/53

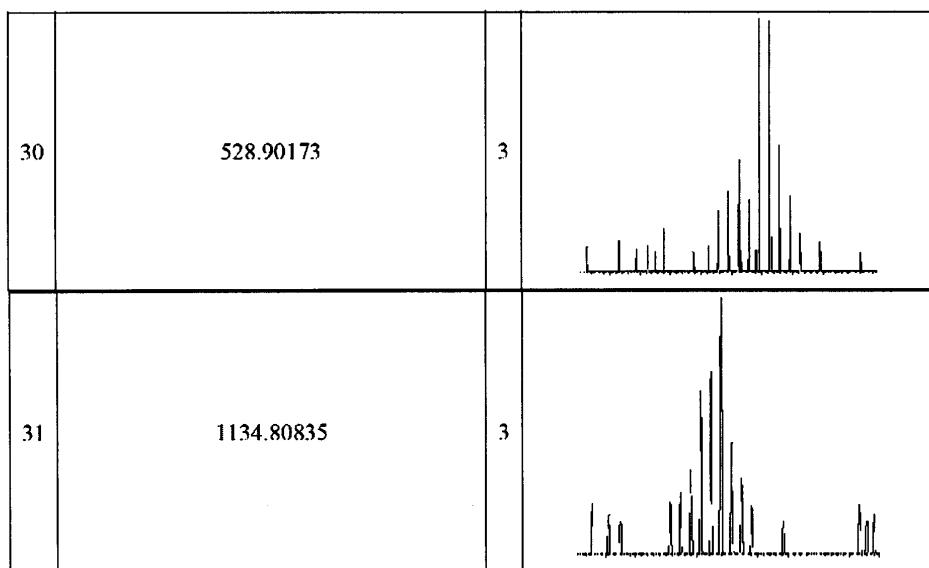
### ФИГУРА 11 продолжение



18/53

## ФИГУРА 11 продолжение



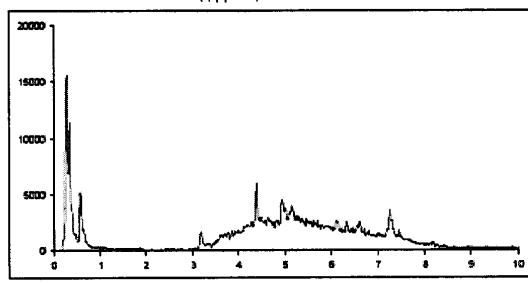


### ФИГУРА 11 продолжение

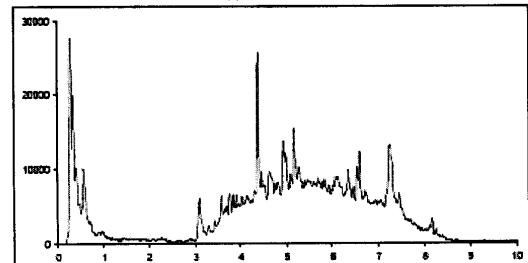
20/53

ФИГУРА 12

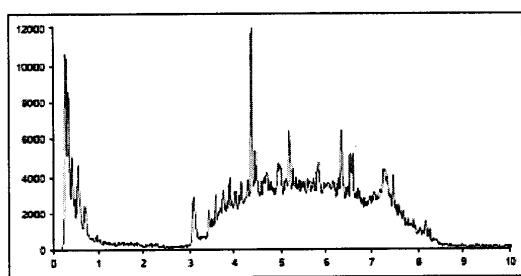
подфракция 1



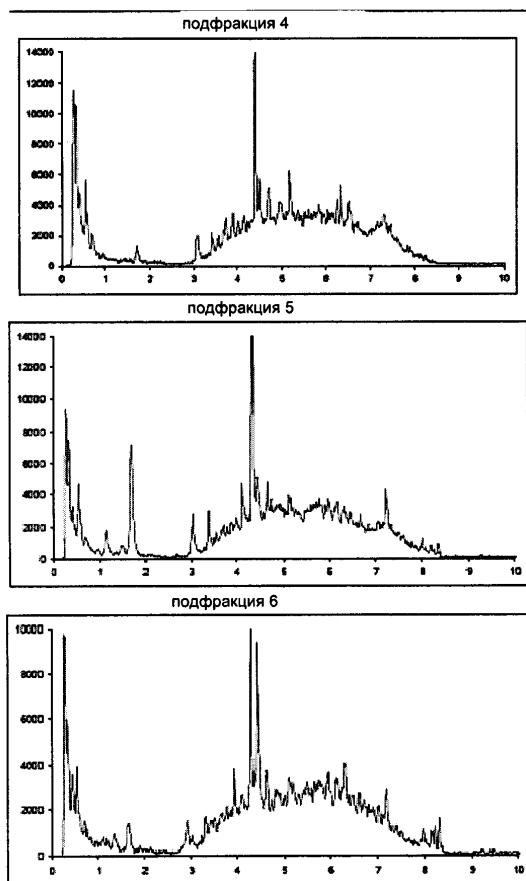
подфракция 2



подфракция 3



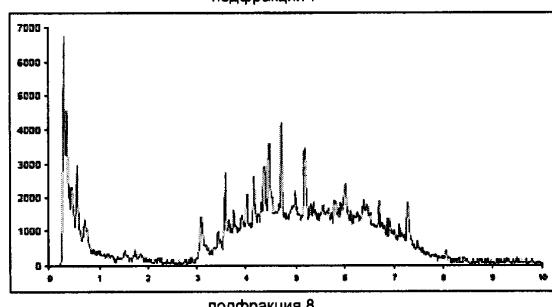
ФИГУРА 12 продолжение



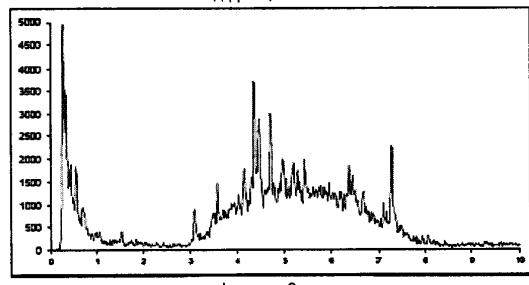
22/53

ФИГУРА 12 продолжение

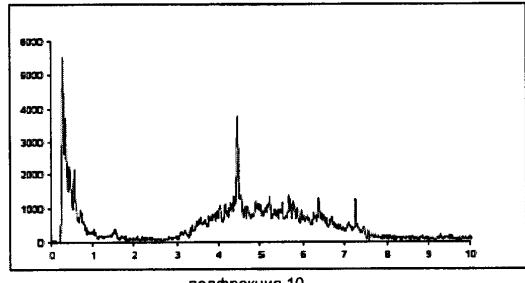
подфракция 7



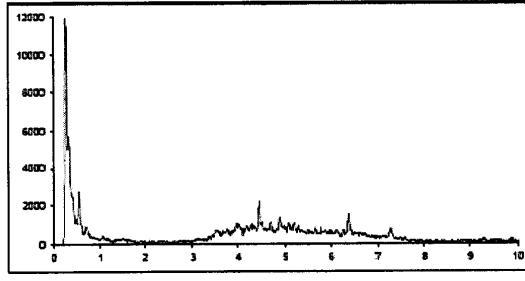
подфракция 8



подфракция 9



подфракция 10



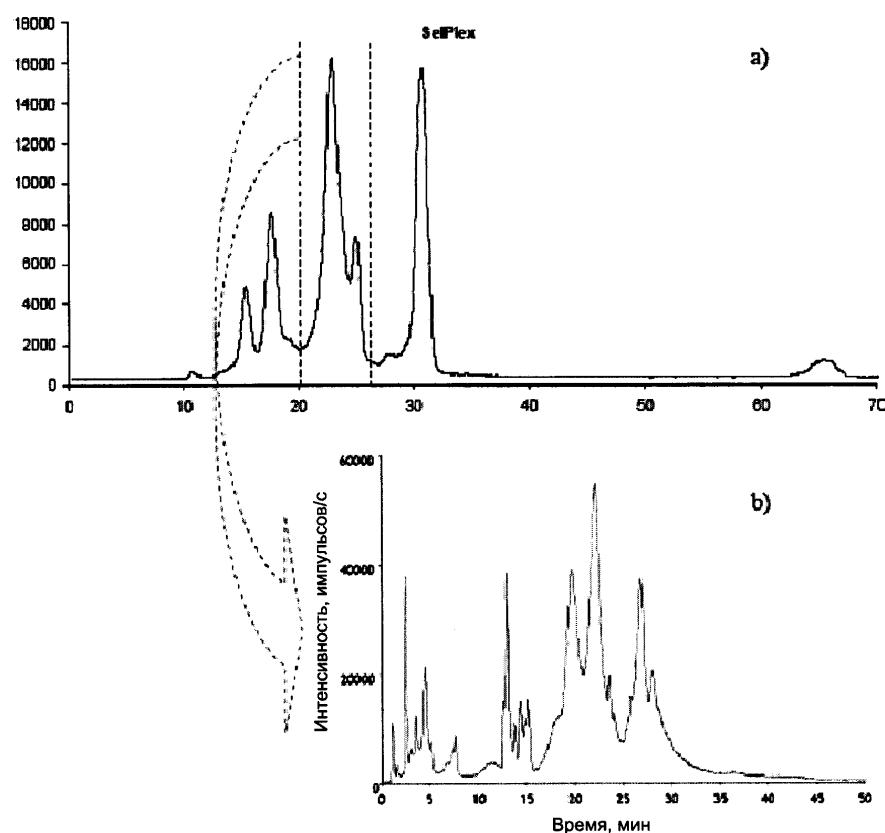
## ФИГУРА 13

	MW (теоретическая)	MW (экспериментальная)	Последовательность пептида	Z	Идентификация белка	Соединение, присутствующее в подфракции:
1	825.32400	825.32611	<b>MVAEAEK</b>	1	HSP70 (белок 70 теплового шока)	<b>T2, T3, T5, T6</b>
2	803.28210	803.28418	<b>DYMGAAK</b>	1	HSP12 (белок 12 теплового шока)	<b>T2, T3, T4, T5, T6</b>
3	688.25520	688.25653	<b>YMGAAK</b>	1		<b>T5, T6</b>
4	703.82559	703.82629	<b>ELQDIANPIMSK</b>	2	HSP70 Ssa1p (белок 70 теплового шока)	<b>T2, T5,</b>
5	1615.6931	1615.6972	<b>NQAAAMNPSNTVFDIAK</b>	2	HSP70 Ssa1p (белок 70 теплового шока)	<b>T6</b>
6	799.8695	799.87097	<b>NFTPEQISSMVLGK</b>	2	HSP SSA1 (белок теплового шока SSA1)	<b>T2, T5,</b>
7	1598.7332	1598.7338	<b>NFTPEQISSMVLGK</b>	2	HSP SSA1 (белок теплового шока SSA1)	<b>T2, T3, T4</b>
8	841.31890	841.32074	<b>MVSEAEK</b>	1	HSP SSA2 (белок теплового шока SSA2)	<b>T2, T5,</b>
9	951.36690	951.36835	<b>PEVQGDMK</b>	1	SSA или SSA2	<b>T2, T3</b>
10	1406.6433	1406.6450	<b>ELQDIANPIMSK</b>		Ssa1p	<b>T2, T3</b>
11	599.20350	599.20422	<b>AMSSR</b>	1	Sab2p	<b>T5</b>
12	770.04864	770.04810	<b>YQGSVIGWLGITNSAVALMEVK</b>	3	Sab1p	<b>T2</b>
13	822.32430	822.32599	<b>AAAEQPMK</b>	1	TDH1 (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 1)	<b>T2, T3, T4, T5</b>
14	843.36100	843.36316	<b>LTGMAFR</b>	1	TDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа )	<b>T2, T3, T4,</b>
15	1552.6590	1552.6589	<b>PFVSNDYAAVMVK</b>	2	TDH1 (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 1)	<b>T6</b>

## ФИГУРА 13 (продолжение)

16	1091.51380	1091.52002	AFGIEEGLMTTVHSLTA TOK	2	GPD3 (глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназа)	T2, T6
17	1628.5903	1628.6921	PFITNDYAAYMFK	2	GPD3 (глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназа)	T6
18	1239.64200	1239.64514	PGMVVTFAFAGVTTIEV K	2	EF1 $\alpha$ (фактор 1-альфа элонгации трансляции)	T2
19	2478.2761	2478.2824	VEIGVIVKGNVIVTAPRAGVTTIE VK	2	EF1 $\alpha$ (фактор 1-альфа элонгации трансляции)	T2, T3
20	883.37710	883.37915	AAATAAMTK	1	фактор элонгации ЗА	T5
21	944.93745	944.93878	SIVPSGASTGVHEALEM R	2	Eno1p (енолаза 1)	T2, T5
22	569.1990	569.1997	WNGK	1	Eno1p (енолаза 1)	T2, T6
23	1888.8670	1888.8690	SIVPSGASTGVHEALEM R	2	Eno1p (енолаза 1)	T2, T3, T4, T6
24	622.24460	622.24628	AMPQK	1	Yralp	T2
25	539.20750	539.20911	AAMAK	1	Yralp	T2
26	502.79779	502.70691	HVGDNMFIR*	2	Nop4p*	T2
27	748.34379	748.34375	VIEEPTTSETAMK	2	60S RP L25 (рибосомный белок	T2
28	956.43449	956.43091	VLQALEEKGIVELSPK+ iodine	2	Rps19ap	T2
29	776.37183	776.37103	LPAASLGDMVNATVK	2	Rpl23ap	T2
30	896.41077	896.40948	AGMTTIVR	1	RPL3 (рибосомный белок L3)	T5
31	896.4107	896.4087	AGMTTIVR	1	RPL3 (рибосомный белок L3)	T2, T4
32	667.27350	567.27521	MLMPK	1	40S рибосомный белок S10-A	T5
33	555.20447	555.20270	TMGAK	1	Pba1p	T2, T3, T4, T5, T6
34	596.20380	596.20404	MNAGR	1	SIP18	T2, T4, T6
35	833.29270	833.29449	TYENMK	1	SIP18	T5
36	504.68551	504.68597	MGHDSQSTK	2	SIP18	T5
37	864.37337	864.37231	GEAIMAPK	1	Hrd3p	T2, T5
38	785.30790	785.30902	Ac-MNVFGK	1	Ctip	T5
39	1039.4326	1039.43225	AMEVVASER	1	Lsp1p	T3
40		955.92926		2	еще не идентифицирован	
41	566.25480	566.25519	IVMR	1	еще не идентифицирован	
42	538.22350	538.22510	MA(NL)R	1	еще не идентифицирован	T2, T3, T4
43	581.2564	581.2565	AMXAK	1	Bio2p	T3
44	1236.5378	1236.5374	DLETLIMHTK	2	Rpl32p	T3

ФИГУРА 14



26/53

## ФИГУРА 15

Формула	Теоретическая масса: [M + H] <sup>+</sup>	Экспериментальная масса: [M + H] <sup>+</sup>
$C_9H_{17}N_2O_7Se^+$	345.0196	345.0204
$C_{13}H_{23}N_4O_6SSe^+$	475.0396	475.0410
$C_{14}H_{24}N_3O_{10}Se_2^+$	553.9787	553.9802
Формула	Теоретическая масса: [M + H] <sup>+</sup>	Экспериментальная масса: [M + H] <sup>+</sup>
$C_{12}H_{22}N_3O_7Se^+$	400.0618	400.0606
$C_{11}H_{20}N_3O_6SSe^+$	402.0233	402.0265
$C_{16}H_{27}N_4O_{11}SSe^+$	563.0557	563.0567

27/53

## ФИГУРА 15 продолжение

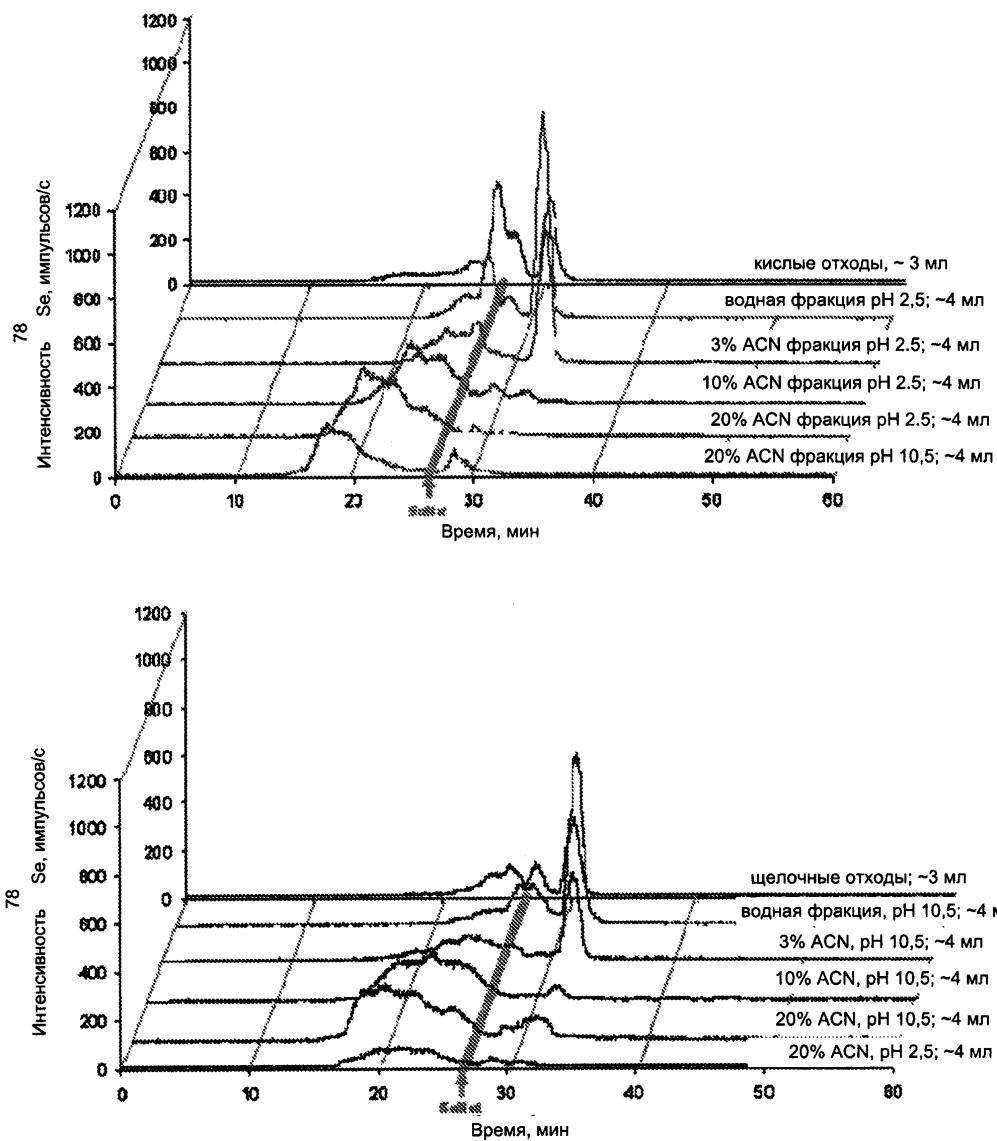
Формула	Теоретическая масса: [M + H] <sup>+</sup>	Экспериментальная масса: [M + H] <sup>+</sup>
$C_{18}H_{30}N_5O_{11}SSe^+$	604.0823	604.0842
$C_{20}H_{33}N_6O_{12}SSe^+$	661.1038	661.1053
$C_{15}H_{26}N_5O_9SSe^+$	532.0611	532.0625
Формула	Теоретическая масса: [M + H] <sup>+</sup>	Экспериментальная масса: [M + H] <sup>+</sup>
$C_{10}H_{17}N_2O_7Se^+$	357.0196	357.0218 (359-2H <sup>+</sup> )
$C_{16}H_{27}N_4O_{10}SSe^+$	547.0608	547.0621
$C_{16}H_{27}N_4O_{11}Se_2^+$	611.0005	611.0023

28/53

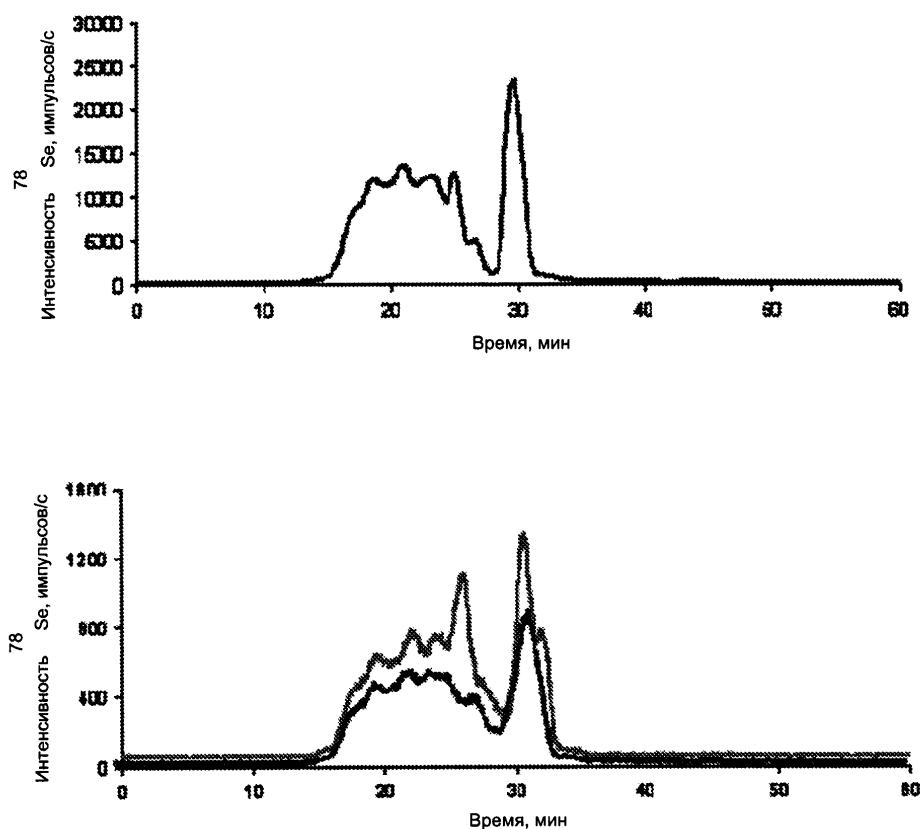
## ФИГУРА 15 продолжение

Формула	Теоретическая масса: [M + H] <sup>+</sup>	Экспериментальная масса: [M + H] <sup>+</sup>
<chem>C18H30N3O11Se2+</chem>	652.0271	652.0288
<chem>C11H20N3O8Se+</chem>	434.0131	434.0152
<chem>C20H33N3O12Se2+</chem>	709.0486	709.0503
Формула	Теоретическая масса: [M + H] <sup>+</sup>	Экспериментальная масса: [M + H] <sup>+</sup>
<chem>C17H29N4O11Se2+</chem>	625.0162	625.1174
<chem>C12H21N2O10Se2+</chem>	512.9521	512.9537
<chem>C17H29N4O11SSe+</chem>	577.0714	577.0728

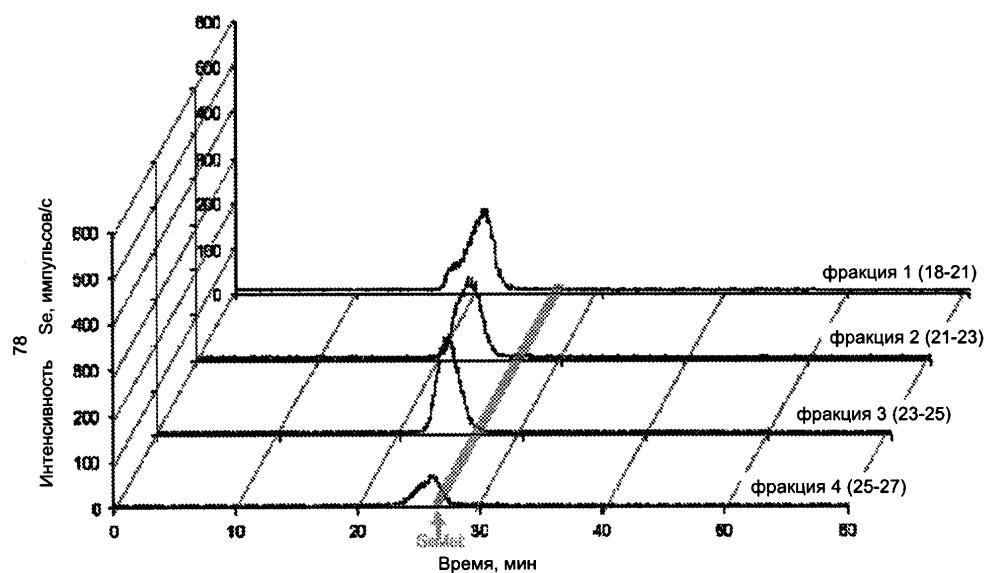
ФИГУРА 16



ФИГУРА 17

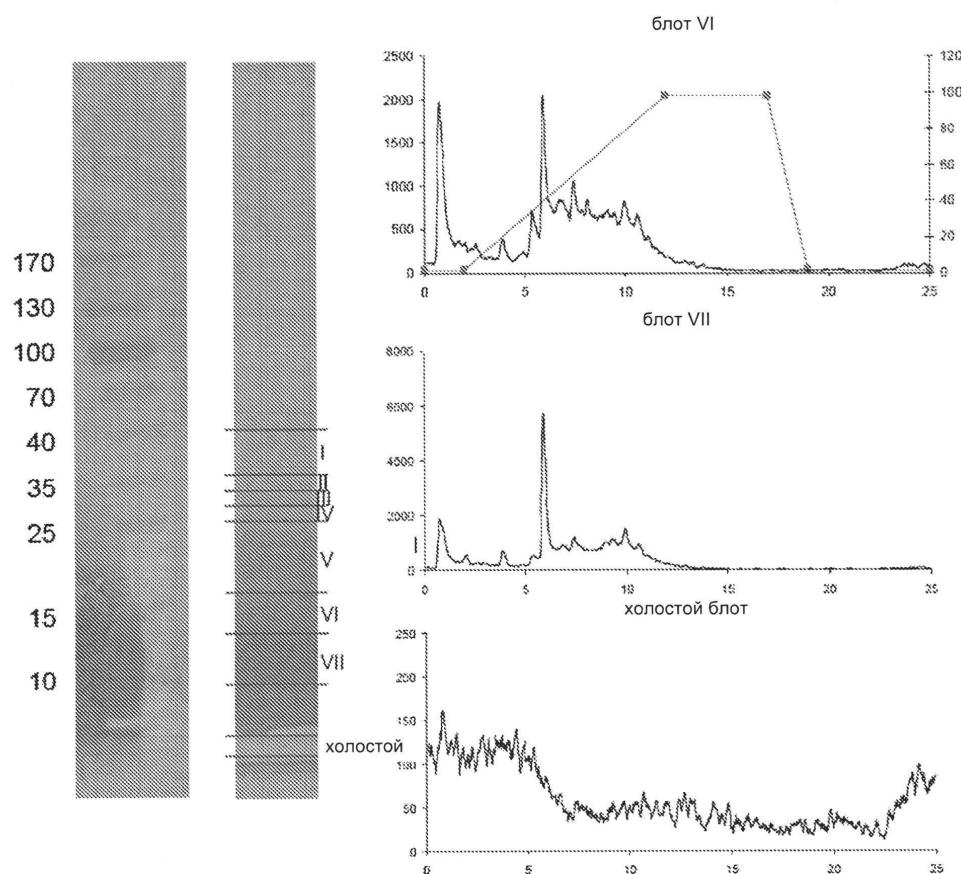


ФИГУРА 18

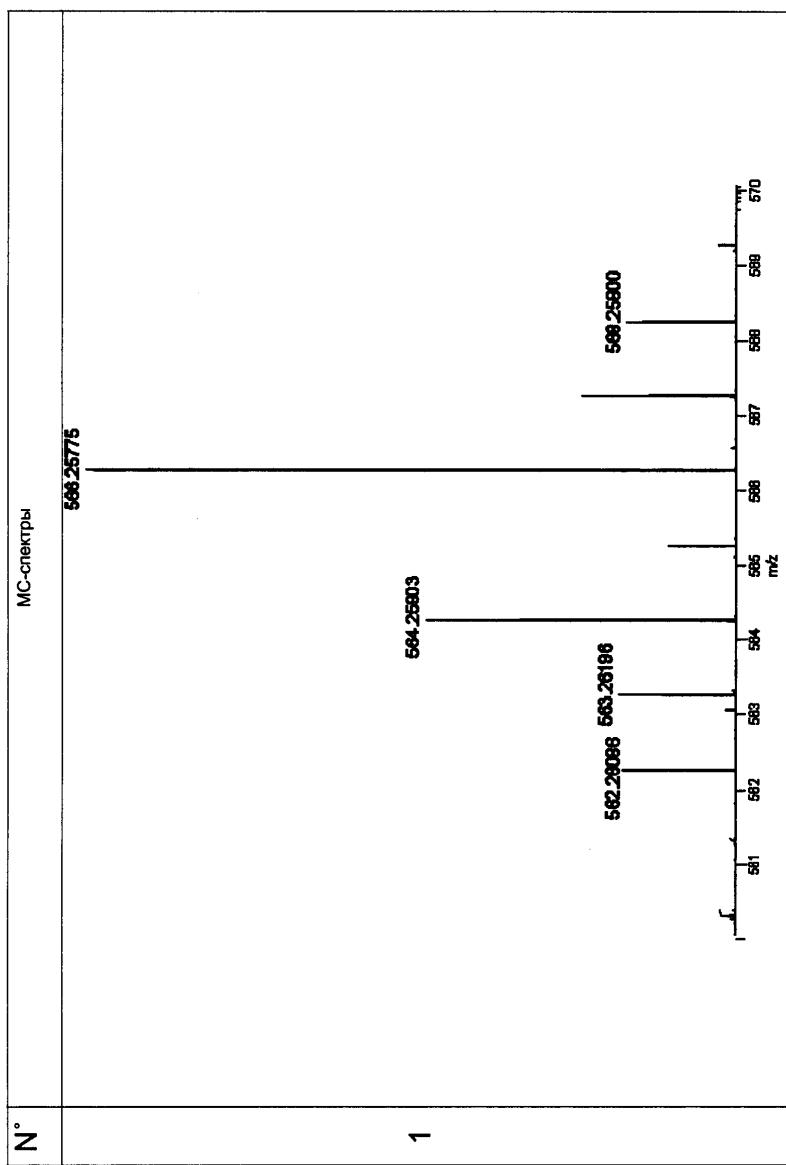


32/53

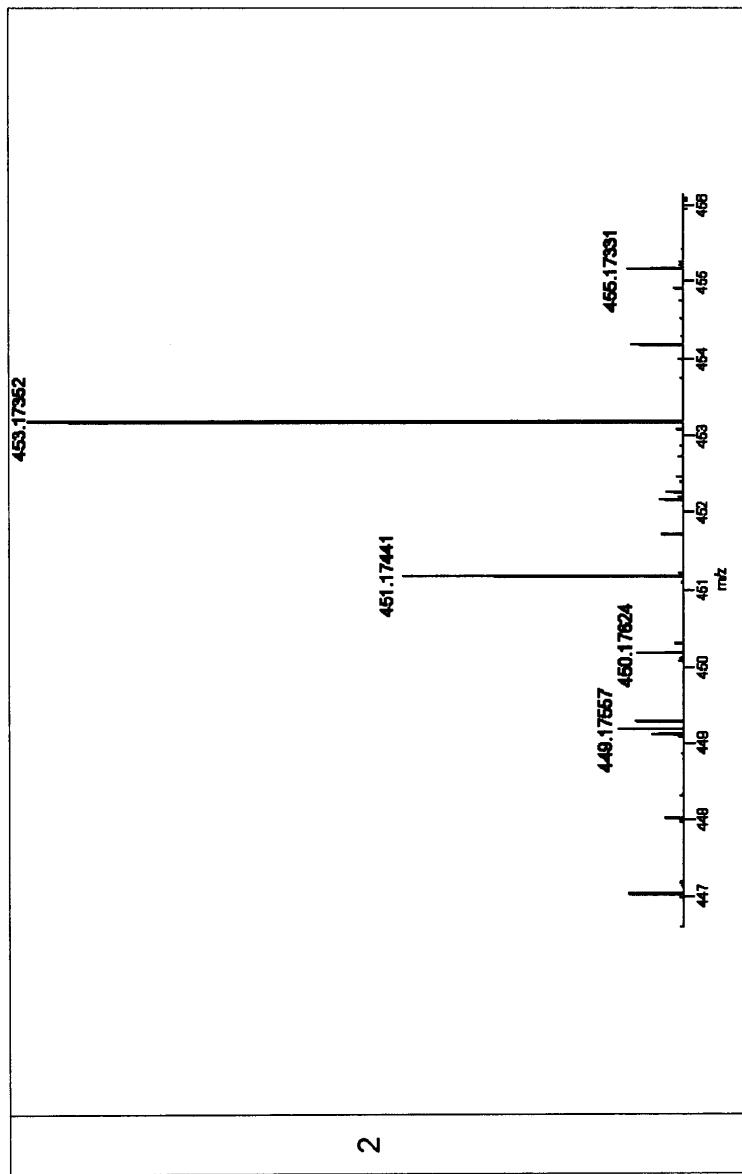
ФИГУРА 19



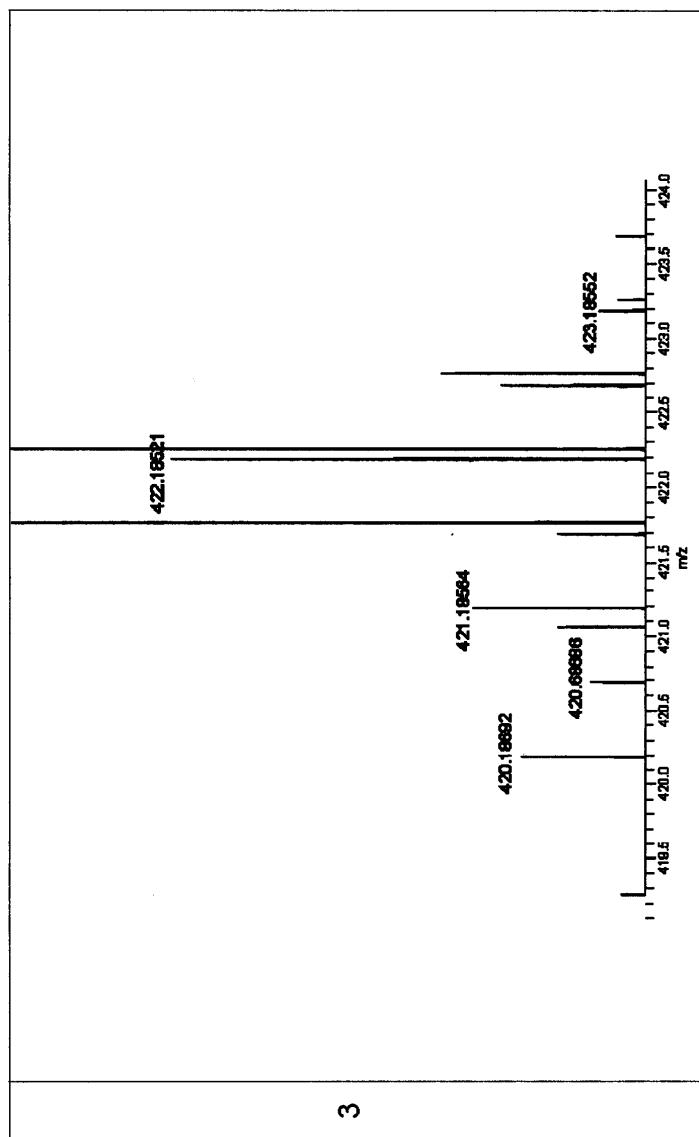
ФИГУРА 20



ФИГУРА 20 продолжение

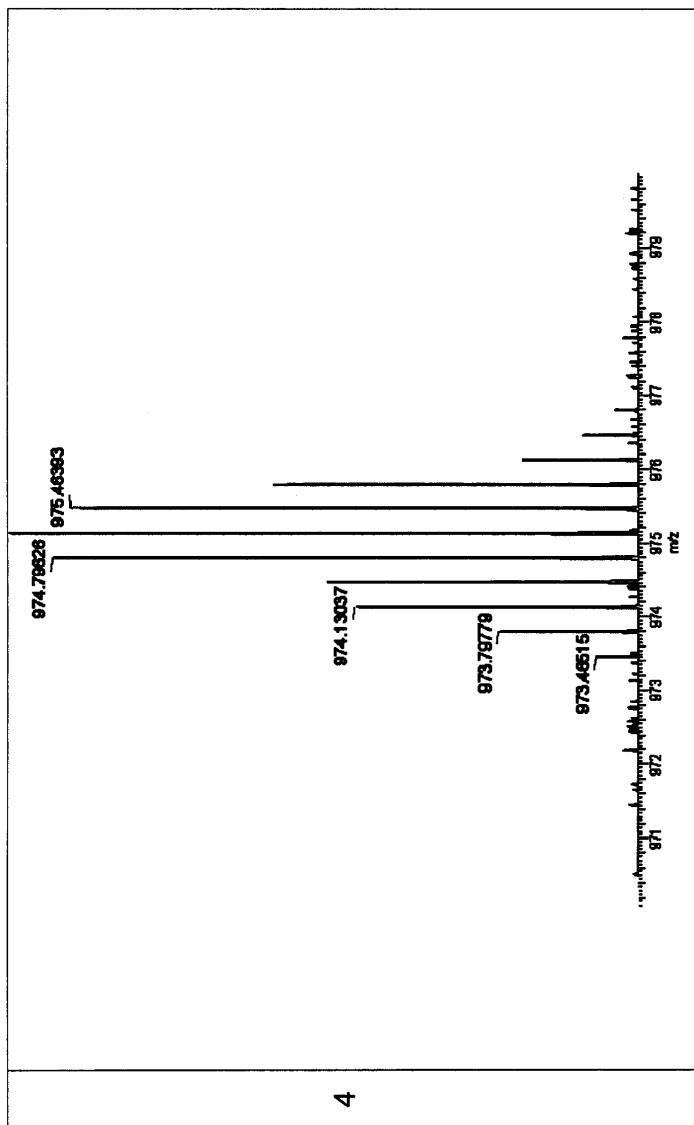


ФИГУРА 20 продолжение

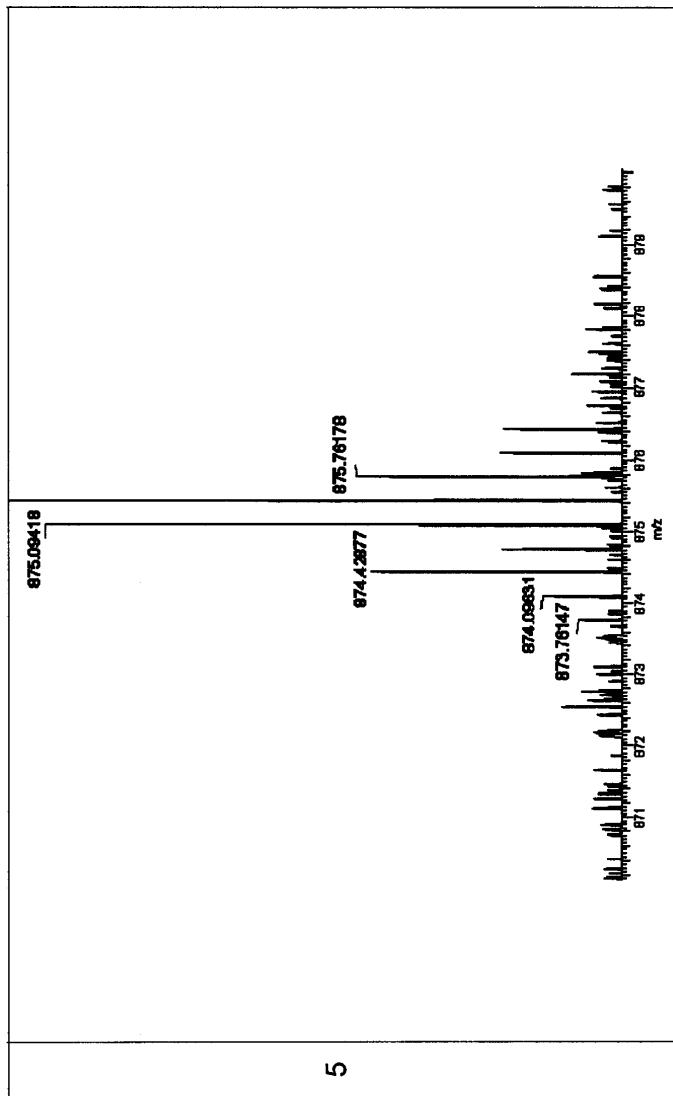


3

## ФИГУРА 20 продолжение



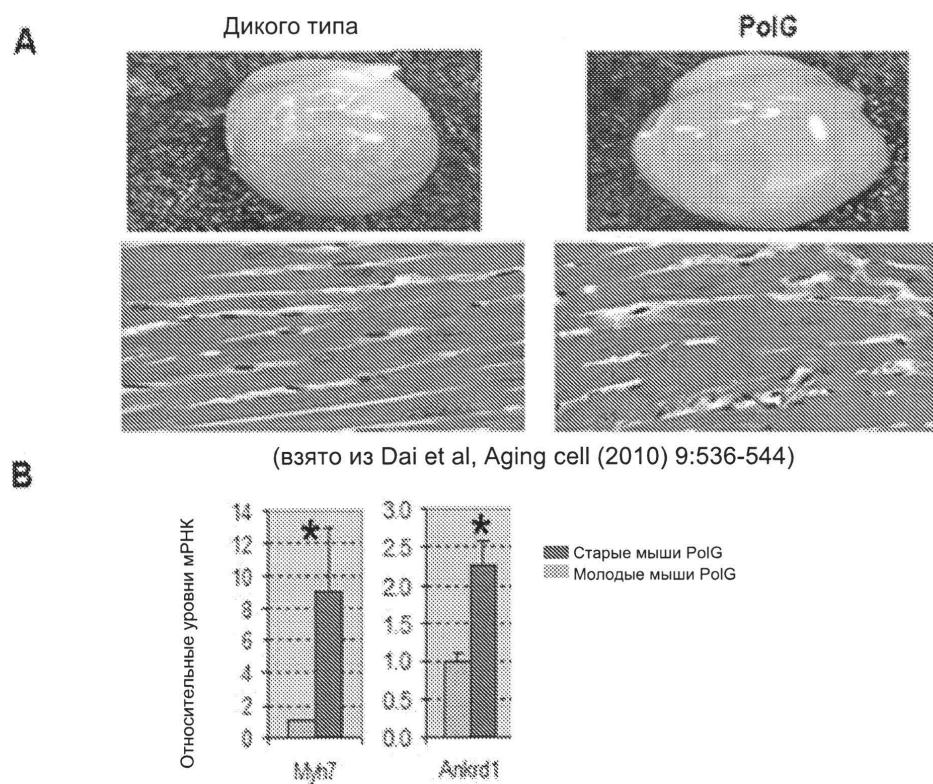
## ФИГУРА 20 продолжение



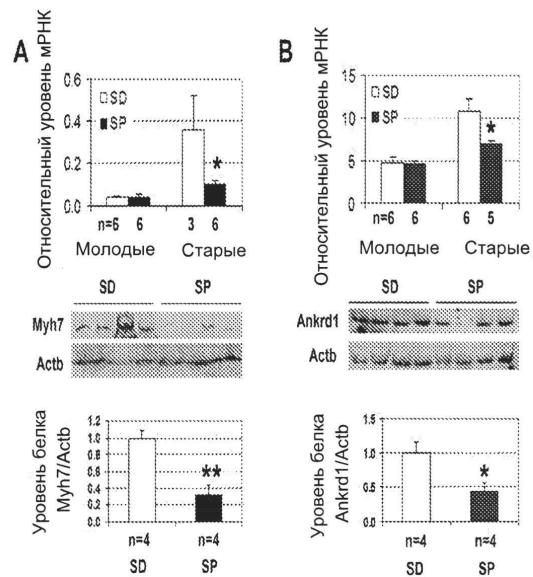
## ФИГУРА 21

	Последовательность	Заряд	Эксп. масса	Теор. масса	Белок
1	LVMR	1	566.25800	566.2568	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 3 (GAPDH3)
2	VMR	1	453.17352	453.1727	
3	LTGMAFR	2	422.18521	422.18545	
4	SRPNVEVVALNDPFIT NDYAAAYMFK	3	974.79626	974.7912	
5	VINDAFGIEEGLMTT VHSLTATQK	3	875.09418	875.08923	

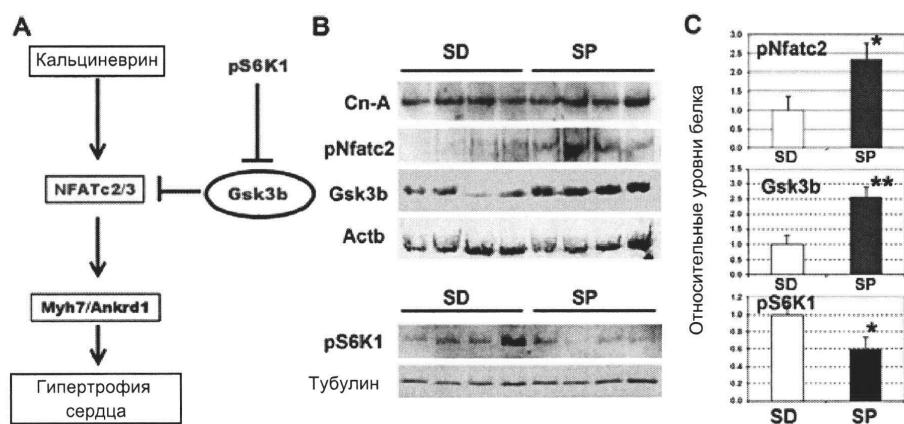
## ФИГУРА 22



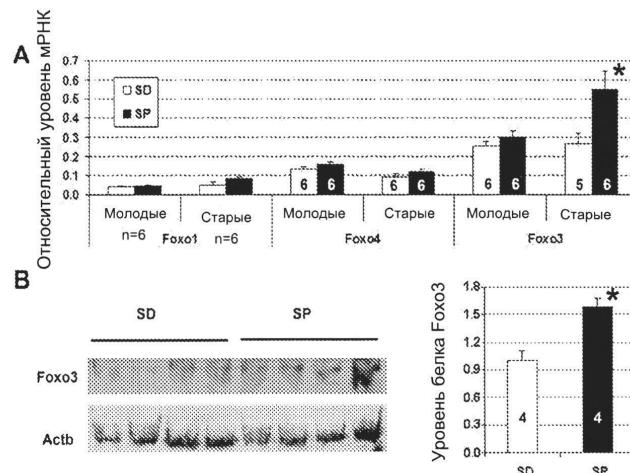
ФИГУРА 23



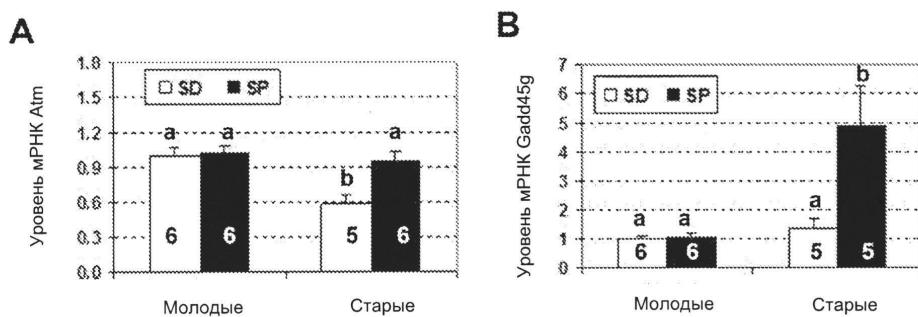
ФИГУРА 24



ФИГУРА 25

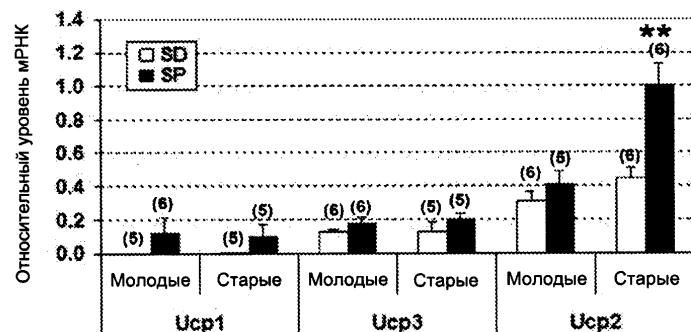


ФИГУРА 26

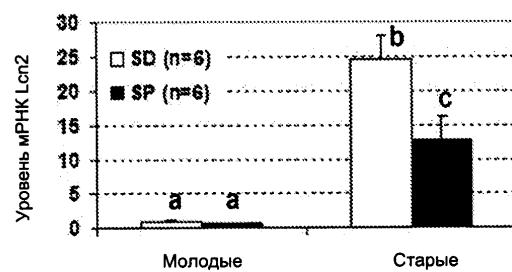


43/53

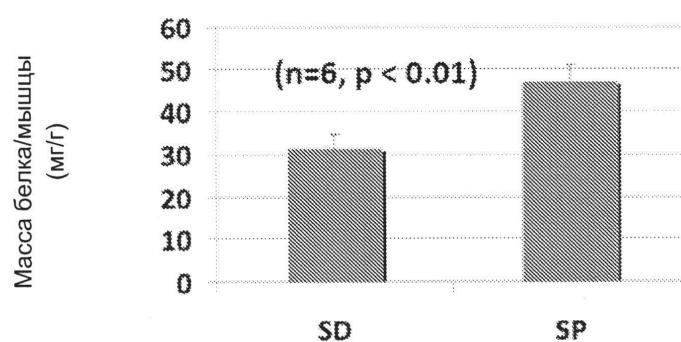
ФИГУРА 27



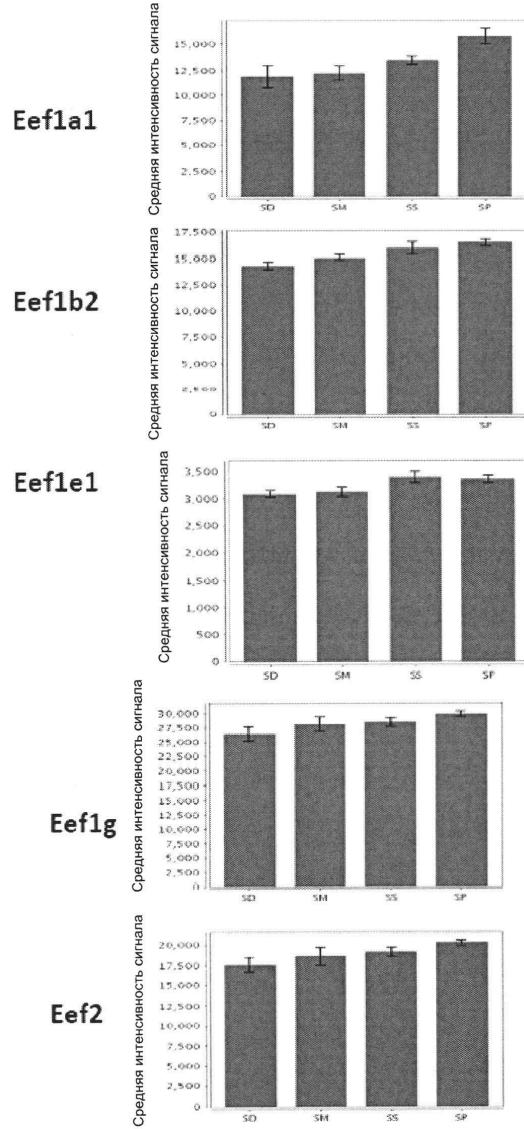
ФИГУРА 28



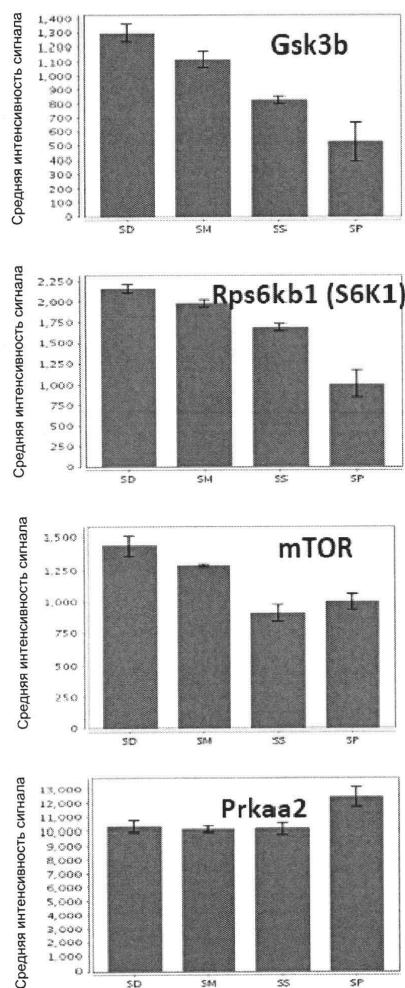
ФИГУРА 29



## ФИГУРА 30

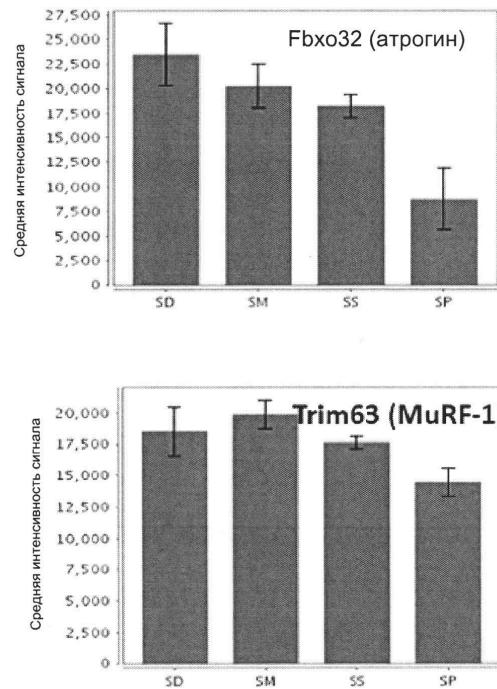


ФИГУРА 31

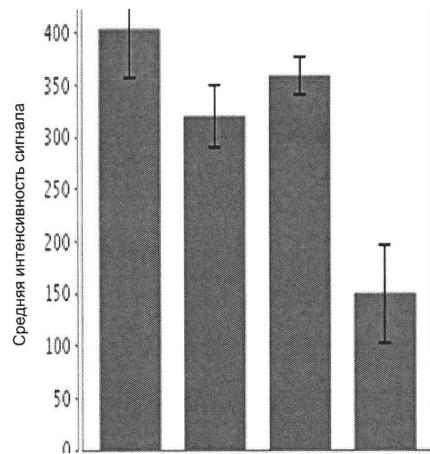


47/53

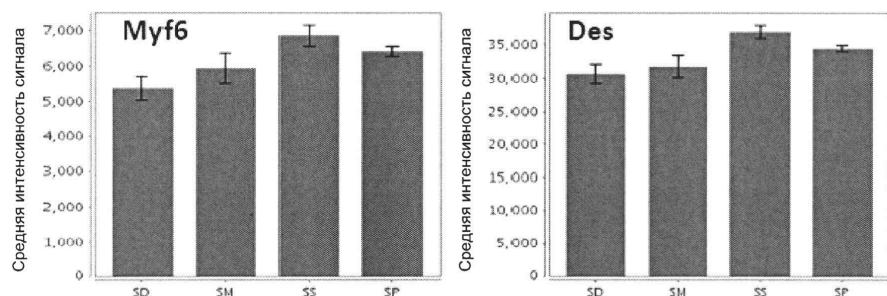
ФИГУРА 32



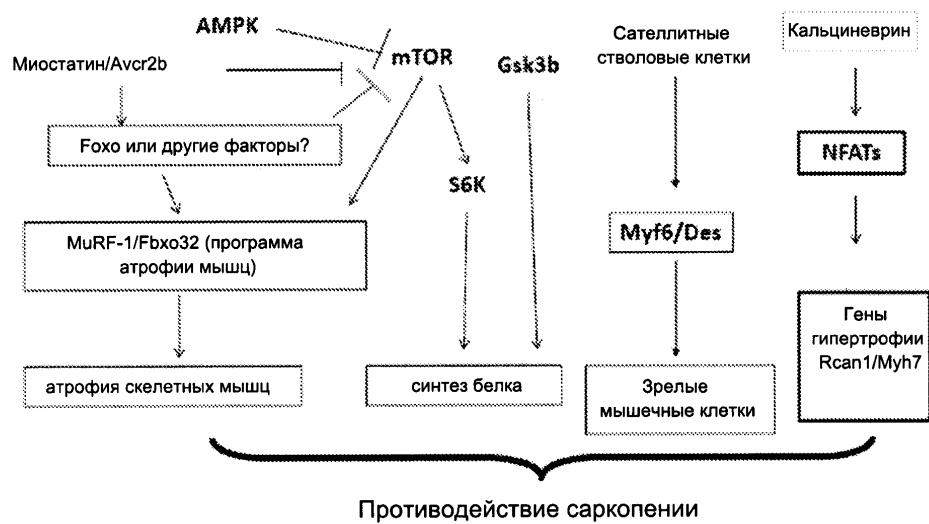
ФИГУРА 33



ФИГУРА 34

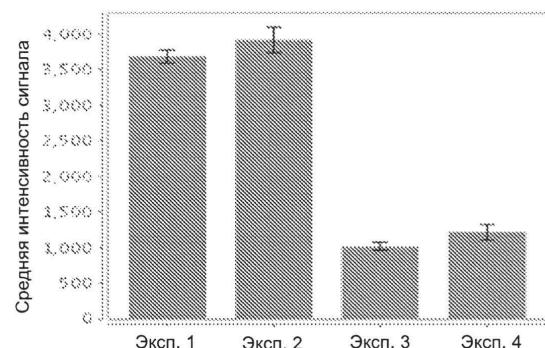


## ФИГУРА 35

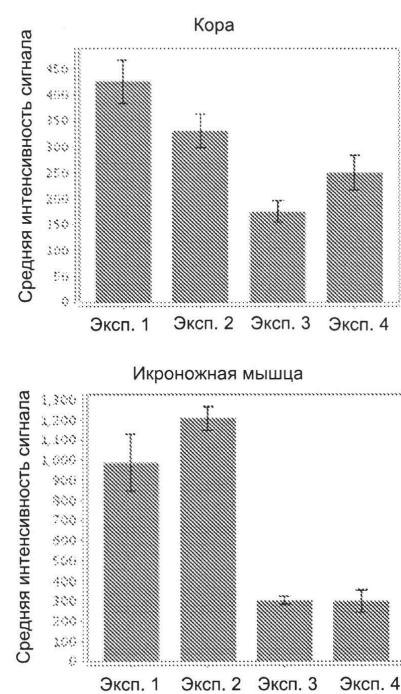


50/53

ФИГУРА 36

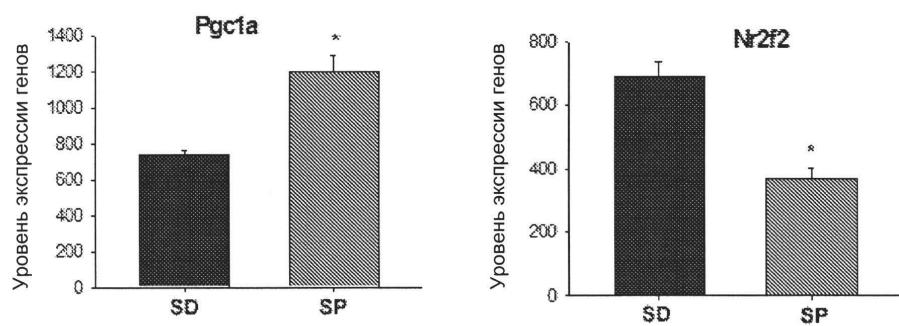


ФИГУРА 37



ФИГУРА 38

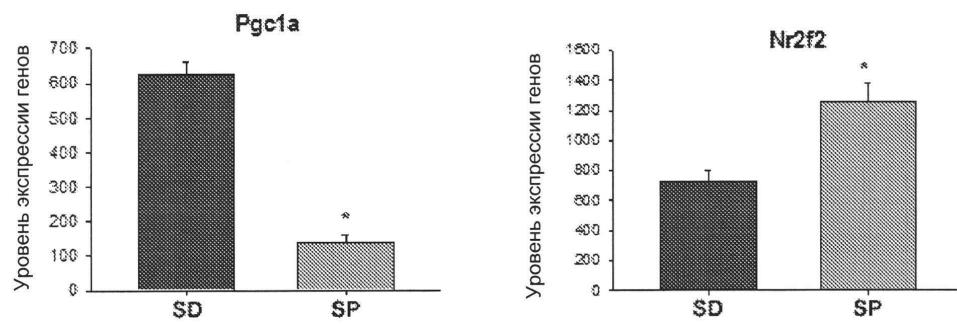
## Скелетная мышца



\*p&lt;0.05

ФИГУРА 39

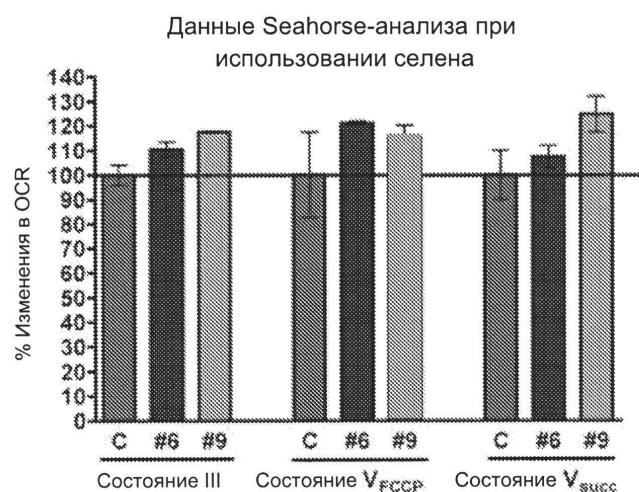
## Печень



\*p&lt;0.05

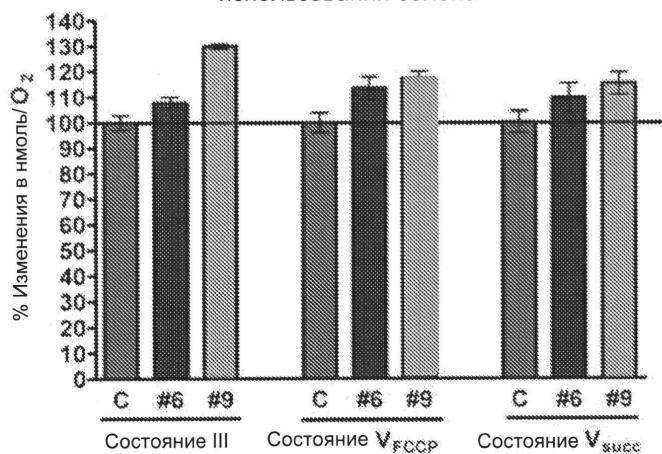
ФИГУРА 40

A



B

Данные Oxytherm-анализа при использовании селена



## ФИГУРА 41

№ 9 - ферментативная активность

