



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/7076 (2018.05); A61P 43/00 (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2016133469, 14.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.03.2014Дата регистрации:
28.08.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.03.2014

(43) Дата публикации заявки: 17.04.2018 Бюл. №
11

(45) Опубликовано: 28.08.2018 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 14.10.2016(86) Заявка РСТ:
US 2014/029542 (14.03.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/137983 (17.09.2015)Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ВОХ 1125,
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ПАУЭР Ронан (US),
ЛАНЬ Цзы-Цзянь (US),
ЙАННИКУРИС Александрос (US)

(73) Патентообладатель(и):

ОЛТЕК, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2371437 C2, 27.10.2009. US
2007122491 A1, 31.05.2007. US 2012094947 A1,
19.04.2012. US 2011301186 A1, 08.12.2011.
PINTO A. et al. "Supranutritional selenium
induces alterations in molecular targets related
to energy metabolism in skeletal muscle and
visceral adipose tissue of pigs". J Inorganic
Biocjemistry 2012, 114:47-54, найдено
31.01.2018 (см. прод.)

RU 2 665 135 C2

RU 2 665 135 C2

(54) КОМПОЗИЦИИ СЕЛЕНООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к медицине, а именно к молекулярной биологии, и касается усиления митохондриальной функции клеток. Для этого вводят композицию, содержащую соединения селена: 5'-Метилсelenоаденозин, Se-Аденозил-L-гомоцистеин, Гамма-глутамил-

метилсelenоцистеин или их комбинации. Это обеспечивает усиление митохондриальной функции клеток скелетной мускулатуры, печени и нейрональных клеток, что в дальнейшем может быть использовано для лечения заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией. 3 н. и 7 з.п. ф-лы, 19 ил., 1 табл.

(56) (продолжение):

из Интернет: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013412001316?via%3Dihub>.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/7076 (2018.05); A61P 43/00 (2018.05)

(21)(22) Application: 2016133469, 14.03.2014

(24) Effective date for property rights:
14.03.2014Registration date:
28.08.2018

Priority:

(22) Date of filing: 14.03.2014

(43) Application published: 17.04.2018 Bull. № 11

(45) Date of publication: 28.08.2018 Bull. № 25

(85) Commencement of national phase: 14.10.2016

(86) PCT application:
US 2014/029542 (14.03.2014)(87) PCT publication:
WO 2015/137983 (17.09.2015)Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOX 1125,
"PATENTIKA"

(72) Inventor(s):

PAUER Ronan (US),
LAN Tszy-Tszyan (US),
JANNIKURIS Aleksandros (US)

(73) Proprietor(s):

OLTEK, INK. (US)

R U
2 6 6 5 1 3 5
C 2
C 5
C 3
C 1
C 6
C 9
C 2
R UR U
2 6 6 5 1 3 5
C 2

(54) COMPOSITIONS OF ORGANOSELENIUM COMPOUNDS AND METHODS OF THEIR APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present group of inventions relates to medicine, namely to molecular biology, and concerns the enhancement of mitochondrial cell function. For this purpose the composition comprising selenium compounds is introduced: 5'-Methylseleno adenosine, Se-Adenosyl-L-homocysteine, Gamma-glutamyl-

methylselenocysteine, or combinations thereof.

EFFECT: mitochondrial cell function of skeletal muscles, liver and neuronal cells is enhanced, which in the future can be used to treat the diseases, which are associated with mitochondrial dysfunction.

10 cl, 19 dwg, 1 tbl

Область техники

Настоящая заявка относится к композициям селеноорганических композиций и соединений и способам их применения в различных биологических путях для усиления митохондриальной функции, лечения заболеваний и ингибирования или усиления 5 специфических процессов в определенных типах клеток животных и человека.

Уровень техники

Селен (Se) является одним из важнейших микроэлементов, который играет важную роль во многих биологических процессах, таких как репродукция, метаболизм гормонов щитовидной железы, синтез ДНК и защита от окислительного повреждения и инфекции.

10 Селен включен в катализитический участок различных селенозависимых ферментов, таких как глутатионпероксидаза (GPx), тиоредоксинредуктазы и метионинсульфоксидредуктаза. Эти селеноферменты способствуют регуляции метаболической активности, иммунной функции, антиоксидантной защиты, 15 внутриклеточной окислительно-восстановительной регуляции и митохондриальной функции.

15 Органелла, известная как митохондрия ("МТ"), является основным источником энергии в клетках высших организмов. Митохондрии обеспечивают прямую и косвенную биохимическую регуляцию широкого спектра клеточного дыхания, окислительных и метаболических процессов. Они включают цепь переноса электронов (ETC), которая 20 обеспечивает окислительное фосфорилирование для получения метаболической энергии в форме аденоциантифосфата (АТФ), и которая также лежит в основе центральной роли митохондрий во внутриклеточном гомеостазе кальция. Митохондриальное дыхание происходит на внутренней митохондриальной мембране и достигается за счет потока 25 электронов через систему транспорта электронов, которая содержит четыре комплекса (комплекс I, II, III, и IV) с дополнительным комплексом (комплекс V), служащим в качестве места для синтеза АТФ (АТФ-сингтаза). Ухудшение или снижение активности любого комплекса прерывает поток электронов и может привести к дисфункции митохондриального дыхания (см., например, Schildgen et al., Exp Hematol 2011; 39:666-67510, 11; Arthur et al., Mol Neurodegener 2009; 4:37).

30 Митохондриальную дисфункцию, приводящую к гибели клеток, продукции реакционноспособных форм кислорода, увеличению окислительного повреждения ДНК, повышенной аутофагии и потере митохондриального мембранныго потенциала, связывали с такими состояниями, как диабет, ожирение, нейродегенерация, связанная со старением, включая болезнь Альцгеймера, инсульт, резистентность к инсулину и 35 атеросклероз. Было показано, что неорганическая форма селена, селенит натрия, влияет на митохондриальную функцию в определенных обстоятельствах. Mehta и др. показали, что маркер митохондриального биогенеза, PGC1a, увеличивается в ишемизированной ткани головного мозга, и что селенит натрия дополнительно увеличивает PGC1a после ишемии и рециркуляции (Mehta et al., BMC Neuroscience 2012 13:79). Tirosh и др. показали, 40 что высокая, но не промежуточная доза селенита натрия предотвращает гаптен-индуцированное ухудшение митохондриальной функции из-за гаптен-индуцированного воспаления в ткани толстой кишки (Tirosh et al. Nutrition 2007 23:878). Эти результаты свидетельствуют о том, что неорганический селен может повлиять на митохондриальную функцию в клетках, подвергающихся повреждению. Тем не менее, некоторые 45 исследования показали, что селенит натрия является менее биодоступным, чем другие формы селена, подвергая сомнению его эффективность (Rider et al., J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2010 94(1): 99-110).

Кроме того, результаты, приведенные в литературе, показывают, что различные

химические формы селена имеют разную биологическую активность. Например, селенозолидин был более эффективен в снижении количества опухолей легких, чем селенометионин (Pferschke et al., J Biochem Molecular Toxicology 2012 26:344). Barger и др. показали, что у мышей, которых кормили различными источниками селена,

5 например, селенометионином, селенитом натрия и селенизованными дрожжами, наблюдали различное действие на экспрессию генов и на специфические функциональные пути митохондриальной структуры и функции (Barger et al., Genes and Nutrition 2012 7: 155).

Из-за очевидной разницы в биоактивности и доступности различных химических

10 форм селена существует необходимость в идентификации химических форм селена и характеризации их воздействия на биологические процессы. Характеризация этого воздействия на биологические процессы может привести к регуляции важных биологических процессов с помощью медицины для предотвращения или борьбы с заболеваниями, такими как заболевания, связанные с митохондриальной дисфункцией.

15 Заболевания, связанные с митохондриальной дисфункцией, можно предотвращать или лечить введением определенных химических форм селена, которые снижают митохондриальную дисфункцию или повышают митохондриальную функцию в одном или нескольких типах клеток животных или человека. Одним из объяснений изменения биоактивности может быть то, что различные формы селена оказывают различное

20 влияние на биологические пути на молекулярном уровне.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящая заявка относится к селеноорганическим соединениям, композициям и способам применения соединений и композиций. Указанные соединения включают 5'-метилселеноаденозин ("соединение С"), Se-аденозил-L-гомоцистеин ("соединение D"), 25 гамма-глутамил-метилселеноцистеин ("соединение Е"), соединение формулы I, соединение формулы II, соединение формулы III и их комбинации. Как описано в настоящем документе, композиции и их комбинации подходят для усиления митохондриальной функции, для лечения митохондриальной дисфункции, для лечения болезни Альцгеймера, а также для модулирования метаболизма глюкозы тканеспецифическим и 30 соответствующим ткани образом.

В одном аспекте настоящей заявки различные химические формы органического селена идентифицированы как биологически активные. Селеносодержащие соединения, как описано в настоящем документе, могут быть получены из селенизованных дрожжей или могут быть синтезированы химическим способом, как описано в настоящем 35 документе. Селенизованные дрожжи содержат много соединений селена и серы, но не все из соединений селена в селенизованных дрожжах влияют на биологические процессы. Кроме того, смесь соединений селена и серы в селенизованных дрожжах, как было показано, является ингибирующей по отношению друг к другу или оказывает негативное воздействие на биологические процессы.

40 В другом аспекте настоящей заявки предложены аналоги или производные биологически активных соединений селена, описанных в настоящем документе. Аналоги и/или производные селеносодержащих соединений могут быть получены синтетическим путем. В некоторых вариантах реализации аналоги обладают повышенной стабильностью, пониженным окислением, увеличенным периодом полураспада и/или 45 воздействуют на соединения определенной ткани.

В другом аспекте настоящей заявки было показано, что различные химические формы селена имеют различную тканевую специфичность (например, некоторые соединения являются активными для нейрональных клеток, но не клеток печени). Кроме

того, та же сelenосодержащая композиция может активировать транскрипционный активатор в одном типе клеток, в то время как она инактивирует тот же активатор транскрипции в другом типе клеток. Эта дифференциальная активность и тканеспецифичность различных сelenосодержащих соединений и их комбинаций является 5 непредвиденной и неожиданной.

В одном аспекте настоящей заявки предложены композиции, содержащие соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы II, соединения формулы (III) и их комбинаций. В других вариантах 10 реализации одно или более из этих соединений могут быть выделены и/или очищены.

В других вариантах реализации композиции могут не включать одно или более из 15 5'-Метилтиоаденозина, S-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метил-цистеина или глутамил-селеноцистеина, так как одно или более из этих соединений может быть нецелесообразным для композиции или ингибирующим для других соединений в композиции.

В другом аспекте настоящей заявки предложены способы применения композиций, описанных в настоящем документе, для усиления митохондриальной функции, лечения митохондриальной дисфункции, лечения болезни Альцгеймера и/или модулирования метаболизма глюкозы.

20 В вариантах реализации способ лечения болезни Альцгеймера включает: введение субъекту эффективного количества композиции, при этом композиция содержит 5'-Метилселеноаденозин, соединение формулы (I) или их смеси. В других вариантах реализации одно или более из этих соединений могут быть выделены и/или очищены.

25 В других вариантах реализации способ лечения болезни Альцгеймера включает: введение субъекту эффективного количества композиции, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III). В вариантах реализации настоящего изобретения одно или более из этих соединений могут быть 30 выделены и/или очищены.

35 В других вариантах реализации способ ингибиования накопления В-амилоида в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I) и их смесей, при этом эффективное количество ингибирует накопление В-амилоида в одной или более нейрональных клетках по сравнению с нейрональными 40 клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более из этих соединений могут быть выделены и/или очищены.

45 В другом варианте реализации способ ингибиования накопления В-амилоида в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество ингибирует накопление В-амилоида в нейрональных клетках по сравнению с нейрональными клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более из этих соединений могут быть выделены и/или очищены.

В вариантах реализации способ ингибиравания фосфорилирования тау-белка в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения

5 формулы (I) и их смесей, при этом эффективное количество ингибирирует фосфорилирование тау-белка в одной или более нейрональных клетках по сравнению с нейрональными клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более из этих соединений могут быть выделены и/или очищены.

10 В других вариантах реализации способ ингибиравания фосфорилирования тау-белка в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-

15 метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество ингибирирует фосфорилирование тау-белка в нейрональных клетках по сравнению с нейрональными клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

20 В вариантах реализации композиция содержит 5'-Метилселеноаденозин или соединение формулы (I) или их селеногликозид. В других вариантах реализации указанная композиция может не включать глутамил-селеноцистеин, метионин или селенометионин из-за их потенциального ингибирующего действия в композиции на активные соединения в композиции.

25 В некоторых вариантах реализации эффективное количество, вводимое субъекту, составляет 200 микрограммов или менее в день. В вариантах реализации композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту один раз в день.

В другом аспекте способ усиления митохондриальной функции в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из клеток скелетной мускулатуры, нейрональных клеток и их комбинаций, включает: введение эффективного количества композиции одной или более клеткам, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (III) и их комбинаций, при этом эффективное количество усиливает 30 митохондриальную функцию по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

35 В других вариантах реализации способ усиления митохондриальной функции в одной или более клетках печени включает: введение эффективного количества композиции одной или более клеткам печени, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения 40 формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество усиливает митохондриальную функцию по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

45 В другом аспекте предложен способ модулирования метаболизма глюкозы в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из клеток печени, скелетной

мускулатуры и их смесей, при этом указанный способ включает: введение эффективного количества композиции одной или более клеткам, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-

5 метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество модулирует метаболизм глюкозы по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

В вариантах реализации способ снижения экспрессии комплекса глюкозо-6-фосфатазы

10 в одной или более клетках печени включает: введение эффективного количества композиции одной или более клеткам, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-

Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-
15 метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество ингибирует экспрессию глюкозо-6-фосфатазы по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Прилагаемые чертежи, которые включены и составляют часть настоящего описания,

20 иллюстрируют несколько аспектов настоящего изобретения и совместно с описанием служат для пояснения принципов настоящего изобретения. Краткое описание чертежей представляет собой следующее:

Фиг. 1 показывает повышенный митохондриальный ("МТ") потенциал (флуоресценция) при обработке почечных клеток HEK293T 5'-Метилселеноаденозином 25 ("соединение С"), но не Se-Аденозил-L-гомоцистеином ("соединение D"). Изображения были получены при одном и том же времени обработки и увеличении под флуоресцентным микроскопом.

Фиг. 2 показывает повышенный митохондриальный ("МТ") потенциал при обработке клеток скелетной мускулатуры C2C12 соединениями С (5'-Метилселеноаденозин) и D 30 (Se-Аденозил-L-гомоцистеин). Серосодержащие аналоги Н (5'-Метилтиоаденозин) и I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) снижали митохондриальный потенциал во всех концентрациях.

Фиг. 3 показывает временное повышение митохондриального ("МТ") потенциала в нейрональных клетках человека IMR-32, обработанных соединениями С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-
35 метилселеноцистеин) или их комбинациями через 6 часов и 24 часа. Их серосодержащие аналоги Н (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин), J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) и их комбинации также демонстрируют временное повышение митохондриальной функции. Данные были нормализованы по интенсивности 40 флуоресценции окрашенных клеточных ядер. * обозначает Р-величины по сравнению с контролем.

Фиг. 4 показывает, что неоднократная обработка посредством С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-
45 метилселеноцистеин) или их серосодержащими аналогами Н (5'-Метилтиоаденозин), I (S- Аденозил-L-гомоцистеин), J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) увеличивала митохондриальный (МТ) потенциал в нейрональных клетках IMR-32. Клетки однократно обрабатывали соединениями в течение 48 часов (ч.) (верхнее изображение) или дважды соединениями в течение 48 часов в целом (нижнее изображение). Данные были

нормализованы по интенсивности флуоресценции окрашенных клеточных ядер.

Фиг. 5 показывает отсутствие токсических эффектов соединений С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) или их комбинаций на жизнеспособность (что показывает OD490 нм) нейрональных клеток IMR-32 человека в течение периода времени 72 часа. В то же время, серосодержащие аналоги Н (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин), J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) и их комбинации проявили небольшое снижение в жизнеспособности в течение периода времени 72 часа. Результаты представлены как средние значения + СО (стандартное отклонение); n=8.

Фиг. 6 показывает восстановление митохондриальной функции с помощью соединений D и Е в клетках коры головного мозга крыс, которых подвергали стрессу посредством 10 микромоль кальция. На рисунке показана гистограмма дыхания нормальных митохондрий (верхняя линия), где конечный OCR представляет собой измеренное расстояние между концом линии графика и осью абсцисс. Нижняя линия показывает ингибицию дыхания митохондрий посредством 10 микромоль кальция. Две линии в середине представляют дыхание митохондрий в присутствии соединений С или D и 10 микромоль кальция.

Фиг. 7 показывает значительное увеличение митохондриального (МТ) потенциала в клетках печени мышей AML-12, обработанных комбинацией соединений селена С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) (150 ppb каждого соединения) в сравнении с комбинацией Н (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) и J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) через 6 и 24 часа. Данные были нормализованы по интенсивности флуоресценции окрашенных клеточных ядер. Р-величины, представленные в виде гистограмм, определяли путем сравнения группы СДЕ с контролем или НИJ группой.

Фиг. 8 показывает преобладающую экспрессию митохондриального разобщающего белка 2 (Ucp2) в клетках печени мышей AML-12 и понижающую регуляцию его экспрессии с помощью комбинации соединений С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) (150 ppb каждого соединения). (А) Относительная экспрессия митохондриального разобщающего белка 1 (Ucp1) и Ucp2 в нормальных клетках AML-12 (после обработки носителем-водой в течение 6 часов), n=4, как обозначено на гистограмме. (Б) Отсутствие эффекта от комбинации С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) на экспрессию Ucp1. (С) Экспрессия Ucp2 подавляется комбинацией С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин). Данные представлены как средние значения ± СО от обозначенного количества образцов в каждой гистограмме. Различные буквы (а против б) в гистограмме означают существенное различие между этими группами (Р<0,05).

Фиг. 9 показывает отсутствие токсического эффекта от соединений С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин), Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) и их комбинаций или их серосодержащих аналогов Н (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин), J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) и их комбинаций на жизнеспособность (что показывает OD490 нм) клеток печени мышей AML-12.

Фиг. 10 показывает понижающую регуляцию экспрессии Ucp2, Ucp3 и Пресенилина (PSEN) в нейрональных клетках человека IMR-32 после обработки комбинацией соединений С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) (50 ppb каждого соединения). (А) Экспрессия мРНК

Ucp2 через 6 и 24 часа. (B) Экспрессия мРНК Ucp3 через 6 и 24 часа. (C) Относительный уровень мРНК PSEN и PSEN2 в нейрональных клетках человека IMR-32, обработанных носителем (вода) через 6 и 24 часа. (D) Экспрессия мРНК PSEN после нормализации по количеству мРНК актина бета (ACTB) в нейрональных клетках человека IMR-32,

- 5 обработанных комбинацией C (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин), E (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) (150 ppb каждого соединения) или комбинацией H (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) и J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) (150 ppb каждого соединения) через 6 и 24 часа. (E) Экспрессия PSEN2 после нормализации по уровню мРНК (ACTB) в нейрональных клетках человека
 10 IMR-32, обработанных комбинацией C (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и E (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) или комбинацией H (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) и J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) через 6 и 24 часа. Данные представлены как среднее значение \pm СО для 3-4 образцов на группу. Различные буквы алфавита (a против b) и различные номера (1 против 2)
 15 на гистограмме обозначают значительное различие между этими группами ($P<0,05$).

Фиг. 11 показывает, что комплексы гамма секретазы PSEN и Никастрина являлись целями соединения C (5'-Метилселеноаденозин), что определено посредством анализов вестерн-блоттинга и полимеразной цепной реакции в реальном времени («РТ-ПЦР»). (A) Фотографии анализа вестерн-блоттинга различных белков (ключевых для

- 20 образования бляшек при болезни Альцгеймера (AD) в нейрональных клетках человека IMR-32, обработанных 150 ppb соединения C (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) или E (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) в течение 6 и 24 часов. (B-C) Количественный анализ уровней (B) PSEN и (C) белка Никастрина посредством вышеуказанного вестерн-блоттинга (после обработки перечисленными соединениями
 25 в течение 24 часов, правый рисунок). Данные представлены как среднее значение \pm СО для 3 образцов. (D-G) Количественный анализ РТ-ПЦР экспрессии (D-E) PSEN и (F-G) Никастрина в нейрональных клетках человека IMR-32, обработанных носителем-водой (контроль) и перечисленными соединениями для (D, F) через 6 и (E, G) 24 часа. Данные представлены как среднее значение \pm СО для 4 образцов. Различные буквы (a против
 30 b, a против с или b против с) на гистограммах обозначают значительное различие между этими двумя группами ($P<0,05$). Буквы «a, b» обозначают отсутствие значительного отличия от a или b.

Фиг. 12 показывает, что соединение C (5'-Метилселеноаденозин) представляет собой новый ингибитор фосфорилирования тау-белка и понижающий регулятор киназа-3-

- 35 бета-гликогенсинтазы ("GSK3b"), что определено посредством анализов вестерн-блоттинга и РТ-ПЦР. (A) Фотографии анализа вестерн-блоттинга различных белков (ключевых при образовании узлов при AD) в нейрональных клетках человека IMR-32, обработанных 150 ppb соединения C (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) или E (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) в течение 6 и 24 часов. (B-
 40 E) Количественный анализ (B) фосфорилированного тау-белка на остатке серина в положении 396 ("pTau S396") и (C) фосфорилированного тау-белка на остатке серина в положении 400, на остатке треонина в положении 403 и остатке серина в положении 404 ("pTau S400/T403/S404"), (D) общего тау-белка и (E) объединенных pTauS396 и pTau S400/T403/S404 на общие уровни тау-белка в вышеописанных вестерн-блоттингах (после
 45 24 часовой обработки, правые рисунки). Данные представлены как среднее значение \pm СО для 3 образцов. (F) Количественный анализ уровней белка GSK3b в вышеуказанных вестерн-блоттингах клеток IMR-32, обработанных носителем-водой (контроль) или соединениями в течение 24 часов. Данные представлены как среднее значение \pm СО для

3 образцов. (G-H) Количественный РТ-ПЦР анализ экспрессии мРНК GSK3b в нейрональных клетках человека IMR-32, обработанных носителем-водой (контроль) и перечисленными соединениями в течение (G) 6 и (H) 24 часов. Данные представлены как среднее значение \pm СО для 4 образцов. Различные буквы (а против b, а против c 5 или b против c) на гистограммах обозначают значительное различие между этими двумя группами ($P<0,05$). Буквы «a, b» или «b, c» обозначают отсутствие значительного отличия от a или b или c.

Фиг. 13 показывает сниженное FOXO фосфорилирование и увеличенную экспрессию белка PGC1a в нейрональных клетках человека IMR-32 посредством комбинации 10 соединений С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) (150 ppb каждого соединения).

Фиг. 14 показывает анализ вестерн-блоттинга различных других сигнальных молекул, включая фосфорилированный Forkhead box белок O4, фосфорилированный по треонину 28 ("pFOXO4 T28"), Forkhead box белок O4 ("FOXO4"), фосфорилированный гомолог 15 онкогена вируса тимомы мышей 1 по треонину 308 ("pAktT308"), фосфорилированный гомолог онкогена вируса тимомы мышей 1 по серину 471 ("pAktS471"), Akt, и гамма коактиватор 1 альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом ("PGC1a") в нейрональных клетках IMR-32, обработанных соединениями С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) или Е (Гамма-глутамил-20 метилселеноцистеин), 150 ppb для каждого соединения. (А) Фотографии вестерн-блоттинга. (В-С) Количественный анализ фосфорилированного forkhead box белка 04 по треонину в положении 28 (pFoxo4 T28) в вышеуказанных вестерн-блоттингах в клетках AML-12, обработанных перечисленными соединениями, для (В) 6 и (С) 24 часов. Данные представлены как среднее значение \pm СО для 3 образцов. Различные буквы (а 25 против b) на гистограммах обозначают существенное различие между этими двумя группами ($P<0,05$). Буквы «a, b» не обозначают никаких существенных отличий от a или b.

Фиг. 15 показывает анализ вестерн-блоттинга различных других сигнальных молекул, включая FOXOs, PDK1, AKT, Gsk3a/b, 4EBP1, Elf2be и PGC1a в клетках печени мышей 30 AML-12, обработанных комбинацией С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин) (50 ppb для каждого соединения) (А) Фотографии вестерн-блоттинга. (В-С) Количественный анализ (В) фосфорилированного Foxo3 по T32, и (С) фосфорилированного Foxo4 по T28 в клетках AML-12, представленных в вышеуказанных вестерн-блоттингах. Данные представлены 35 как среднее значение \pm СО для 3 образцов. Различные буквы (а против b) на гистограммах обозначают существенное различие между этими двумя группами ($P<0,05$).

Фиг. 16 показывает анализ вестерн-блоттинга различных перечисленных молекул в клетках печени мышей AML-12 после обработки носителем (вода, контроль) или 40 соединением С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) или Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин), 150 ppb для каждого соединения, в течение 6 и 24 ч.

Фиг. 17 показывает, что экспрессия каталитической субъединицы глюкозо-6-фосфатазы ("G6pc") в клетках печени мышей AML-12 значительно снижается комбинацией соединений С (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин) и Е (Гамма-глутамил-метилселеноцистеин), но не отдельными соединениями. Клетки 45 обрабатывали носителем (контроль), отдельным соединением селена (150 частей на миллиард (ppb)) или комбинацией CDE (50 ppb для каждого соединения) а также их соответствующим серосодержащим аналогом(ами) в течение 48 ч, и затем подвергали количественному определению посредством РТ-ПЦР. Данные представлены как среднее

значение \pm СО для четырех образцов на гистограмме.

Фиг. 18 показывает схематическое представление комбинации соединений CDE в регуляции экспрессии Gбрс в клетках печени.

Фигура 19 показывает наличие Foxo-связывающих фрагментов в промоторных

5 участках генов человека GSK3B, PSEN и никастрина, а также схематическое представление действия соединения С на регуляцию медиаторов, важных в образовании бляшек и узлов в нейрональных клетках. Рисунок (А) показывает расположение пяти FOXO1/3/4-связывающих фрагментов человеческого GSK3B промотора. Рисунок (В) показывает местоположение двух FOXO1/3/4-связывающих фрагментов человеческого 10 PSEN промотора. Рисунок (С) показывает местоположение FOXO1/3/4-связывающего фрагмента человеческого промотора Никастрина (NCSTN). Рисунок (Д) показывает схематическое представление действия соединения С на регуляцию медиаторов, важных в образовании бляшек и узлов в нейрональных клетках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

15 Определения

В настоящем документе термины "введение" и "вводимый" относятся к действию обеспечения лекарственного средства, пролекарства или другого агента или терапевтического лечения (например, композиций согласно настоящей заявке) субъекту (например, субъекту или клеткам, тканям и органам *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*).

20 Примерные пути введения в организм человека могут представлять собой пути через глаза (офтальмологический), рот (пероральный), кожу (местный или трансдермальный), нос (назальный), легкие (ингаляционный), слизистую оболочку полости рта (буккальный), ухо, ректальный, вагинальный, путем инъекции (например, внутривенно, подкожно, интрапатоморально, внутрибрюшно и т.д.) и тому подобное.

25 Термин "алкил" относится к разветвленной или неразветвленной насыщенной углеводородной группе, содержащей от 1 до 24 атомов углерода. Предпочтительные "алкильные" группы в настоящем документе содержат от 1 до 16 атомов углерода; т.е. С₁₋₁₆ алкил. Примеры алкильной группы включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, пропил, изо-пропил, бутил, изо-бутил, вторичный-бутил, третичный-бутил, пентил, изо- пентил, нео-пентил, гексил, изо-гексил, 3-метилпентил, 2,3-диметилбутил, нео-гексил, гептил, октил, нонил, децил, ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил, пентадецил и гексадецил. Наиболее предпочтительным является "низший алкил", который относится к алкильной группе, содержащей от одного до шести, более предпочтительно от одного до четырех атомов углерода. Алкильная группа может быть необязательно замещена 30 посредством ацила, амино, амида, азидо, карбоксила, алкила, арила, галогена, гуанидинила, оксо, сульфанила, сульфенила, сульфонила, гетероциклила или гидроксильной группы.

35 Термин "щелочной металл" относится к солям металлов, включая, но не ограничиваясь ими, подходящие соли щелочных металлов (группы Ia), соли щелочноземельных металлов (группа Ia) и других физиологически приемлемых металлов. Такие соли могут быть получены из алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия и цинка.

40 Термин "алкенил" относится к прямой или разветвленной углеводородной цепи, содержащей по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод. В иллюстрирующих 45 вариантах реализации "алкенил" относится к углеводороду, содержащему 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода, т.е. С₁₋₁₀ алкениле. Примеры алкенильной группы включают, но не ограничиваются ими, этен, пропен, бутен, пентен, гексен, гептен, октен, нонен и децен. Алкенильная группа может быть необязательно замещена

посредством амино, алкила, галогена или гидроксильной группы.

Термин "амидо" относится или к С-амидо группе, такой как $\text{-CONR}'\text{R}''$, или к N-амидо группе, такой как $\text{-NR}'\text{COR}''$, при этом R' и R'' в настоящем определении независимо представляют собой водород, алкил, алкенил, алкинил, алкокси, карбоцикл, гетероцикл, 5 арил или аралкил. "Сульфамидо" группа включает $\text{-NR}'\text{-SO}_2\text{-R}''$. Наиболее предпочтительно, R' и R'' представляют собой водород, алкил, арил или аралкил.

Термин "алкинил" относится к прямой или разветвленной углеводородной цепи, содержащей по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод. В иллюстрирующих вариантах реализации "алкинил" относится к углеводороду, содержащему 2, 3, 4, 5, 6, 10 7, 8, 9 или 10 атомов углерода, т.е. C_{2-10} алкинил. Примеры алкинильной группы включают, но не ограничиваются ими, этин, пропин, бутин, пентин, гексин, гептин, октин, нонин и децин. Алкинильная группа может быть необязательно замещена посредством амино, алкила, галогена или гидроксильной группы.

Термин "арил" относится к карбоциклической ароматической системе, содержащей одно, два или три кольца, при этом такие кольца могут быть соединены вместе в форме боковых ответвлений или могут быть конденсированы. Термин "конденсированный" обозначает, что второе присутствующее кольцо имеет (т.е. присоединено или образовано) два смежных общих атома (т.е. сопряжены) с первым кольцом. Термин "конденсированный" (fused) является эквивалентным термину "конденсированный" (condensed). Термин "арил" охватывает ароматические группы, такие как фенил, нафтил, тетрагидронафтил, тетралин, индан, инден и бифенил. Арильная группа может необязательно быть замещена посредством амино, алкила, галогена, гидроксила, карбоцикла, гетероцикла или другой арильной группы.

Термин "циклоалкил" относится кmonoциклическому или частично насыщенному углеводородному кольцу, при этом число атомов в кольце указано посредством диапазона чисел. В иллюстрирующих вариантах реализации "циклоалкил" относится к углеводородному кольцу, как определено выше, содержащему 3-12 атомов в кольце (т.е. C_{3-12} циклоалкил). В настоящем документе, циклоалкил охватывает 25 моноциклические, мостиковые, спиро, конденсированные, бициклические и трициклические кольцевые структуры. Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклогептенил, норборнил, декалин, адамантил и циклооктил. Циклоалкильная группа может быть необязательно замещена посредством амино, алкила, галогена или гидроксильной группы.

Термин "аралкил" относится к арил-замещенным алкильным фрагментам. Предпочтительные аралкильные группы представляют собой "низшие аралкильные" группы, содержащие арильные группы, присоединенные к алкильным группам, содержащим от одного до шести атомов углерода. Примеры таких групп включают 30 бензил, дифенилметил, трифенилметил, фенилэтил и дифенилэтил. Термины бензил и фенилметил являются взаимозаменяемыми.

Термин "арилокси" относится к арильным группам, как определено выше, присоединенным к атому кислорода. Арилокси группы могут необязательно быть замещены галогеном, гидроксилем или алкильной группой. Примеры таких групп включают фенокси, 4-хлор-3-этилфенокси, 4-хлор-3-метилфенокси, 3-хлор-4-45 этилфенокси, 3,4-дихлорфенокси, 4-метилфенокси, 3-трифторметоксифенокси, 3-трифторметилфенокси, 4-фторфенокси, 3,4-диметилфенокси, 5-бром-2-фторфенокси, 4-бром-3-фторфенокси, 4-фтор-3-метилфенокси, 5,6,7,8-тетрагидронафтилокси, 3-

изопропилфенокси, 3-циклогексилфенокси, 3-этилфенокси, 4-трет-бутилфенокси, 3-пентафторэтилфенокси и 3-(1,1,2,2-тетрафторэтилфенокси)фенокси.

Термин "алкокси" относится к окси-содержащим группам, замещенным алкильной или циклоалкильной группой. Примеры включают, не ограничиваясь, метокси, этокси, трет-бутокси и циклогексилокси. Наиболее предпочтительными являются "низшие алкокси" группы, содержащие от одного до шести атомов углерода. Примеры таких групп включают метокси, этокси, пропокси, бутокси, изопропокси и трет-бутокси группы.

Термин "аралкокси" относится к окси-содержащим аралкильным группам,

присоединенным через атом кислорода к другим группам. "Низшие аралкокси" группы представляют собой такие фенильные группы, присоединенные к низшей алкокси группе, как описано выше. Примеры таких групп включают бензилокси, 1-фенилэтокси, 3-трифторметоксибензилокси, 3-трифторметилбензилокси, 3,5-дифторбензилокси, 3-бромбензилокси, 4-пропилбензилокси, 2-фтор-3-трифторметилбензилокси и 2-фенилэтокси.

Термин "ацил" относится к $-C(=O)R$, при этом R, использованный в данном определении, представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, карбоцикл, гетероцикл, арил или аралкил. Наиболее предпочтительно, R представляет собой водород, алкил, арил или аралкил.

Термин "карбоксил" относится к $-R'C(=O)OR'$, где R' и R" в настоящем определении независимо представляют собой водород, алкил, алкенил, алкинил, карбоцикл, гетероцикл, гетероциклоалкил, арил, эфир или аралкил или R' кроме того может быть присоединен ковалентной связью. "Карбоксил" включает и карбоновые кислоты, и сложные эфиры карбоновых кислот. Термин "карбоновая кислота" относится к карбоксильной группе, в которой R" представляет собой водород или соль. Такие кислоты включают муравьиную, уксусную, пропионовую, масляную, валериановую кислоту, 2-метилпропионовую кислоту, оксиран-карбоновую кислоту и циклопропанкарбоновую кислоту. Термин "сложный эфир карбоновой кислоты" или "сложный эфир" относится к карбоксильной группе, в которой R" представляет собой алкил, алкенил, алкинил, карбоцикл, гетероцикл, арил или аралкил. Примеры карбоновых кислот включают, но не ограничиваются ими, муравьиную кислоту, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, бутановую кислоту, пентановую кислоту, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, циклопропанкарбоновую кислоту, циклобутанкарбоновую кислоту, циклопентанкарбоновую кислоту, циклогексанкарбоновую кислоту, циклогептанкарбоновую кислоту, циклооктанкарбоновую кислоту или циклононанкарбоновую кислоту.

Термин "карбонил" относится к C=O фрагменту, также известному как "оксо" группа.

Термин "гетероцикл" или "гетероциклик" или "гетероциклическое кольцо" относится

к необязательно замещенному, насыщенному или ненасыщенному, ароматическому или неароматическому циклическому углеводороду, содержащему от 3 до 12 или от 5 до 6 атомов углерода, в котором по меньшей мере один из атомов в кольце представляет собой O, N, S, P или Se. Например, в некоторых вариантах реализации кольцевой N атом из гетероциклила представляет собой атом, связующий с $-C(O)$, с образованием амида, карбамата или мочевины. В иллюстрирующих вариантах реализации "гетероциклик" относится к циклическому углеводороду, как описано выше, содержащему 4, 5 или 6 атомов в кольце (т.е. C₄₋₆ гетероциклик). Примеры гетероциклической группы включают, но не ограничиваются ими, азиридин, оксиран,

тииран, азетидин, оксетан, тиетан, пирролидин, имидазол, тетрагидрофуран, пиран, тиопиран, тиоморфолин, тиоморфолин S-оксид, оксазолин, тетрагидротиофең, пиперидин, тетрагидропиран, тиан, имидазолидин, оксодиоксоленил, оксазолидин, тиазолидин, диоксолан, дитиолан, пиперазин, оксазин, дитиан, диоксан, пиридинил, 5 фуранил, бензофуранил, изобензофуранил, пирролил, тиенил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, индолил, имидазолил, тиазолил, тиадиазолил, пирамидинил, оксазолил, триазинил и тетразолил. Иллюстрирующие гетероциклы включают бензимидазол, дигидротиофең, диоксин, диоксан, диоксолан, дитиан, дитиазин, дитиазол, дитиолан, фуран, индол, 3-Н индазол, 3-Н-индол, индолизин, изоиндол, изотиазол, изоксазол, 10 морфолин, оксазол, оксадиазол, оксатиазол, оксатиазолидин, оксазин, оксадиазин, пиперазин, пиперидин, пурина, пиран, пиразин, пиразол, пиридин, пирамидин, пирамидин, пиридазин, пиррол, пирролидин, тетрагидрофуран, тетразин, тиадиазин, тиадиазол, тиатриазол, тиазин, тиазол, тиофен, триазин и триазол. Гетероцикл может быть необязательно замещен посредством амино, алкила, алкенила, алкинила, галогена, 15 гидроксила, карбоцикла, тио, других гетероциклических или арильных групп.

Термин "гетероарил" относится к циклическому углеводороду, в котором по меньшей мере один из атомов в кольце представляет собой O, N, S, P или Se, кольцо характеризуется делокализованными [p] электронами (ароматичность), разделенными среди членов кольца, и в котором число кольцевых атомов обозначается диапазоном 20 чисел. Гетероарильные фрагменты, как определено в настоящем документе, содержат связывающие атомы C, N, S, P или Se. Например, в некоторых вариантах реализации кольцевой N атом из гетероарила представляет собой атом, связывающий с -C(O), с образованием амида, карбамата или мочевины. В иллюстрирующих вариантах реализации "гетероарил" относится к циклическому углеводороду, как описано выше, 25 содержащему 5 или 6 кольцевых атомов (т.е. C₅₋₆ гетероарил). Примеры гетероарильной группы включают, но не ограничиваются ими, пиррол, фуран, тиен, оксазол, тиазол, изоксазол, изотиазол, имидазол, пиразол, оксадиазол, тиадиазол, триазол, тетразол, пиридин, пирамидин, пиразин, пиридазин и триазин.

30 Термин "гидрокси" или "гидроксил" относится к заместителю -OH.

Термин "оксо" " относится к заместителю =O.

Термин "нитро" относится к NO₂.

Термин "азидо" относится к N₃.

Термин "серосодержащий аналог(и)" относится к аналогу соединения, 35 представляющему интерес, в котором один или более атомов селена замещены одним или более атомами серы, соответственно.

Термин "сульфанил" относится к -SR', в котором R' в настоящем определении представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, карбоцикл, гетероцикл, арил или аралкил.

40 Термин "сульфенил" относится к -SOR', где R' в настоящем определении представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, карбоцикл, гетероцикл, арил или аралкил.

Термин "сульфонил" относится к -SOR', где R' представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, карбоцикл, гетероцикл, арил или аралкил.

45 Термин "кетон" относится к фрагменту, содержащему по меньшей мере одну карбонильную группу, где углерод карбонильной группы связан с двумя другими атомами углерода. В иллюстрирующих вариантах реализации "кетон" относится к карбонилсодержащему фрагменту, как описано выше, содержащему 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода (т.е. C₃₋₁₀ кетон). Примеры кетоновых групп включают, но не

ограничиваются ими, ацетон, бутанон, пентанон, гексанон, гептанон, октанон, nonанон, деканон, циклобутанон, циклопентанон, циклогексанон, циклогептанон, циклооктанон, циклононанон и циклодеканон.

Термин "амино" относится к первичной, вторичной или третичной аминогруппе

- 5 формулы $-NR'R"$, где R' и $R"$ в настоящем определении независимо представляют собой водород, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, арил, карбоксил, циклоалкил, гетероцикл или другой амино (в случае гидразида), или R' и $R"$ совместно с атомом азота, к которому они присоединены, образуют кольцо, содержащее 4-8 атомов. Таким образом, термин "амино" включает незамещенные, монозамещенные (например,
- 10 моноалкиламино или моноариламино) и дизамещенные (например, диалкиламино или аралкиламино) аминогруппы. Аминогруппы включают $-NH_2$, метиламино, этиламино, диметиламино, диэтиламино, метилэтиламино, пирролидин-1-ил или пиперидино, морфолино и т.д. Другие иллюстрирующие "амино" группы, образующие кольцо, включают пирролил, имидазолил, пиразолил, изотиазолил, изоксазолил, пиридинил,
- 15 пиразинил, пиридинил, пиридазинил, индолизинил, имидазолил, изоиндолил, индолил, индазолил, пуринил, хинолизинил. Кольцо, содержащее аминогруппу, может быть необязательно замещено другим амино, алкилом, алкенилом, алкинилом, галогеном или гидроксильной группой.

Термин "амин" относится к первичной, вторичной или третичной аминогруппе

- 20 формулы $-NR'R"$, где R' и $R"$ в настоящем определении независимо представляют собой водород, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, арил, карбоксил, циклоалкил, гетероцикл или другой амино (в случае гидразида), или R' и $R"$ совместно с атомом азота, к которому они присоединены, образуют кольцо, содержащее 4-8 атомов. Таким образом, термин "амино" в настоящем документе включает незамещенные, монозамещенные (например, моноалкиламино или моноариламино) и дизамещенные (например, диалкиламино или аралкиламино) аминогруппы. Аминогруппы включают $-NH_2$, метиламино, этиламино, диметиламино, диэтиламино, метилэтиламино, пирролидин-1-ил или пиперидино, морфолино и т.д. Другие иллюстрирующие "амино" группы, образующие кольцо, включают пирролил, имидазолил, пиразолил, изотиазолил, изоксазолил, пиридинил, пиразинил, пиридинил, пиридазинил, индолизинил, имидазолил, изоиндолил, индолил, индазолил, пуринил, хинолизинил. Кольцо, содержащее аминогруппу, может быть необязательно замещено другим амино, алкилом, алкенилом, алкинилом, галогеном или гидроксильной группой.

35 Термин "спирт" относится к "гидрокси", или "гидроксил" относится к заместителю $-OH$.

40 Термин "аминоспирт" относится к функциональной группе, содержащей и спирт, и аминогруппу. В настоящем документе "аминоспирты" также относятся к аминокислотам, как определено выше, содержащим углерод, связанный со спиртом вместо карбоксильной кислотной группы. В иллюстрирующих вариантах реализации термин "аминоспирт" относится к аминоспирту, как определено выше, в котором амин связан с углеродом, соседним с углеродом, несущим спирт. В иллюстрирующих вариантах реализации "аминоспирт" относится к амин- и спиртосодержащему фрагменту, как описано выше, содержащему 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 атомов углерода (т.е. C_{1-12} аминоспирт). Примеры аминоспиртов включают, но не ограничиваются ими, этианоламин, гептаминол, изоэтарин, норэпинефрин, пропаноламин, сфингозин, метаноламин, 2-амино-4-меркаптобутан-1-ол, 2-амино-4-(метилтио)бутан-1-ол, цистеинол, фенилглицинол, пролинол, 2-амино-3-фенил-1-пропанол, 2-амино-1-пропанол,

циклогексилглицинол, 4-гидрокси-пролинол, лейцинол, трет-лейцинол, фенилаланинол, а-фенилглицинол, 2-пирролидинметанол, тирозинол, валинол, серинол, 2-диметиламиноэтанол, гистидинол, изолейцинол, лейцинол, метионинол, 1-метил-2-пирролидинметанол, треонинол, триптофанол, аланинол, аргининол, глицинол, 5 глутаминол, 4-амино-5-гидроксипентанамид, 4-амино-5-гидроксипентановую кислоту, 3-амино-4-гидроксибутановую кислоту, лизинол, 3-амино-4-гидроксибутанамид и 4-гидроксипролинол.

10 Термин "аминокислота" относится к группе, содержащей карбоновую кислоту и амин, связанный с атомом углерода, соседним непосредственно с карбоксилатной группой, и включает и природные, и синтетические аминокислоты. Примеры аминокислот включают, но не ограничиваются ими, аргинин, гистидин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин, аспарагин, глутамин, цистеин, селеноцистеин, глицин, пролин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, тирозин, триптофан. Карбоксил замещен посредством H, солью, сложным эфиром, алкилом или аралкилом. Аминогруппа замещена посредством H, ацилом, 15 алкилом, алкенилом, алкинилом, карбоксилом, циклоалкилом, аралкилом или гетероцикликом.

20 Термин "эфир" относится к группе -R'-O-R", в которой R' и R" в настоящем определении независимо представляют собой водород, алкил, алкенил, алкинил, карбоцикл, гетероцикл, арил или аралкил, и R' дополнительно может быть присоединен к атому углерода ковалентной связью.

Термин "галоген" относится к атому фтора, хлора, брома или йода.

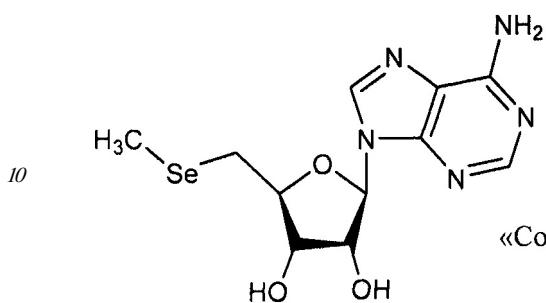
25 Термин "галид" относится к функциональной группе, содержащей атом, присоединенный к атому фтора, хлора, брома или йода. Иллюстрирующие варианты реализации, описанные в настоящем документе, могут включать "алкилгалидную", "алкенилгалидную", "алкинилгалидную", "циклоалкилгалидную", "гетероцикликогалидную" или "гетероарилгалидную" группы. В иллюстрирующих вариантах реализации "алкилгалид" относится к фрагменту, содержащему связь углерод-галоген, содержащему 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода (т.е. C₁₋₁₀ алкилгалид).

30 Примеры алкилгалидных групп включают, но не ограничиваются ими, фторметильную, фторэтильную, хлорметильную, хлорэтильную, бромметильную, бромэтильную, йодметильную и йодэтильную группы. Если не обозначено иное, любая углеродсодержащая группа, упомянутая в настоящем документе, может содержать одну или более связей углерод-галоген. В качестве неограничивающего примера, 35 алкильная группа может представлять собой, не ограничиваясь, метил, фторметил, дифторметил, трифторметил, хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, бромметил, дихлорметил, трибромметил, йодметил, дийодметил, трийодметил, хлорфторметил, дихлорфторметил и дифторхлорметил.

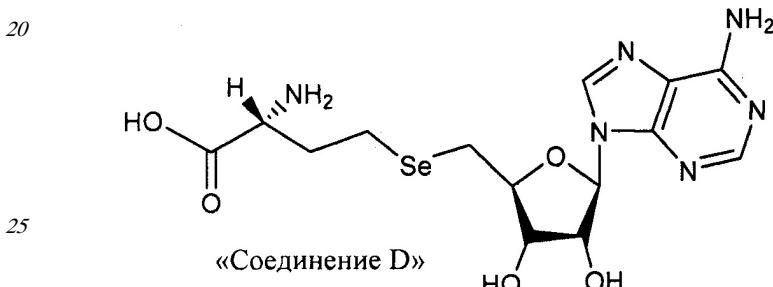
40 В соединениях, описанных в настоящем документе, гетероатомы способны иметь несколько различных валентностей. В качестве неограничивающего примера, S, Se и N могут быть нейтральными или иметь положительный заряд, и O может быть нейтральным или иметь положительный или отрицательный заряд.

45 В некоторых вариантах реализации соединения формулы (I), (II) или (III) охватывают диастереомеры и энантиомеры проиллюстрированных соединений. Энантиомеры определены как один из пары молекулярных единиц, которые являются зеркальным отображением друг друга и являются несовмещаемыми. Диастереомеры или диастереоизомеры определяются как стереоизомеры, отличные от энантиомеров. Диастереоизомеры характеризуются различиями в физических свойствах.

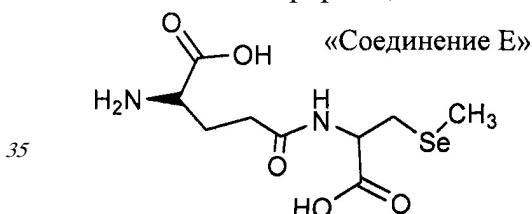
Термины "соединение С" или "Соединение С", представленные в настоящем документе, относятся к 5'-Метилселеноаденозину; также известному как (2R,4S,5S)-2-(6-амино-9Н-пурин-9-ил)-5-((метилселанил)метил)тетрагидрофуран-3,4-диол, регистрационный номер CAS 5135-40-0, и включают любые его фармацевтически приемлемые соли.



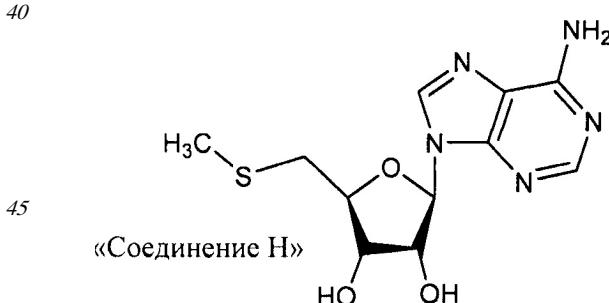
15 Термины "соединение D" или "Соединение D", представленные в настоящем документе, относятся к 5'-Селеноаденозилгомоцистеину; (2R)-2-амино-4-(((2S,3S,5R)-5-(6-амино-9Н-пурин-9-ил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метил)селанил) бутановой кислоте, регистрационный номер CAS 4053-91-2, и включают любые его фармацевтически приемлемые соли.



30 Термины "соединение Е" или "Соединение Е", представленные в настоящем документе, относятся к гамма-глутамил-метилселеноцистеину или γ -L-глутамил-Se-метил-L-цистеину; также известному как N5-(1-карбокси-2-(метилселанил)этил)-L-глутамин, или любым его фармацевтически приемлемым солям.

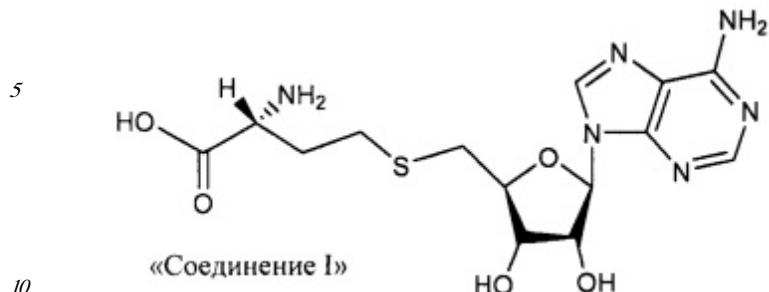


40 Термины "соединение Н" или "Соединение Н", представленные в настоящем документе, относятся к 5'-Метилтиоаденозину; 5'-S-Метил-5'-тиоаденозину, регистрационный номер CAS No. 2457-80-9 или его фармацевтически приемлемой соли.

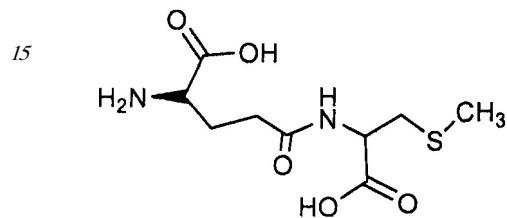


Термины "соединение I" или "Соединение I" относится к S-Аденозил-L-гомоцистеину,

также известному как (S)-5'-(S)-(3-Амино-3-карбоксипропил)-5'-тиоаденозин, регистрационный номер C AS No. 979-92-0, или его фармацевтически приемлемой соли.



Термины "соединение J" или "Соединение J", представленные в настоящем документе, относятся к γ -L-глутамил-метил-L-цистеину, также известному как Гамма-глутамил-метил-цистеин, или его фармацевтически приемлемой соли.



Термин "соединения CDE" относится к смеси соединения C, соединения D и соединения E или их фармацевтически приемлемых солей.

25 Термин "соединения HIJ" относится к смеси соединения H, соединения I и соединения J или их фармацевтически приемлемых солей.

30 Термины "аналог" и "производное" являются взаимозаменяемыми и относятся к природной или неприродной модификации по меньшей мере одного положения данной молекулы. Например, производное данного соединения или молекулы модифицировано либо путем добавления функциональной группы или атома, удаления функциональной 35 группы или атома или изменения функциональной группы или атома на другую функциональную группу или атом (в том числе, но не ограничиваясь ими, изотопы).

Термин "содержащий" относится к композиции, соединению, составу или способу, который включает и не исключает дополнительные элементы или стадии способа.

35 Термин "состоящий из" относится к соединению, композиции, составу или способу, который исключает наличие каких-либо дополнительных компонентов или стадий способа.

40 Термин «состоящий по существу из» относится к композиции, соединению, составу или способу, который включает дополнительные элементы или стадии способа, которые не оказывают существенного влияния на характеристику(и) композиции, соединения, состава или способа.

45 Термин "соединение(я)" относится к любой одной или более химическим единицам, фармацевтическому средству, лекарственному средству и тому подобным, которые можно применять для лечения или предотвращения заболевания, болезни, расстройства или нарушения функций организма. Соединения включают как известные, так и потенциальные терапевтические соединения. Соединение может быть определено как терапевтическое путем скрининга с применением способов скрининга согласно настоящей заявке. "Известное терапевтическое соединение" относится к терапевтическому соединению, которое, как было показано (например, с помощью

испытаний на животных или предшествующего опыта введения человеку) является эффективным в таком лечении. Другими словами, известное терапевтическое соединение не ограничено соединением, эффективным в лечении заболевания (например, нейродегенеративного заболевания).

5 Термин "композиция(и)" относится к комбинации одного или более соединений с другим агентом или без него, таким как, но не ограничиваясь, агент-носитель (например, одного или более селеносодержащих соединений с носителем, инертным или активным, получая композицию, особенно подходящую для диагностики или терапевтического применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*).

10 Термин "соединение" относится к составной части соединения или композиции. Например, компоненты композиции могут включать соединение, носитель и любой другой агент, присутствующий в композиции.

Термин "эффективное количество" относится к количеству композиции или соединения, достаточному для благотворного влияния или необходимых результатов.

15 Эффективное количество можно вводить в виде одного или более введений или дозировок, и оно не предназначено для ограничения определенной композиции или способа введения.

20 Термин "гидрат" относится к соединению, описанному в настоящем документе, которое ассоциировано с водой в молекулярной форме, т.е. в которой H-OH связи не разрушены, и которое может быть представлено, например, формулой $R \times H_2O$, где R представляет собой соединение, описанное в настоящем документе. Данное соединение может образовывать более одного гидрата, включая, например, моногидраты ($R \times H_2O$), дигидраты ($R_2 \times H_2O$), тригидраты ($R_3 \times H_2O$) и подобные.

25 Термин "ингибирующий" или "антагонистический" относится к свойству соединения, которое снижает, ограничивает или блокирует действие или функцию другого соединения.

30 Термин "выделенный" относится к отделению материала от по меньшей мере одного другого материала в смеси или от материалов, которые естественным образом связаны с материалом. Например, соединение, полученное синтетическим путем, отделяют от исходного материала или промежуточного соединения.

35 Термин "митохондриальный потенциал" относится к разности потенциалов на внутренней митохондриальной мемbrane, поддерживаемой суммарным движением положительных зарядов через мембрану.

Термин "модулирует" относится к изменению состояния (например, активности или количества) соединения от известного или определенного состояния.

40 Термин "необязательный" или "необязательно" относится к обстоятельству, при котором впоследствии описанное событие или обстоятельство может или не может произойти, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство имеет место, и случаи, в которых оно не происходит. "Необязательно" включает варианты реализации, в которых описанное условие присутствует, и варианты реализации, в которых описанное условие не присутствует. Например, "необязательно замещенный фенил" означает, что фенил может быть или может не быть замещен, и что описание включает и незамещенный фенил, и фенил, где присутствует замещение. "Необязательно" включает варианты реализации, в которых описанное условие присутствует, и варианты реализации, в которых описанное условие не присутствует.

45 Термин "органический селен" или "селеноорганическое соединение" относится к любым органическим соединениям, где селен замещает серу. Таким образом, термин

органический селен может относиться к любому такому соединению, которое синтезируют биологическим путем с помощью дрожжей, или так могут называться свободные органические сelenосодержащие соединения, которые синтезированы химическим путем. Примером последнего является селенометионин. В некоторых 5 случаях селеноорганические соединения включают также сelenосодержащие метаболиты.

Термины "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяющими и относятся к любому члену царства животных. Предпочтительно субъектом является млекопитающее, такое как человек, домашнее млекопитающее или млекопитающее домашнее 10 сельскохозяйственное животное.

Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, в пределах медицинских показаний, подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной 15 токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблем, или осложнений, сопоставимых с разумным соотношением польза/риска.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" относится к фармацевтически приемлемому материалу, композиции или носителю, такому как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке 20 селено содержащего соединения субъекта или его аналога или производного от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не вредным для пациента. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, 25 глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошок трагакантовой камеди; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для изготовления суппозиториев; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, 30 сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этилауран; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17)

изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Термин "пролекарство" относится к фармакологически активному или более типично неактивному соединению, которое превращается в фармакологически активный агент 40 с помощью метаболической трансформации. Пролекарства соединения любой из указанных выше формул получают путем модификации функциональных групп, присутствующих в соединении любой из формул выше, таким образом, что модификации могут быть расщеплены *in vivo* с высвобождением исходного соединения. *In vivo*, пролекарство легко подвергается химическим изменениям в физиологических условиях 45 (например, гидролизовано или подвержено действию природного фермента(ов), что приводит к высвобождению фармакологически активного агента). Пролекарства включают соединения любой из вышеуказанных формул, в которых гидрокси, амино или карбокси группа связана с любой группой, которая может быть отщеплена *in vivo*

для регенерации свободной гидроксильной, амино или карбокси группы, соответственно. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры (например, производные ацетата, формиата и бензоата) соединений любой из указанных выше формул или любого другого производного, которое после доведения до

5 физиологического pH или через действие фермента превращается в активное исходное лекарственное средство. Традиционные процедуры отбора и получения подходящих производных пролекарств описаны в данной области (см., например, Bundgaard. *Design of Prodrugs*. Elsevier, 1985).

Термин "очищенный" или "очищать" или "по существу очищенный" относится к

10 удалению компонента, такого как неактивные, ингибирующие компоненты, непрореагировавшие соединения или альтернативные соединения, полученные в процессе синтеза (например, контаминаенты) из композиции до той степени, что 10% или менее (например, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее) композиции не является активным соединением или фармацевтически приемлемым носителем.

15 Термин "соли" может включать кислотно-аддитивные соли или соли присоединения свободных оснований. Предпочтительно соли являются фармацевтически приемлемыми. Примеры кислот, которые можно применять для получения фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей, включают, но не ограничиваются ими, соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как азотная, фосфорная,

20 серная или бромоводородная, йодоводородная, фтороводородная, фосфористая, а также соли, полученные из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксилкановые кислоты, алкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и уксусная, малеиновая, янтарная

25 или лимонная кислоты. Неограничивающие примеры таких солей включают нападисилат, бесилат, сульфат, пиросульфат, бисульфат, сульфит, бисульфит, нитрат, фосфат, моногидрофосфат, дигидрофосфат, метафосфат, пирофосфат, хлорид, бромид, иодид, ацетат, трифторацетат, пропионат, каприлат, изобутират, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себацат, фумарат, малеат, манделат, бензоат, хлорбензоат,

30 метилбензоат, динитробензоат, фталат, бензолсульфонат, толуолсульфонат, фенилацетат, цитрат, лактат, малеат, тартрат, метансульфонат и подобные. Также рассматривают соли аминокислот, такие как аргинат и подобные, и глюконат, галактуронат (см., например, Berge, et al. "Pharmaceutical Salts," J. Pharma. Sci. 1977; 66: 1).

35 Термин "фармацевтически приемлемые соли" включает, но не ограничивается ими, соли, хорошо известные специалистам в данной области, например, моносоли (например, соли щелочных металлов и аммония) и полисоли (например, ди- или три-соли) соединений согласно настоящему изобретению. Фармацевтически приемлемые соли соединений настоящего описания представляют собой такие, где, например, замещаемая

40 группа, такая как водород в -OH, -NH- или -P(=O)(OH)-, замещена на фармацевтически приемлемый катион (например, натрия, калия или ион аммония), и могут быть удобно получены из соответствующего соединения, описанного в настоящем документе, путем, например, взаимодействия с подходящим основанием. В тех случаях, когда соединения являются достаточно основными или кислотными для образования стабильных

45 нетоксичных солей кислот или оснований, введение соединений в форме солей может быть целесообразно. Примерами фармацевтически приемлемых солей являются органические аддитивные соли кислот, образуемые с кислотами, которые образуют физиологически приемлемый анион, например, тозилат, метансульфонат, ацетат, цитрат,

малонат, тартрат, сукцинат, бензоат, аскорбат, альфа-кетоглутарат и альфа-глицерофосфат. Также могут быть образованы подходящие неорганические соли, в том числе соли гидрохлориды, сульфаты, нитраты, бикарбонаты и карбонаты.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены с применением стандартных методик, хорошо известных в данной области, например, посредством взаимодействия достаточно основного соединения, такого как амин, с подходящей кислотой, обеспечивающей физиологически приемлемый анион. Соли карбоновых кислот и щелочных металлов (например, натрия, калия или лития) или щелочноземельных металлов (например, кальция) также могут быть получены.

Термины "обогащенные селеном дрожжи" и "селенизированные дрожжи" относятся к любым дрожжам (например, *Saccharomyces cerevisiae*), которые культивируют в среде, содержащей неорганические соли селена. Настоящая заявка не ограничена применением соли селена. В самом деле, различные соли селена рассмотрены для применения в настоящей заявке, в том числе, но не ограничиваясь ими, селенит натрия, селенат натрия,

селенит кобальта или селенат кобальта. Селеносодержащее соединение в таких дрожжевых препаратах представляет собой селенометионин, который будет присутствовать в форме, которая включена в полипептиды/белки. Количество общего клеточного селена, присутствующего в форме селенометионина, в таких препаратах будет варьироваться, но может составлять в от 10 до 100%, 20-60%, 50-75% и от 60 до 75%. Остальная часть органического селена в препаратах селенизированных дрожжей преимущественно состоит из промежуточных продуктов в пути биосинтеза селенометионина. Они включают, но не ограничиваются ими, селеноцистеин, селеноцистатионин, селеногомоцистеин и селеноаденозилселенометионин. Количество остаточной неорганической соли селена в готовом продукте в целом достаточно низкое (например, <2%).

Термин "замещенный" в связи с фрагментом относится к дополнительному заместителю, который присоединен к фрагменту в любом приемлемом месте на фрагменте. Если не обозначено иное, фрагменты могут связываться через углерод, азот, кислород, серу или любой другой приемлемый атом. Примеры заместителей включают, но не ограничиваются ими, амины, спирты, тиолы, простые эфиры, алкены, алкины, эпоксиды, азиридины, оксираны, азетидины, дигидрофураны, пирролидины, пираны, пипериидины, альдегиды, кетоны, сложные эфиры, карбоновые кислоты, карбоксилаты, имины, имиды, азиды, азо-группы, енамины, алкилгалиды, алкенилгалиды, алкинилгалиды, арилгалиды, фосфины, оксиды фосфинов, фосфиниты, фосфониты, фосфиты, фосфонаты, фосфаты, сульфаты, сульфоксиды, сульфонильные группы, сульфоксильные группы, сульфонаты, нитраты, нитриты, нитрилы, нитрогруппы, нитрозогруппы, цианаты, тиоцианаты, изотиоцианаты, карбонаты, ацилгалиды, пероксиды, гидропероксиды, полуацетали, полуketали, ацетали, кетали, ортоэфиры, ортокарбонатные сложные эфиры, сульфиды, дисульфиды, сульфоновые кислоты, сульфоновые кислоты, тионы, тиали, фосфодиэфиры, бороновые кислоты, сложные эфиры бороновых кислот, бороновые кислоты и сложные эфиры бороновых кислот.

Термины "обработка", "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, где целью является замедлить (например, уменьшить или отсрочить начало)

нежелательное физиологическое состояние, расстройство или заболевание или получить благотворные или желаемые результаты, такие как частичное или полное восстановление или ингибирование ухудшения параметра, величины, функции или результата, который был или стал аномальным. Благотворный или желаемый результаты включают, но не

ограничиваются ими, ослабление симптомов; снижение степени или силы или скорости развития состояния, расстройства или заболевания; стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) статуса состояния, расстройства или заболевания; задерживание начала или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; улучшение состояния, расстройства или болезненного состояния; и ремиссию (частичную или полную), приводящую или не приводящую к немедленному уменьшению фактических клинических симптомов или укреплению или улучшению состояния, расстройства или заболевания.

Термин "реагент(ы), способный специфически обнаруживать экспрессию гена"

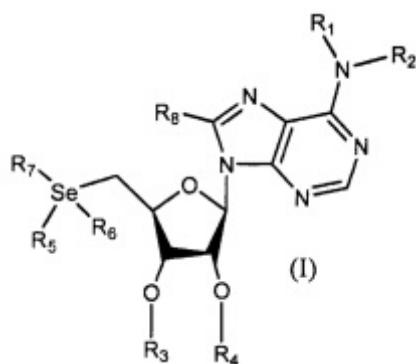
относится к реагентам, способным или достаточным для определения экспрессии различных генов, подробно описанных в настоящей заявке. Примеры подходящих реагентов включают, но не ограничиваются ими, зонды нуклеиновых кислот, способные к специфической гибридизации с мРНК или кДНК, и антитела (например, моноклональные или поликлональные антитела).

Термин "токсичный" относится к любым пагубным или вредным воздействиям на субъект, клетку или ткань по сравнению с той же клеткой или тканью до введения токсиканта.

Соединения и композиции

Один аспект настоящей заявки направлен на 5'-Метилселеноаденозин ("соединение C"), Se-Аденозил-L-гомоцистеин ("соединение D"), L-глутамил-Se-метил-L-селеноцистеин ("соединение E") и их аналоги. Некоторые варианты реализации включают композицию, содержащую соединение формулы I, формулы II и/или формулы III и их комбинации.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство,

35 где R₁ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' представляет собой алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклик; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с

40 одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R₂ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

45 R₃ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или C-амидо; или R₃ совместно с R₄ и атомами, к которым они присоединены,

образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

5 R_4 представляет собой Н, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или С-амидо; или R_3 совместно с R_4 и атомами, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

6 R_5 представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

10 R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

11 R_6 представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

12 R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

13 R_7 представляет собой Н, алкил, алкенил, алкинил, кетон, аминоспирт, аминокислоту,

15 OR' , $Se-R'$, $S-R'$, где R' выбран из Н, алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; и

16 R_8 представляет собой водород, азидо, алкил, алкенил, алкинил.

В других вариантах реализации одно или более из этих соединений формулы (I) может быть выделено или очищено.

20 В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где R_1 , R_3 , R_4 и R_8 каждый представляет собой Н; R_2 представляет собой Н, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, $C(O)R'$ или $C(O)OR'$, где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; R_5 и R_6 каждый отсутствует; 25 и R_7 представляет собой алкил или аминокислоту.

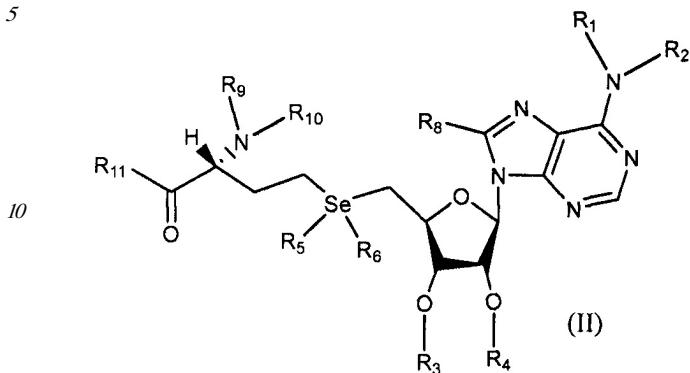
26 В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где R_1 , R_3 , R_4 и R_8 каждый представляет собой Н; R_2 представляет собой Н, ацил, алкил, 30 алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; R_5 и R_6 каждый отсутствует; и R_7 представляет собой алкил или аминокислоту; при условии, что 5'-селеноаденозил-35 метионин, дегидрокси-5'-метилселеноаденозин, этилселеноаденозин, селено(гидроксил)-селенофен-(3'-дезокси-аденозин), аллилселеноаденозил-гомоцистеин, селено-аденозил-гомоцистеин, селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин, селеноаденозин, селено-аденозил- $Se(метил)$ -селеноксид, адено-40 зил-гидрокси-селеноксид, этил-селеноаденозин, селено-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезокси-аденозин), адено-45 зил-гидрокси-селеноксид и селено-аденозил- $Se(метил)$ -селеноксид каждый может быть исключен из композиции.

В определенном аспекте предложена композиция, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, согласно формуле (I), которая представляет собой 5'-метилселеноаденозин ("соединение С").

В некоторых вариантах реализации композиции содержат соединение согласно формуле (I) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, при 45 условии, что 5'-селеноаденозил-метионин, дегидрокси-5'-метилселеноаденозин, этилселеноаденозин, селено(гидроксил)-селенофен-(3'-дезокси-аденозин), аллилселеноаденозил-гомоцистеин, селено-аденозил-гомоцистеин, селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин, селеноаденозин, селено-аденозил- $Se(метил)$ -селеноксид, адено-50 зил-гидрокси-селеноксид, этил-селеноаденозин, селено-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезокси-

аденозин), аденоцил-гидрокси-селеноксид и селено-аденоцил-Se(метил)-селеноксид каждый может быть исключен из композиции.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (II):



15 или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где R₁ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' представляет собой алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклик; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

20 R₂ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, 25 содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

30 R₃ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или C-амидо; или R₃ совместно с R₄ и атомами, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

35 R₄ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или C-амидо; или R₃ совместно с R₄ и атомами, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

40 R₅ представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

R₆ представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует;

45 где

R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

R₈ представляет собой водород, азидо, алкил, алкенил, алкинил;

45 R₉ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' представляет собой алкил, циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклик; или R₉ совместно с R₁₀ образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

5 R_{10} представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; или R_9 совместно с R_{10} образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота; и

10 R_{11} представляет собой OH, OR, алcoxси, аралcoxси или амино, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила, или фармацевтически приемлемую соль или внутреннюю соль.

15 В других вариантах реализации одно или более из этих соединений формулы (II) может быть выделено и/или очищено.

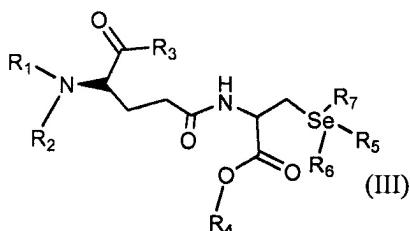
20 В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где R_1 , R_3 , R_4 , R_8 и R_9 каждый представляет собой H; R_2 представляет собой H, ацил, алкил, карбоксил, $C(O)R'$ или $C(O)OR'$, где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; R_5 и R_6 отсутствуют; R_{10} представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; и R_{11} представляет собой OH, OR, алcoxси, аралcoxси или амино, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила или фармацевтически приемлемой соли или внутренней соли.

25 В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} определены выше, и где R_{11} представляет собой OH или OR, где R выбран из метила, этила, пропила, изопропила, бутила, втор-бутила или трет-бутила.

30 В определенном аспекте предложена композиция, содержащая соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, которое представляет собой 5'-селеноаденозил-гомоцистеин (соединение "D") или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

35 В некоторых вариантах реализации композиции содержат соединение согласно формуле (II) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; при условии, что 5'-селеноаденозил-метионин, аллилселеноаденозил-гомоцистеин, селеноаденозил-гомоцистеин и селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин каждый может быть исключен из композиции.

40 В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (III):



или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где

45 R_1 представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил,

циклоалкил, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, где R' представляет собой алкил, алкенил, алкинил,

циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклил; или R_1 совместно с R_2 образуют

гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с

одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

⁵ R_2 представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; или R_1 совместно с R_2 образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

¹⁰ R_3 представляет собой OH, OR, алкокси, аралококси или амино, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила или фармацевтически приемлемой соли или внутренней соли;

R_4 представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероциклик или фармацевтически приемлемую соль или внутреннюю соль;

R_5 представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

¹⁵ R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

R_6 представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила; и

²⁰ R_7 представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, кетон, OR', Se-R', S-R', где R' выбран из H, алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение согласно формуле (III) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство,

²⁵ где R_1 и R_2 каждый представляет собой H;

R_3 представляет собой OH, OR, алкокси, аралококси или амино, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила или фармацевтически приемлемой соли или внутренней соли;

R_4 представляет собой H или фармацевтически приемлемую соль или внутреннюю соль;

R_5 и R_6 отсутствуют; и

R_7 представляет собой алкил, алкенил или алкинил.

В других вариантах реализации одно или более из этих соединений формулы (III) может быть выделено и/или очищено.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где R_1 и R_2 каждый представляет собой H; R_3 представляет собой OH или OR, где R выбран из метила, этила, пропила, изопропила, бутила, втор-бутила или трет-бутила;

⁴⁰ R_4 представляет собой H; R_5 и R_6 отсутствуют; и R_7 представляет собой алкил, который представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изо-бутил, втор-бутил или трет-бутил.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая соединение формулы III или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, где

⁴⁵ R_1 и R_2 каждый представляет собой H; R_3 представляет собой OH или OR, где R выбран из метила, этила, пропила, изопропила, бутила, втор-бутила или трет-бутила; R_4 представляет собой H; R_5 и R_6 отсутствуют; и R_7 представляет собой метил.

В определенном аспекте предложена композиция, содержащая соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, которое представляет собой гамма-глутамил-метилселеноцистеин ("соединение Е") или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

- 5 В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение согласно формуле (III) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство, при условии, что γ -глутамоилселеноцистеин- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-селеноцистеин, ди- γ -глутамоилселеноцистеин, селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилселеноцистеин- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилцистеин-10 2,3-DHP-селеноцистеин, ди- γ -глутамоилселеноцистеин и селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин каждый может быть исключен из композиции.

- 15 В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая одно или более соединений согласно одной или более формулам (I), (II) и/или (III), при этом каждое из следующих соединений исключают из композиции, чтобы минимизировать токсичность селена, удалить неактивные или ингибирующие соединения и/или максимально повысить терапевтический индекс композиции, при этом исключенные соединения представляют собой γ -глутамоилселеноцистеин- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-селеноцистеин, ди- γ -глутамоилселеноцистеин, селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилселеноцистеин- γ -глутамоилцистеин, 20 γ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-селеноцистеин, ди- γ -глутамоилселеноцистеин, селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин, дегидрокси-5'-метилселеноаденозин, этилселеноаденозин, селено(гидроксил)-селенофен-(3'-дезокси-аденозин), аллилселеноаденозил-гомоцистеин, селено-аденозил-гомоцистеин, селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин, селеноаденозин, селено-аденозил-Se(метил)-селеноксид, аденоаденозил-25 гидрокси-селеноксид, этил-селеноаденозин, селено-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезокси-аденозин), аденоаденозил-гидрокси-селеноксид и селено-аденозил-Se(метил)-селеноксид.

- 30 В вариантах реализации любое из соединений, описанных в настоящем документе, может быть модифицировано пролекарством для продления периода полураспада, для защиты соединения от окисления, для направления соединения к ткани и/или для обеспечения прохождения соединением гематоэнцефалического барьера.

- 35 В вариантах реализации пролекарство содержит селеногликозид. Гликозиды включают моно, ди и олигосахариды. Сахариды могут включать рибозу, глюкозу, галактозу или маннозу. Например, галактоза, конъюгированная с селеносодержащим фрагментом, может ориентировать соединение к печени.

- 40 45 В других вариантах реализации пролекарство содержит селеназолидин. Эти соединения обеспечивают медленное высвобождение соединения.

- В других вариантах реализации пролекарство содержит конъюгацию селеноорганического соединения, как описано в настоящем документе, с витамином, таким как С или Е. Эти конъюгаты пролекарства обладают улучшенным защитным действием.

- В других вариантах реализации пролекарство представляет собой пролекарство, активированное цитохромом Р450. Например, циклические фосфаты или фосфонаты. В частности, нуклеозиды модифицированы этими молекулами и предложены для ориентирования молекул к печени. Примерные пролекарства включают пролекарства HepDirect. Другие варианты реализации пролекарства, активированного цитохромом Р450, улучшают биодоступность и описаны в Huttunen et al., Current Medicinal Chemistry 2008 15:2346.

В вариантах реализации любое из соединений формулы (I), формулы (II), формулы

(III) может быть модифицировано для снижения окисления селена. В вариантах реализации соединение может образовывать димер посредством связи между атомами селена.

В вариантах реализации любое из соединений формулы (I), формулы (II), формулы

5 (III) может быть модифицировано посредством связи с агентом, ориентированным к ткани, или другим агентом для увеличения периода полураспада соединения. В вариантах реализации агенты, ориентированные к ткани, включают антитела, специфичные для связывания тканеспецифическим антигеном, трансферриновым рецептором или пролекарством, как описано в настоящем документе.

10 В других вариантах реализации указанные соединения могут быть связаны или комбинированы с полимерным носителем или носителем в форме наночастиц для доставки композиций к мозгу и для обеспечения ориентирования к другой ткани. Такие полимерные носители включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль, полилактиды, полигликолиды, полиортезиры, поливинилпирролидон и поливиниловые 15 спирты. Микросфера и липосомы включают микросферы сополимера молочной и гликоловой кислот (PLGA). Другие наночастицы включают фосфолипиды, хитозан, молочную кислоту и декстран.

Липидные пролекарства также подходят для применения с соединениями согласно настоящему изобретению. В качестве неограничивающего примера некоторые липидные 20 пролекарства описаны в Hostetler et al. (1997 Biochem. Pharm. 53:1815-1822) и Hostetler et al. (1996 Antiviral Research 31:59-67), каждая из которых включена в настоящую заявку посредством ссылки. Дополнительные примеры подходящих технологий пролекарств описаны в WO 90/00555; WO 96/39831; WO 03/095665A2; патентах США №5411947; 5463092; 6312662; 6716825; и опубликованных заявках на патенты США №2003/0229225 25 и 2003/0225277, каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Такие пролекарства могут также обладать способностью ориентировать лекарственное соединение к определенной ткани пациента, например, печени, как описано Erion et al. (2004 J. Am. Chem. Soc. 126:5154-5163; Erion et al., Am. Soc. Pharm. & Exper. Ther. DOI:10.1124/jept.104.75903 (2004); WO 01/18013 A1; патент 30 США №. 6752981), каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. В качестве неограничивающего примера, другие пролекарства, пригодные для применения с соединениями согласно настоящему изобретению, описаны в WO 03/090690; патенте США №6903081; заявке на патент США №2005/0171060 A1; заявке на патент США №2002/0004594 A1; и Harris et al. (2002 Antiviral Chem & Chemo. 35 12: 293-300; Knaggs et al., 2000 Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 2075-2078), каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (I). В некоторых аспектах композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (I), содержит 5'-метилселеноаденозин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и 5'-селеноаденозил-гомоцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (I) и формуле (III). В некоторых аспектах 45 композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (I) и формуле (III), содержит 5'-метилселеноаденозин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; 5'-селеноаденозил-гомоцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и гамма-глутамил-метилселеноцистеин

или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации указанная композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (I) и формуле (III), содержит 5'-метилселеноаденозин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и гамма-глутамил-метилселеноцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (II) и формуле (III). В некоторых аспектах композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (II) и формуле (III), содержит 5'-селеноаденозил-гомоцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и гамма-глутамил-метилселеноцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, которая содержит терапевтически эффективное количество одного или более соединений согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, сложный эфир или пролекарство, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. Фармацевтически приемлемые носители включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошок трагакантовой камеди; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для изготовления суппозиториев; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Композиции могут быть приготовлены для любого способа введения, в частности для перорального, ректального, трансдермального, подкожного, внутривенного, внутримышечного или интраназального введения. Композиции могут быть приготовлены в любой традиционной форме, например в форме таблеток, капсул, каплет, растворов, суспензий, дисперсий, сиропов, спреев, гелей, суппозиториев, пластырей и эмульсий.

Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого субъекта могут зависеть от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, определенное соединение для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и взаимодействие с другими лекарственными средствами, которые вводят одновременно. В зависимости от цели, которую стремятся изменить посредством лечения, фармацевтические композиции можно приготовить и вводить системно или местно. Способы приготовления 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, включая внутримышечное, подкожное, интрамедуллярное, интракальмальное, интравентрикулярное, внутривенное, внутрибрюшинное или интраназальное введение.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящей заявке, включают композиции, в которых активные ингредиенты (например, 5'-Метилселеноаденозин, Se-Аденозил-L-гомоцистеин, Гамма-глутамил-метилселеноцистеин, соединение формулы I, соединение формулы II, соединение 5 формул III и их комбинации) содержатся в эффективном количестве для достижения заданной цели. Например, в предпочтительном варианте реализации эффективное количество фармацевтической композиции содержит количество соединения, выбранного из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения 10 формулы III и их комбинаций. Определение эффективных количеств находится в пределах возможностей специалиста в данной области, особенно в свете описания, представленного в настоящем документе.

Селенизированные дрожжи, содержащие 2% или менее неорганического селена, в целом содержат больше селеносодержащих компонентов. Основные селеносодержащие

15 компоненты обычного водного экстракта селенизированных дрожжей представляют собой селеносодержащие белки и селенометионин. Другие низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой менее 1000 килодалтон ("кДа") идентифицировали, выделяли и очищали. Некоторые из компонентов и соединений, присутствующих в селенизированных дрожжах или их водном экстракте, обладают меньшей необходимой 20 биоактивностью или даже ингибирующей биоактивностью на митохондриальную функцию при выделении из таких селенизированных дрожжей. Соединения, такие как глутамил-селеноцистеин и серосодержащие соединения, такие как 5'-Метилтиоаденозин, S-Аденозил-L-гомоцистеин и Гамма-глутамил-метил-цистеин, являются неактивными или в некоторых случаях ингибирующими, как описано и показано в настоящем 25 документе.

Некоторые селеносодержащие соединения также получали путем синтеза, очищали и подвергали скринингу в анализе биологической активности. Диапазоны концентрации для скрининга включают от примерно 15 до примерно 500 частей на миллиард.

Биологическую активность можно обнаружить даже при 15 ppb для композиций, 30 описанных в настоящем документе. В вариантах реализации анализ биологической активности представляет собой анализ митохондриального потенциала. Не все компоненты и соединения, обнаруженные в селенизированных дрожжах или их водном экстракте, обладают биологической активностью, когда получены из таких дрожжей, и некоторые ингибируют необходимую биологическую активность.

35 В вариантах реализации селеносодержащие соединения, полученные путем синтеза, приготовлены в композициях в соотношениях, которые отличаются от соотношений, находящихся в водном экстракте. Например, обычный водный экстракт имеет соотношение Гамма-глутамил-метилселеноцистеина к 5'-Метилселеноаденозину или Se-Аденозил-L-гомоцистеину, составляющее 7 к 1. В вариантах реализации композиций, 40 содержащие соединения, приготовленные путем синтеза, могут содержать равное количество каждого селеносодержащего компонента, например, соотношение, составляющее по меньшей мере 1:1:1 Гамма-глутамил-метилселеноцистеина к 5'-Метилселеноаденозину к Se-Аденозил-L-гомоцистеину. В других вариантах реализации композиция может содержать по меньшей мере два компонента в соотношениях от 5:1 45 до 1:1.

Композиции, содержащие одно или более соединений, включая 5'-Метилселеноаденозин, Se-Аденозил-L-гомоцистеин, Гамма-глутамил-метилселеноцистеин, соединение формулы (I), соединение формулы (II), соединение

формулы (III) и их комбинации, можно вводить субъекту (например, пациенту) внутривенно в фармацевтически приемлемом носителе, таком как физиологический солевой раствор. Можно применять стандартные способы внутриклеточной доставки соединений (например, доставку с помощью липосом). Такие способы хорошо известны

5 специалистам в данной области.

Композиции, содержащие селен, подходят для внутривенного введения, а также парентерального введения, такого как внутривенное, внутримышечное, подкожное и внутрибрюшинное. Для инъекций композицию, содержащую селен (например, фармацевтическую композицию) согласно настоящей заявке можно приготовить в

10 форме водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или забуференный физиологический раствор. Для тканевого или клеточного введения в составе применяют проникающие вещества, подходящие для прохождения определенного барьера. Такие проникающие вещества, как правило, известны в данной области.

15 Композиции, содержащие 5'-Метилселеноаденозин, Se-Аденозил-L-гомоцистеин, Гамма-глутамил-метилселеноцистеин, соединение формулы (I), соединение формулы (II), соединение формулы (III) и их комбинации, можно добавлять к питательному напитку или пище (например, ENSURE, POWERBAR или подобным), мультивитаминам, питательным продуктам, пищевым продуктам и т.д. для ежедневного употребления.

20 В других вариантах реализации композиции согласно настоящей заявке можно приготовить с применением фармацевтически приемлемых носителей, хорошо известных в данной области, в дозировках, подходящих для перорального введения. Такие носители обеспечивают приготовление фармацевтических композиций в форме таблеток, пилюль, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и подобных для перорального

25 или назального употребления пациентом, подлежащим лечению.

В некоторых вариантах реализации настоящей заявки композиции и/или составы, содержащие селен, можно вводить субъекту отдельно или в сочетании с другими формами селена, лекарственными средствами, малыми молекулами или в форме фармацевтических композиций, где они смешаны со вспомогательным веществом(ами)

30 или другими фармацевтически приемлемыми носителями. В вариантах реализации композиции могут включать одну или несколько аминокислот или селеносодержащих аминокислот, таких как метионин, цистеин или селеноцистеин, чтобы минимизировать токсичность. В одном из вариантов реализации настоящей заявки фармацевтически приемлемый носитель является фармацевтически инертным. В другом варианте

35 реализации настоящей заявки композиции, содержащие селен, можно вводить отдельно индивидуумам с риском развития или страдающим заболеванием или состоянием, связанным с митохондриальной дисфункцией.

Способы применения соединений и композиций

Как описано в настоящем документе, указанные соединения и их комбинации

40 применяют для усиления митохондриальной функции, для лечения митохондриальной дисфункции, для лечения болезни Альцгеймера и для модулирования метаболизма глюкозы тканеспецифическим и соответствующим ткани образом.

А. Митохондриальная функция и дисфункция

45 Митохондрии являются основными органеллами, производящими энергию в клетках высших организмов. Митохондрии обеспечивают прямую и косвенную биохимическую регуляцию широкого спектра клеточного дыхания, окислительных и метаболических процессов. Они включают цепь переноса электронов (ETC), которая обеспечивает окислительное фосфорилирование для получения метаболической энергии в форме

аденозинтрифосфата (АТФ), и которая также лежит в основе центральной роли митохондрий во внутриклеточном гомеостазе кальция.

Помимо их роли в производстве энергии в растущих клетках, митохондрии (или, по меньшей мере, митохондриальные компоненты) участвуют в запрограммированной 5 клеточной гибели (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 нервной системы и для надлежащего функционирования иммунной системы. Более того, некоторые болезненные состояния, как полагают, 10 связаны или с недостаточным, или с избыточным уровнем апоптоза (например, рак и аутоиммунные заболевания и повреждения при инсульте и нейродегенерация при болезни Альцгеймера в последнем случае, соответственно). Роль митохондрий в апоптозе было документально подтверждена (см., например, Green and Reed, Science, 1998, 281: 1309-1312; Green, Cell, 1998, 94:695-698; и Kromer, Nature Medicine, 1997, 3:614-620).

Заболевания, ассоциированные с митохондриями (например, вызванные дисфункцией

15 митохондрий), также могут быть связаны с утратой митохондриального мембранныго электрохимического потенциала посредством механизмов, отличных от окисления свободными радикалами, и изменение проницаемости может возникнуть в результате прямого или косвенного воздействия митохондриальных генов, генных продуктов или родственных молекул медиаторов по направлению каскада реакций и/или не 20 митохондриальных генов, генных продуктов или родственных медиаторов по направлению каскада реакций или от других известных или неизвестных причин. Утрата митохондриального потенциала, следовательно, может быть важнейшим событием в прогрессировании заболеваний, связанных с измененной митохондриальной функцией, включая дегенеративные заболевания, а также заболевания/состояния, связанные со 25 старением (например, рак, сердечно-сосудистые заболевания и сердечная недостаточность, сахарный диабет 2 типа, болезни Альцгеймера и Паркинсона, жировая болезнь печени, катаракта, остеопороз, потеря мышечной массы, расстройства сна и воспалительные заболевания, такие как псориаз, артрит и колит). Способы, как описано в настоящем документе, можно применять для усиления митохондриальной функции, 30 находятся ли клетки субъекта в стрессовом или болезненном состоянии, или нет.

Соединения и композиции, как описано в настоящем документе, проявляют тканевую специфичность в отношении их влияния на митохондриальную функцию.

Варианты реализации включают способ или применение усиленной митохондриальной функции в одной или более клетках печени, включающий: введение эффективного 35 количества композиции в клетки, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы I и их смесей, при этом эффективное количество усиливает митохондриальную функцию по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

40 В вариантах реализации указанная композиция может не включать одно или более из Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, глутамил-селеноцистеина, соединения формулы III, 5'-Метилтиоаденозина или S-Аденозил-L-гомоцистеина.

В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, 45 содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы I и их смесей, при этом эффективное количество усиливает митохондриальную функцию в клетках почек.

В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы,

состоящей из 5'-Метилселеноаденозина и/или соединения формулы I. В вариантах реализации композиции для усиления митохондриальной функции в клетках почек могут не включать одно или более из Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Метилтиоаденозина или S-Аденозил-L-гомоцистеина.

- 5 Варианты реализации согласно настоящей заявке включают способ или применение увеличенной митохондриальной функции в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из клеток скелетной мускулатуры, нейрональных клеток и их комбинаций, при этом указанный способ включает: введение эффективного количества композиции в клетки, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций, при этом эффективное количество усиливает митохондриальную функцию по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть 10 выделены и/или очищены.
- 15 В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций, при этом 20 эффективное количество усиливает митохондриальную функцию в одной или более клетках, выбранных из группы, состоящей из клеток скелетной мускулатуры, нейрональных клеток и их комбинаций.

- 25 В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II и их комбинаций. В вариантах реализации композиции для усиления митохондриальной функции в мышечных клетках могут не включать одно или более из Метилтиоаденозина или S-Аденозил-L-гомоцистеина. Будучи не 30 предназначеными для ограничения объема настоящей заявки, Метилтиоаденозин или S-Аденозил-L-гомоцистеин проявляют токсическое воздействие на митохондриальную функцию в клетках скелетной мускулатуры.

- 35 Присутствие некоторых серосодержащих молекул, обычно применяемых в селеновых добавках, таких как дрожжи, обогащенные селеном, в некоторых случаях ингибирует митохондриальную активность и приводит с течением времени к про-диабетическому состоянию. В литературе хорошо документально подтверждено, что сахарный диабет во взрослом возрасте связан с постепенным снижением митохондриальной активности в течение периода нескольких лет. Это особенно важно в случае скелетных мышц, которые, по оценкам, используют 75-80% ежедневно потребляемой глюкозы. Даже незначительное снижение (например, 20% ингибирования) в способности мышечных митохондрий эффективно сжигать глюкозу может с течением времени привести к 40 серьезным проблемам со здоровьем. Двукратное стимулирование митохондриальной активности, отмечаемое в клетках скелетной мускулатуры в ответ на соединение Se-Аденозил-L-гомоцистеин, например, может представлять собой способ избежать или отсрочить снижение митохондриальной активности в мышечной ткани у субъектов с пре-диабетом или диабетом.

- 45 В вариантах реализации композиция для усиления митохондриальной функции в нейрональных клетках содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения

формулы III и их комбинаций. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены. В вариантах реализации композиции для усиления митохондриальной функции в нейрональных клетках могут не включать одно или более из селенометионина или глутамилсelenоцистеина.

5 В вариантах реализации композиция для усиления митохондриальной функции в нейрональных клетках содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из Se-Аденозил-L-гомоцистеина и/или соединения формулы II, и по меньшей мере одно другое соединение селена, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Гамма-глутамил-метилсelenоцистеина, соединения формулы I, соединения формулы

10 III и их комбинаций.

В вариантах реализации композиция для усиления митохондриальной функции в нейрональных клетках содержит композицию, содержащую соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилтиоаденозина, S-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метил-цистеина и их комбинаций. В вариантах реализации композиция, 15 ориентированная на нейрональные клетки, может содержать одно или более серосодержащих аналогов, которые усиливают митохондриальную активность в нейрональных клетках.

Другие варианты реализации включают способ или применение увеличенной митохондриальной функции в одной или более клетках печени, включающий: введение 20 эффективного количества композиции в клетки, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилсelenоцистеина, соединения формулы I и соединения формулы III, при этом эффективное количество усиливает митохондриальную функцию по сравнению с 25 клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил- 30 метилсelenоцистеина, соединения формулы I и соединения формулы III, для усиления митохондриальной функции в клетках печени.

В вариантах реализации композиция для усиления митохондриальной функции в одной или более клетках печени содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилсelenоцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, 35 соединения формулы III и их комбинаций для усиления митохондриальной функции в клетках печени. В вариантах реализации композиция может исключать одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилтиоаденозина, S-Аденозил-L-гомоцистеина, глутамил-метил-сelenоцистеина и их комбинаций.

40 В вариантах реализации усиление митохондриальной функции находится в диапазоне от приблизительно 50% увеличения до 500% увеличения в сравнении с клетками идентичного типа, не обработанными указанным соединением. Величина ответа зависит от типа клеток, определенного используемого соединения и времени контакта с клеткой.

В вариантах реализации воздействие на митохондриальную функцию составляет 45 примерно от -66% до +200% по сравнению с клеткой того же типа, обработанной одним или более серосодержащими аналогами соединений селена. В случае некоторых типов клеток, серосодержащие аналоги не оказывают измеримого влияния на митохондриальную активность, в других они являются ингибирующими, а в других,

тем не менее, они являются стимулирующими.

В вариантах реализации одно или более из указанных соединений обладают тканеспецифическим действием на экспрессию разобщающих белков. Разобщающие белки (UCP) в митохондриях (МТ) являются важными для термогенеза и поддержания

5 митохондриального потенциала или целостности. Документально подтверждено, что утрата UCP2 является причиной более короткой 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): p. 102-12). Однако, поскольку UCP нарушают перенос электронов в

10 митохондриях, они в итоге приводят к снижению продукции АТФ из глюкозы в клетке. Хорошо известно, что продукция митохондриального АТФ имеет решающее значение для стимулированной глюкозой секреции инсулина (GSIS) бета-клетками поджелудочной железы. На самом деле, было показано, что ингибирование одного UCP, в частности, UCP2, вызывает регресс диабета, индуцированного питанием, посредством

15 положительного влияния на секрецию и действие инсулина (De Souza et al., FASEB J, 2007, 21(4): 1153-1163.

В вариантах реализации способ или применение понижающей регуляции генной экспрессии Ucp2 и/или Ucp3 в нейрональной клетке включает: введение эффективного количества композиции в клетки, при этом композиция содержит соединение, выбранное 20 из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций, при этом эффективное количество понижает экспрессию Ucp2 и/или Ucp3 в нейрональных клетках по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или 25 более соединений могут быть выделены и/или очищены.

В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций, для 30 понижающей регуляции генной экспрессии Ucp2 и/или Ucp3 в нейрональной клетке.

В других вариантах реализации способ или применение понижающей регуляции генной экспрессии Ucp2 в клетке печени включает: введение эффективного количества композиции в клетки, при этом композиция содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения 35 формулы II, соединения формулы III и их комбинаций, при этом эффективное количество понижает экспрессию Ucp2 в клетках печени по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

40 В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I и соединения формулы III, для понижающей регуляции генной экспрессии Ucp2 и/или Ucp3 в клетке печени.

45 Способы определения генной экспрессии в клетке известны специалистам в данной области и включают гибридизацию с зондами, например, на матрице, или посредством ПЦР. Матрицы и/или праймеры для определения генной экспрессии являются коммерчески доступными. Праймеры могут легко быть разработаны с применением

примеров последовательностей для Ucp1, Ucp2 и/или Ucp3. Примеры последовательностей для Ucp1 находятся на NM_021833/gI194733736, для Ucp2 находятся на NM_003355/gI13259540 и для Ucp3 находятся на NM_003356/gI215273349.

В вариантах реализации эффективное количество соединений и композиций, как 5 описано в настоящем документе, представляет собой количество, эффективное для усиления митохондриальной функции без токсичности для клеток. Усиление митохондриальной функции можно определить с применением ряда анализов образца, взятого у субъекта, обработанного композициями, описанными в настоящем документе. Выбранное эффективное количество не проявляет токсичности для любых из 10 приведенных в пример клеток, включая клетки почек, скелета мыши, нейрональные клетки человека или клетки печени мыши.

Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого субъекта могут зависеть от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, определенное соединение для введения, пол, время и путь введения, общее 15 состояние здоровья и взаимодействие с другими лекарственными средствами, которые вводят одновременно.

В вариантах реализации эффективное количество композиции для введения субъекту для усиления митохондриальной функции одной или более клеткам почек, нейрональным клеткам, клеткам печени или клеткам скелетной мускулатуры составляет примерно по 20 меньшей мере 5 мкг или более, или 800 мкг или менее в сутки одного необходимого биологически активного селеносодержащего соединения или нескольких необходимых биологически активных селеносодержащих соединений. Когда присутствуют несколько необходимых биологически активных селеносодержащих соединений, эффективное количество композиции является общим для всех необходимых биологически активных 25 селеносодержащих соединений в композиции.

В вариантах реализации эффективное количество для введения субъекту составляет примерно от 5 мкг до примерно 800 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 700 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 600 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 500 мкг и каждую величину между 30 ними, от 5 мкг до примерно 400 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 300 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 200 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 100 мкг и каждую величину между ними или от 5 мкг до 50 мкг и каждую величину между ними.

В вариантах реализации композиций, содержащих необходимые биологически 35 активные селеносодержащие вещества, как описано в настоящем документе, эффективное количество для введения субъекту составляет предпочтительно 200 мкг или менее в сутки или 50 мкг или менее в сутки. В вариантах реализации дозировку можно скорректировать в зависимости от эффективности, или если у субъекта наблюдаются какие-либо явные признаки селенового токсикоза, такого как дыхание 40 с запахом чеснока, потеря волос или слоящиеся ногти.

В вариантах реализации в композициях, которые содержат по меньшей мере два или более соединений, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций, соединения 45 присутствуют в композиции в равных частях. В других вариантах реализации соотношение одного необходимого биологически активного селеносодержащего соединения к другому может составлять примерно от 4:1 до 1:1.

В вариантах реализации дозировку вводят по меньшей мере один раз в день в течение

периода времени, чтобы достичь устойчивого состояния элементарного селена в крови. В вариантах реализации дозировку вводят ежедневно в течение по меньшей мере 60 или 90 дней. В вариантах реализации дозировку вводят в то время как субъект испытывает симптомы болезни или расстройства. В вариантах реализации субъект 5 пребывает в возрасте, когда увеличивается риск заболеваний, связанных с митохондриями, например, в возрасте по меньшей мере 40 лет.

Способы согласно настоящей заявке находят применение в лечении (например, профилактически или терапевтически) субъекта (например, субъекта с состоянием, связанным с митохондриальной дисфункцией). Будучи не предназначенными для 10 ограничения объема настоящего описания, были представлены доказательства, что три синтетических селеноорганических соединения обладают способностью, либо по отдельности, либо в различных комбинациях, значительно повышать митохондриальную активность в различных типах клеток; а именно, в клетках почек, клетках скелетной мускулатуры, нейрональных клетках и клетках печени. Механически, как одно из 15 объяснений этого роста можно предложить модулирование UCP, и ниже мы приведем доказательства, что экспрессия других белков, имеющих решающее значение для митохондриальной функции и биогенеза, может также благоприятно влиять на эти соединения. Вне зависимости от механизма действия, однако, тот факт, что эти 20 соединения могут стимулировать митохондриальную активность в тканях перекрестным образом, означает, что они могут быть особенно ценными в улучшении возникновения и прогрессирования на первый взгляд различных заболеваний; например, болезни Альцгеймера (AD) и диабета 2 типа (T2DM).

Композиции, содержащие одно или более из соединений, включая 5'-Метилселеноаденозин, Se-Аденозил-L-гомоцистеин, Гамма-глутамил- 25 метилселеноцистеин, соединение формулы I, соединение формулы II, соединение формулы III и их комбинации, можно вводить субъекту (например, пациенту) любыми путями, как описано в настоящем документе.

В вариантах реализации для доставки к скелетной мускулатуре указанные композиции, как описано в настоящем документе, можно наносить местно в форме геля, пластыря 30 или крема.

В других вариантах реализации доставку к головному мозгу можно направлять посредством применения липосом или сфер PLGA, содержащих антитело, трансферриновый рецептор или пролекарство в качестве направляющего агента.

В других вариантах реализации доставку к печени можно ориентировать с 35 применением пролекарств направленного действия, как описано в настоящем документе, включая HepDirect или селеногликозиды.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки композиции и/или составы, содержащие селен, можно вводить субъекту отдельно или в комбинации с другими формами селена, лекарственными средствами, малыми молекулами или в 40 фармацевтических композициях, где они смешаны со вспомогательным веществом(ами) или другими фармацевтически приемлемыми носителями.

В другом варианте реализации настоящей заявки композиции, содержащие селеноорганические соединения, описанные в настоящем документе, можно вводить отдельно индивидуумам с риском развития или страдающим заболеванием или 45 состоянием, связанным с митохондриальной дисфункцией. Такие заболевания включают диабетическое заболевание почек, болезнь Альцгеймера и диабет II типа.

В. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера («AD») является шестой основной причиной смерти в

Соединенных Штатах Америки («США») и является наиболее распространенной формой деменции. В настоящее время это заболевание по оценкам затрагивает 5,1 миллиона человек в США в возрасте 65 лет и старше. AD гистологически характеризуется двумя отличительными типами поражения А β бляшками (см., Kumar et al., 2000) и NFT, которые состоят из гиперфосфорилированных форм белка тау, ассоциированного с микротрубочками (См., Dunckley et al., опубликовано онлайн 19 октября 2005 г. и главы 155-163 опубликованной заявки на патент - 201110038889 AI). В литературе существует множество свидетельств, что и А β и NFT являются ключевыми партнерами в патогенезе болезни Альцгеймера, и что они действуют по отдельности и 10 совместно, чтобы максимизировать ухудшение познавательной функции и утрату нейронов у пораженных индивидуумов. Мутации в белке-предшественнике амилоида (APP) индуцируют AD со 100% проницаемостью, и мутации APP, пресенилина-1 (PSEN-1) и пресенилина-2 (PSEN-2), связанные с семейным AD (FAD), приводят к повышению уровня генерирования амилоида β и агрегации А β .

15 Более того, мыши с гиперэкспрессией APP (APP-Tg) проявляют отложение А β и ухудшение памяти без формирования NFT или утраты нейронов. Бляшки образуются, когда белок-предшественник амилоида (APP) ошибочно обрабатывается двумя ферментами, называемыми β -секретазой и γ -секретазой, что приводит к образованию пептида β амилоида, содержащего от 39 до 42 аминокислот. Фермент γ -секретаза 20 фактически представляет собой мультиферментный комплекс, который включает пресенилин-1 (PSEN) и пресенилин-2 (PSEN-2) в качестве двух ключевых компонентов.

Накопление А β связано с потерей памяти в моделях AD, и снижение экспрессии APP восстанавливает эту потерю (см., Kumar et al., Peptides 21:1769 2000). Таким образом, снижение экспрессии APP (или на генном или на белковом уровне) понимается 25 практикующими специалистами как подход для борьбы с расстройствами, зависимыми от возраста, или нейродегенеративными расстройствами, такими как AD, которые включают потерю памяти.

30 Модулирование или ингибиование PSEN, PSEN-2, Никастрина (который управляет оборотом белка в комплексе γ -секретазы) является важной целью терапевтических исследований AD, и были опубликованы некоторые заметные успехи. Например, высокоспецифичные ингибиторы, которые модулируют активность PSEN в нейронах человека, влияет не только генерирование А β , но также влияет на сигнальный путь Notch (см., Seiffert et al., J Biol. Chem. 275:34086 2000). Это сопровождалось изменениями 35 в морфологии аксонов и показало, что регуляция активности γ -секретазы PSEN-1 оказывает клинически благоприятное воздействие на нейритическую патологию AD (см., Figueroa et al., Neurobiology Dis. 9:49 2002). Более того, было показано, что понижающая регуляция PSEN снижает секрецию А β -белка (см., Luo et al., Acta Pharmacol. Sin. 25: 1613 2004) и было обнаружено, что ингибиование PSEN у мышей SAMP8 значительно улучшает память (см., Kumar et al., J. Exp. Biol. 212:494 2009).

40 Таким образом, А β является токсичным для нейронов, способствует гибели нейрональных клеток, и уровни А β в головном мозге можно изменить посредством модуляции уровней/активности его предшественника, APP или ферментного комплекса (ов), которые обрабатывают APP. Практикующий специалист сразу понимает и признает, что агент, способный ингибиовать экспрессию APP и/или переработку APP 45 в А β (например, В или γ -секретазой) является терапевтической мишенью для терапии AD.

Селеносодержащие соединения и композиции, описанные в настоящем документе, влияют на генную экспрессию генов, участвующих в обработке В-амилоида и

фосфорилировании тау-белка. Кроме того, такие соединения и композиции проявляют тканевую специфичность в отношении генной экспрессии генов, связанных с активаторами транскрипции.

В вариантах реализации способ или применение для ингибирования накопления В-

5 амилоида в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I) или их смесей, при этом эффективное количество ингибирует накопление В-амилоида в нейрональных клетках по сравнению с нейрональными

10 клетками, не обработанными указанной композицией.

В вариантах реализации способ или применение для ингибирования накопления В-

амилоида в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей

15 из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество ингибирует накопление В-амилоида в нейрональных клетках по сравнению с нейрональными клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или

20 очищены.

В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I), или по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-

25 глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы I и их смесей, для ингибирования накопления В-амилоида в нейрональных клетках.

В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I) и их смесей для

30 ингибирования экспрессии пресенилина 1 (PSEN) и никастрина в нейрональных клетках. В вариантах реализации нейрональные клетки представляют собой клетки IMR 32. Клетки IMR 32 представляют собой нейрональные клетки человека, которые являются моделью болезни Альцгеймера (Neill et al., J. Neuroscience Res. 1994 39:482). В вариантах реализации композиции для ингибирования генной экспрессии в нейрональных клетках

35 могут не включать одно или более из Se-Аденозил-L-гомоцистеина или Метилтиоаденозина.

В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I), или по меньшей мере три различных соединения, выбранных

40 из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы I и их смесей, для ингибирования экспрессии пресенилина 1 и никастрина в нейрональных клетках.

В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы,

45 состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций, для ингибирования генной экспрессии никастрина и пресенилина 1 в нейрональных клетках. В вариантах реализации композиции для

ингибиования генной экспрессии в нейрональных клетках могут не включать одно или более из селенометионина или глутамил селеноцистеина.

В вариантах реализации композиции включают 5'-Метилселеноаденозин и/или соединение формулы (I) и по меньшей мере одно другое соединение селена, выбранное из группы, состоящей из Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

В вариантах реализации композиция содержит по меньшей мере три соединения,

10 выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций, для ингибиования генной экспрессии в нейрональных клетках.

В вариантах реализации способ или применение для ингибиования

15 фосфорилирования тау-белка в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I) и их смесей, при этом эффективное количество ингибирует фосфорилирование тау-белка в нейрональных клетках по сравнению с нейрональными клетками, не обработанными указанной композицией.

20 В вариантах реализации способ или применение для ингибиования фосфорилирования тау-белка в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных 25 из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество ингибирует фосфорилирование тау-белка в нейрональных клетках по сравнению с нейрональными клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений 30 могут быть выделены и/или очищены.

25 В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I), или по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), 35 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы I и их смесей, для ингибиования фосфорилирования тау-белка в нейрональных клетках.

30 В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина и/или соединения формулы I для ингибиования 40 экспрессии Gsk3B в нейрональных клетках. В вариантах реализации композиции для ингибиования генной экспрессии Gsk3B в нейрональных клетках могут не включать одно или более из Se-Аденозил-L-гомоцистеина или Метилтиоаденозина.

45 В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций для ингибиования фосфорилирования тау-белка в нейрональных клетках. В вариантах реализации композиции для ингибиования фосфорилирования тау-белка в нейрональных клетках могут не включать одно или

более из метионина или других серосодержащих соединений.

В вариантах реализации композиции включают 5'-Метилселеноаденозин и/или соединение формулы (I) и по меньшей мере одно другое соединение селена, выбранное из группы, состоящей из Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-

5 метилселеноцистеина, соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций.

В вариантах реализации композиция содержит по меньшей мере два соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы III и их комбинаций

10 для ингибирования фосфорилирования тау-белка в нейрональных клетках.

В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из Гамма-глутамил-метилселеноцистеина и/или соединения формулы (III) для ингибирования общего тау-белка в нейрональных клетках. В вариантах реализации композиции для ингибирования общего тау-белка в нейрональных клетках могут не

15 включать одно или более из Se-Аденозил-L-гомоцистеина или Метилтиоаденозина.

В вариантах реализации способ или применение для ингибирования FOXO фосфорилирования в одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции одной или более нейрональным клеткам, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-

20 Метилселеноаденозина Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (III) и их комбинаций, при этом эффективное количество ингибирует FOXO фосфорилирование по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В других вариантах реализации одно или более соединений могут быть выделены и/или очищены.

25 В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (III) и их комбинаций для ингибирования FOXO фосфорилирования в нейрональных клетках.

30 В вариантах реализации способ или применение для ингибирования FOXO фосфорилирования в одной или более нейрональных клетках при увеличении FOXO фосфорилирования в одной или более клетках печени, включает: введение эффективного количества композиции в клетки печени и нейрональные клетки, при этом композиция содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из: 5'-

35 Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (III) и их комбинаций, при этом эффективное количество снижает FOXO фосфорилирование в нейрональных клетках и повышает FOXO фосфорилирование в клетках печени по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией.

40 В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций для ингибирования фосфорилирования FOXO3 и/или FOXO 4 в нейрональных клетках. В вариантах реализации композиции для

45 ингибирования фосфорилирования FOXO 3 и/или FOXO 4 в нейрональных клетках могут не включать метионин или селенометионин. В вариантах реализации композиции включают 5'-Метилселеноаденозин и/или соединение формулы (I) и по меньшей мере одно другое соединение селена, выбранное из группы, состоящей из Se-Аденозил-L-

гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций.

В вариантах реализации композиция содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-

5 гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций для ингибиования фосфорилирования FOXO 3 и FOXO 4 в нейрональных клетках.

В вариантах реализации композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-

10 метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций для увеличения экспрессии PGC1a в нейрональных клетках. В вариантах реализации композиции для увеличения экспрессии PGC1a в нейрональных клетках могут не включать метионин или селенометионин.

В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции,

15 содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций для усиления экспрессии PGC1a в нейрональных клетках.

В вариантах реализации способ или применение увеличения экспрессии PGC1a в

20 одной или более нейрональных клетках включает: введение эффективного количества композиции в одну или более нейрональные клетки, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из: 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом

25 эффективное количество увеличивает экспрессию PGC1a по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией.

В вариантах реализации способ или применение для увеличения экспрессии PGC1a в одной или более нейрональных клетках и отсутствие влияния на экспрессию PGC1a в одной или более клетках печени включает: введение эффективного количества

30 композиции в клетки печени и нейрональные клетки, при этом композиция содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (III) и их комбинаций, при этом эффективное количество увеличивает экспрессию PGC1a в одной

35 или более нейрональных клетках и не влияет на экспрессию PGC1a в одной или более клетках печени по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией.

В вариантах реализации композиции содержат соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина и/или соединения формулы I, и по меньшей мере одно другое соединение селена, выбранное из группы, состоящей из Se-Аденозил-

40 L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинации.

В вариантах реализации композиция содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I),

45 соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций для увеличения экспрессии PGC1a в нейрональных клетках.

В вариантах реализации увеличение экспрессии PGC1a, снижение FOXO

фосфорилирования, снижение PSEN1, снижение никастрина, снижение Gsk3b варьируется

от приблизительно 50% увеличения или снижения до 500% увеличения или снижения по сравнению с клетками идентичного типа, не обработанными соединением. Величина ответа зависит от типа клеток, определенного соединения и времени контакта с клеткой.

Действие соединений и композиций согласно настоящей заявке на фосфорилирование

- 5 FOXO3 и FOXO4 и экспрессию PGC1a показывает тканевую специфичность. Не ограничивая настоящую заявку, в нейрональных клетках ингибирование фосфорилирования FOXO3 и FOXO4 позволяет FOXO проникать в ядро и активировать транскрипцию. PGC1a также представляет собой активатор транскрипции, который регулирует метаболизм энергии в клетках, включая глюконеогенез. FOXO и PGC1a 10 способствуют активации транскрипции генов, например, глюкозо-6-фосфатазы (G6pc). Увеличение глюконеогенеза обеспечивает нейрональным клеткам возможность генерировать глюкозу и поддерживать источники энергии.

Как обсуждалось выше, генерирование А β и фосфорилированного тау-белка значительно способствует патологии болезни Альцгеймера. Результаты, представленные

- 15 в настоящем документе, представляют доказательство того, что соединения и композиции, описанные в настоящем документе, влияют на генную экспрессию пресенилина 1 и никастрина. Эти два фермента, как было показано, участвуют в генерировании А β . Кроме того, ингибирование фосфорилирования тау-белка и/или общего тау-белка являются свидетельством того, что соединения и композиции, как 20 описано в настоящем документе, также влияют на продукцию NFT. Кроме того, действие соединений на повышение митохондриальной функции, повышение активации FOXO и повышение генной экспрессии PGC1a обеспечивают повышенную митохондриальную функцию нервных клеток, что также может работать для лечения болезни Альцгеймера путем минимизации окислительного стресса. Предыдущие исследования показали, что 25 у трансгенных мышей App, которых кормили дрожжами, обогащенными селеном, а не обычным питанием или питанием с дефицитом селена, уменьшилось образование В-амилоидных бляшек (Lovell et al., Free Rad. Biol. Med. 46:1527 2009).

Способы определения генной экспрессии в клетке известны специалистам в данной области и включают гибридизацию с зондами, например, на матрице, или посредством 30 ПЦР-способов. Матрицы и/или праймеры для определения генной экспрессии являются коммерчески доступными. Праймеры могут легко быть разработаны с применением примеров последовательностей для PSEN1, PSEN2, Никастрина и Gsk3b. Примерные последовательности для PSEN1 находятся на NM_000021/NM_007318, PSEN2 находятся на NM_000447/NM_012486, Никастрина находятся на NM_015331 и для Ucp3 находятся 35 на NM_002093.

В вариантах реализации способ или применение для лечения болезни Альцгеймера включает: введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, соединения формулы (I) и их комбинаций. В вариантах реализации композиции для лечения болезни 40 Альцгеймера могут не включать одно или более из Метилтиоаденозина или S-Аденозил-L-гомоцистеина.

В вариантах реализации способ или применение для лечения болезни Альцгеймера включает: введение соединения, выбранного из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-45 метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций. В вариантах реализации композиции для лечения болезни Альцгеймера могут не включать метионин или селенометионин.

В вариантах реализации в настоящей заявке предложено применение композиции,

содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций для лечения болезни Альцгеймера.

5 В вариантах реализации композиции включают 5'-Метилселеноаденозин и/или соединение формулы (I) и по меньшей мере одно другое соединение селена, выбранное из группы, состоящей из Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций. В других вариантах реализации одно или более соединений может быть 10 выделено и/или очищено.

В вариантах реализации способ или применение для лечения болезни Альцгеймера дополнительно включает выбор композиции, которая лечит симптомы болезни Альцгеймера, не вызывая нежелательного эффекта на метаболизм глюкозы в печени. В вариантах реализации указанная композиция включает 5'-Метилселеноаденозин и/ 15 или соединение формулы (I). В вариантах реализации указанная композиция может не включать одно или более из Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (II) или соединения формулы (III). В вариантах реализации указанная композиция содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L- 20 гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций. В вариантах реализации указанная композиция не включает одно или более из H (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) или J (Гамма-глутамил-метилцистеин).

25 В вариантах реализации композиция содержит по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций, для лечения болезни Альцгеймера.

30 В вариантах реализации эффективное количество соединений и композиций, как описано в настоящем документе, представляет собой количество, эффективное для лечения болезни Альцгеймера без токсичности для клеток. Выбранное эффективное количество не проявляет токсичности по отношению к любой из клеток, приведенных в пример, включая клетки почек, скелетные клетки мышей, нейрональные клетки 35 человека или клетки печени мышей.

В вариантах реализации эффективное количество соединений и композиций, как описано в настоящем документе, представляет собой количество, эффективное для снижения симптомов болезни Альцгеймера и/или модулирования генной экспрессии, как описано в настоящем документе, без токсичности для клеток. Модулирование 40 генной экспрессии в нейрональных клетках можно определить, как описано в настоящем документе, с применением ряда анализов на образце, взятом у субъекта, обработанном в соответствии с композициями, описанными в настоящем документе.

Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого субъекта могут зависеть от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, 45 возраст, определенное соединение для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и взаимодействие с другими лекарственными средствами, которые вводят одновременно.

В вариантах реализации эффективное количество композиции для лечения болезни

Альцгеймера, ингибирования образования В-амилоида и/или фосфорилирования тау-белка в нейрональных клетках составляет примерно 5 мкг или более или 800 мкг или менее в сутки одного необходимого биологически активного селеносодержащего соединения или множества необходимых биологически активных селеносодержащих соединений. Когда присутствует несколько необходимых биологически активных селеносодержащих соединений, эффективное количество композиции представляет собой общее количество для всех соединений в композиции, вводимой субъекту.

В вариантах реализации эффективное количество для введения субъекту в день составляет примерно от 5 мкг до примерно 800 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 700 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 600 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 500 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 400 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 300 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 200 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 100 мкг и каждую величину между ними и от 5 мкг до 50 мкг и каждую величину между ними.

В вариантах реализации эффективные количества композиций, вводимых субъекту, содержащих необходимые биологически активные селеносодержащие вещества, как описано в настоящем документе, составляют предпочтительно 200 мкг или менее в сутки или 50 мкг или менее в сутки. В вариантах реализации дозировку можно скорректировать в зависимости от эффективности или если у субъекта наблюдаются какие-либо явные признаки селенового токсикоза, такого как дыхание с запахом чеснока, потеря волос или слоящиеся ногти.

В вариантах реализации в композициях, которые содержат два или более соединений, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций, соединения присутствуют в композиции в равных частях. В других вариантах реализации соотношение одного соединения к другому может составлять примерно от 4:1 до 1:1.

В вариантах реализации дозировку вводят по меньшей мере один раз в день в течение периода времени, чтобы достичь устойчивого состояния элементарного селена в крови. В вариантах реализации дозировку вводят ежедневно в течение по меньшей мере 60 или 90 дней. В вариантах реализации дозировку вводят в то время, как субъект испытывает симптомы болезни или расстройства. В вариантах реализации субъект пребывает в возрасте, когда увеличивается риск заболеваний, связанных с митохондриями, например, в возрасте по меньшей мере 40 лет.

Способы согласно настоящей заявке находят применение в лечении (например, профилактически или терапевтически) субъекта (например, субъекта с состоянием, связанным с болезнью Альцгеймера, образованием В-амилоида, фосфорилированием тау-белка и генной экспрессией пресенилина 1, никастрина, PGC1а и фосфорилированием тау-белка и FOXO3 и FOXO4). Композиции, содержащие одно или более из соединений, включая 5'-Метилселеноаденозин, Se-Аденозил-L-гомоцистеин, Гамма-глутамил-метилселеноцистеин, соединение формулы (I), соединение формулы (II), соединение формулы (III) и их комбинации, можно вводить субъекту (например, пациенту) внутривенно в фармацевтически приемлемом носителе, таком как физиологический солевой раствор. Можно применять стандартные способы для внутриклеточной доставки соединений (например, доставку посредством липосом). Такие способы хорошо известны специалистам в данной области. Композиции, содержащие селен, подходят для внутривенного введения, а также парентерального введения, такого как

внутривенное, подкожное, внутримышечное и внутрибрюшинное.

В вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению получают для пересечения гематоэнцефалического барьера. Композиции согласно настоящему изобретению можно объединять с материалом импланта, подходящим для доставки к

5 головному мозгу, таким как полимерные биоразлагаемые импланты, такие как этиленковинилацетат. Другие типы ориентирования могут включать рецептор - опосредованный транспорт, такой как рецептор инсулина и рецептор трансферрина. Эти рецепторы могут быть интегрированы в липосомы или микросферы также включая композиции, как описано в настоящем документе. В других вариантах реализации 10 доставку к головному мозгу можно направлять посредством применения липосом или сфер PLGA, содержащих антитело, трансферриновый рецептор или пролекарство в качестве направляющего агента.

Следовательно, в некоторых вариантах реализации настоящей заявки композиции и/или составы, содержащие селен, можно вводить субъекту отдельно или в комбинации 15 с другими формами селена, лекарственными средствами, малыми молекулами или в фармацевтических композициях, где они смешаны со вспомогательным веществом(ами) или другими фармацевтически приемлемыми носителями. В одном варианте реализации настоящей заявки фармацевтически приемлемый носитель является фармацевтически 20 инертным. В другом варианте реализации настоящей заявки композиции, содержащие селен, можно вводить отдельно индивидуумам с риском развития или страдающим заболеванием или состоянием, связанным с образованием В-амилоида или фосфорилированием тау-белка. Композиции, содержащие 5'-Метилселеноаденозин, Se- 25 Аденозил-L-гомоцистеин, Гамма-глутамил-метилселеноцистеин, соединение формулы (I), соединение формулы (II), соединение формулы (III) и их комбинации можно добавлять к питательному напитку или пище (например, ENSURE, POWERBAR или подобным), мультивитаминам, питательным продуктам, пищевым продуктам и т.д. для ежедневного 30 употребления.

Метаболизм глюкозы

Инсулиннезависимый (тип II) сахарный диабет (СД) представляет собой заболевание, 35 которое характеризуется резистентностью к инсулину в скелетных мышцах, печени и жировой ткани в сочетании с дефектами в секреции инсулина из-за функции β -клеток поджелудочной железы. Устойчивость к инсулину является основной особенностью диабета II типа. Известно, например, что подавляющее большинство больных сахарным 40 диабетом II типа являются резистентными к инсулину. Кроме того, резистентность к инсулину у потомства больных сахарным диабетом II типа является лучшим прогностическим фактором для последующего развития заболевания (см., например, Warram et al., Ann Intern Med. 113:909 1990). Меры, которые снижают резистентность к инсулину, также предотвращают развитие диабета. Оптимальная функция митохондрий необходима для нормальной секреции инсулина, стимулированной глюкозой, бета-клетками поджелудочной железы.

Скелетная мускулатура и печень являются двумя ключевыми органами, которые реагируют на инсулин, при поддержании гомеостаза глюкозы. Переход этих органов в инсулинерезистентное состояние считают самым серьезным изменением в метаболизме глюкозы, замеченным у пациентов с сахарным диабетом II типа (см., например, Lowell 45 and Shulman, Science 21:307 2005). Из этих двух органов, скелетная мускулатура является наиболее важной с точки зрения последствий, получаемых от развития резистентности к инсулину. Это происходит потому, скелетная мускулатура, как было обнаружено, утилизирует или метаболизирует от 80 до 90% употребленной за сутки глюкозы (см.,

например, DeFronzo et al., 1985).

Документально подтверждено посредством анализа изменений экспрессии в масштабе генома, что гены митохондриального окислительного фосфорилирования (OXPHOS) проявляют пониженную экспрессию у индивидуумов с преддиабетическим и

- 5 диабетическим состоянием, по сравнению со здоровым контролем, и что эти гены во многих случаях являются мишениями гамма транскрипционного коактиватора 1 альфа рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PGC1- α , см., например, Mootha et al., 2003). В этих исследованиях типичное снижение экспрессии генов OXPHOS было небольшим (приблизительно 20%), но в высшей степени устойчивым, при этом 89% 10 изученных генов показывало более низкую экспрессию у индивидуумов или с нарушенной толерантностью к глюкозе или с диабетом II типа по сравнению с индивидуумами с нормальной толерантностью к глюкозе.

Как правило, в данной области понимают и признают, что лекарственные средства или агенты, которые повышают активность OXPHOS в мышцах, существуют в качестве 15 ценных терапевтических средств для лечения сахарного диабета 2 типа. Для того чтобы поддержать эту гипотезу, уже давно известно, что аэробные упражнения являются лучшим немедикаментозным вмешательством для лечения диабета, поскольку они увеличивают митохондриальную активность и количество и способствуют экспрессии генов OXPHOS.

- 20 В печени, FOXO в его активированном или нефосфорилиированном состоянии находится в ядре, где связывается с областью промотора глюкозо-6-фосфатазы и, наряду с другими факторами, такими как PGC-1 α , повышает транскрипцию глюкозо-6-фосфатазы, тем самым увеличивая скорость продуцирования глюкозы. Глюкозо-6-фосфатаза катализирует последнюю стадию в глюконеогенезе и гликогенолизе, вызывая 25 высвобождение глюкозы из печени. Поэтому она является важной в контроле гомеостаза глюкозы, особенно у пациентов с диабетом.

Как правило, процесс фосфорилирования FOXO контролируется непосредственно другим ферментом-киназой под названием АКТ (протеинкиназа В). АКТ фосфорилирует FOXO и перемещает его из ядра, тем самым уменьшая продукцию глюкозы через 30 уменьшение скорости транскрипции глюкозо-6-фосфатазы. АКТ сама по себе находится под контролем посредством мини-молекулярной каскадной реакции против направления каскада, которая начинается связыванием инсулина с его рецептором на поверхности клетки. Это инициирует ряд событий с участием двух других ферментов-киназ, фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы 1 35 (PDK1). Общий путь известен как путь инсулин/PDK/PDK1/Akt, и работает как контролирующий гомеостаз глюкозы посредством инсулиновой сигнализации. В контексте контроля FOXO, PDK1 фосфорилирует и активирует Akt, который, в свою очередь, фосфорилирует и инактивирует FOXO.

- 40 В вариантах реализации предложен способ или применение для увеличения фосфорилирования FOXO3 и FOXO4 в одной или более клетках печени, включающий введение композиции, содержащей по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций.

45 В вариантах реализации способ модулирования метаболизма глюкозы в одной или более клетках, выбранных из клеток печени, клеток скелетной мускулатуры и их комбинаций включает: введение эффективного количества композиции одной или более клеткам, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения,

выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество изменяет метаболизм глюкозы в клетке печени или скелетной мускулатуры по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В вариантах реализации указанная композиция может не включать одно или более из H (5'-Метилтиоаденозин), I (5'-Аденозил-L-гомоцистеин) и/или J (Гамма-глутамил-метил-цистеин).

В вариантах реализации настоящей заявки предложено применение композиции, содержащей по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III) для модулирования метаболизма глюкозы в клетке печени или мускулатуры.

В вариантах реализации способ лечения диабета II типа включает: введение субъекту эффективного количества композиции, при этом композиция содержит по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из: 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III), при этом эффективное количество изменяет метаболизм глюкозы в клетке печени или мускулатуры по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией. В вариантах реализации указанная композиция может не включать одно или более из H (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) и/или J (Гамма-глутамил-метил-цистеин).

В вариантах реализации настоящей заявки предложено применение композиции, содержащей по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III) для лечения диабета у субъекта.

В вариантах реализации предложен способ или применение для ингибиования экспрессии G6rc в одной или более клетках печени, включающий: введение композиции, содержащей по меньшей мере три соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы I, соединения формулы II, соединения формулы III и их комбинаций. В вариантах реализации указанная композиция может не включать одно или более из H (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) и/или J (Гамма-глутамил-метил-цистеин).

В вариантах реализации настоящей заявки предложено применение для композиции, содержащей по меньшей мере три различных соединения, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I) и соединения формулы (III) для ингибиования глюкозо-6-фосфатазы.

В вариантах реализации увеличение фосфорилирования FOXO или снижение G6rc варьируется от приблизительно 50% увеличения или снижения до 500% увеличения или снижения, соответственно, по сравнению с клеткой идентичного типа, не обработанными указанным соединением. Величина ответа зависит от типа клеток, определенного используемого соединения и времени контакта с клеткой.

Селеносодержащие соединения влияют на генную экспрессию в клетках печени по-разному. В то же время действие соединений и композиций на клетки печени, как описано в настоящем документе, одной и той же или аналогичной композиции может повлиять

на нейрональные клетки противоположным образом. Например, композиция, как описано в настоящем документе, снижает фосфорилирование FOXO3 и/или FOXO4 в нейрональных клетках. Экспрессия PGC1a увеличивается, приводя к увеличению глюконеогенеза в нейрональных клетках. В то же время, то же соединение или композиция увеличивает фосфорилирование FOXO3 и/или FOXO4 в клетках печени, и экспрессия PGC1a не изменяется.

Как описано в контексте нейрональных клеток IMR-32, PGC1a является решающим геном для биогенеза МТ и углеводного обмена. В клетках печени он также действует совместно с FOXO, чтобы управлять транскрипцией генов, участвующих в

глюконеогенезе, но не в состоянии это осуществить при отсутствии FOXO в ядре. Мы исследовали экспрессию белка PGC1a и не наблюдали значительного изменения уровня белка PGC в клетках печени после лечения комбинацией CDE путем количественного анализа. Тем не менее, из-за стойкого эффекта, отмеченного при фосфорилировании FOXO в ответ на CDE, почти достоверно, что он будет исключен из ядра и, следовательно, уровень PGC1a станет мало значимым, так как FOXO требуется для инициирования процесса глюконеогенеза. Совместно эти результаты свидетельствуют о том, что комбинация CDE не влияет на сигнализацию PI3k/PDK1/АКТ и некоторые другие прямые или косвенные сигнальные молекулы по направлению сигнального каскада АКТ, за исключением описанных выше, но важнейших FOXO. Другими словами, комбинация CDE избирательно инактивирует FOXO, и это действие, по-видимому, не зависит от сигнализации PI3K/PDK1/АКТ в клетках печени.

В вариантах реализации эффективное количество соединений и композиций, как описано в настоящем документе, представляет собой количество, эффективное для ингибирования экспрессии G6rc, модулирования метаболизма глюкозы или увеличения фосфорилирования FOXO в клетках печени без токсичности для клеток. Генную экспрессию в клетках печени можно определить с применением ряда анализов образца, взятого у субъекта, обработанного композициями, описанными в настоящем документе. Выбранное эффективное количество не проявляет токсичности для любых из приведенных в пример клеток, включая клетки почек, скелета мыши, нейрональные клетки человека или клетки печени мыши.

Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого субъекта могут зависеть от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, определенное соединение для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и взаимодействие с другими лекарственными средствами, которые вводят одновременно.

В вариантах реализации эффективное количество селеносодержащей композиции согласно настоящему изобретению для введения субъекту для ингибирования экспрессии G6rc, модулирования метаболизма глюкозы, лечения диабета II типа или увеличения фосфорилирования FOXO в клетках печени или скелетной мускулатуры составляет примерно 5 мкг или более или 800 мкг или менее в сутки одного необходимого биологически активного селеносодержащего соединения или нескольких необходимых биологически активных селеносодержащих соединений. Когда присутствуют несколько необходимых биологически активных селеносодержащих соединений, эффективное количество композиции для введения субъекту является общим количеством для всех необходимых биологически активных селеносодержащих соединений в композиции.

В вариантах реализации эффективное количество необходимого биологически активного селеносодержащего соединения для введения субъекту составляет примерно от 5 мкг до примерно 800 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно

700 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 600 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 500 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 400 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 300 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 200 мкг и каждую величину между ними, от 5 мкг до примерно 100 мкг и каждую величину между ними и от 5 мкг до 50 мкг.

В вариантах реализации настоящего изобретения композиции, содержащие соединения, как описано в настоящем документе, предпочтительно вводят в количестве 200 мкг или менее в сутки или 50 мкг или менее в сутки. В вариантах реализации дозировку можно скорректировать в зависимости от эффективности, или если у субъекта наблюдаются какие-либо явные признаки селенового токсикоза, такого как дыхание с запахом чеснока, потеря волос или слоящиеся ногти.

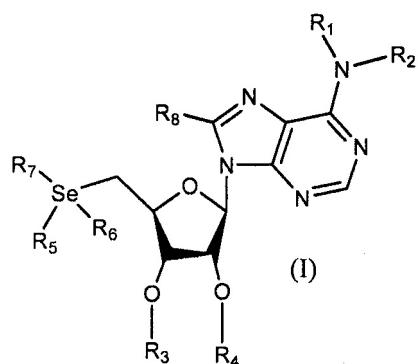
В вариантах реализации в композициях, которые содержат два или более соединений, выбранных из группы, состоящей из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, соединения формулы (I), соединения формулы (II), соединения формулы (III) и их комбинаций, соединения присутствуют в композиции в равных частях. В других вариантах реализации соотношение одного соединения к другому может составлять примерно от 4:1 до 1:1.

В вариантах реализации дозировку вводят по меньшей мере один раз в день в течение периода времени, чтобы достичь устойчивого состояния элементарного селена в крови. В вариантах реализации дозировку вводят ежедневно в течение по меньшей мере 60 или 90 дней. В вариантах реализации дозировку вводят в то время, как субъект испытывает симптомы болезни или расстройства. В вариантах реализации указанный субъект пребывает в возрасте, когда увеличивается риск заболеваний, связанных с митохондриями, например, в возрасте по меньшей мере 40 лет.

В других вариантах реализации доставку к печени можно направлять посредством применения липосом или сфер PLGA, содержащих антитело, посредством получения селеногликозида или пролекарства в качестве направляющего агента к печени.

Другие варианты реализации настоящей заявки

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' представляет собой алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклик; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R₂ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил,

циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

5 R₃ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или C-амидо; или R₃ совместно с R₄ и атомами, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

10 R₄ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или C-амидо; или R₃ совместно с R₄ и атомами, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

15 R₅ представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

R₆ представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует;

где

20 R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

R₇ представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, кетон, аминоспирт, аминокислоту,

OR', Se-R', S-R', где R' выбран из H, алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; и

R₈ представляет собой водород, азидо, алкил, алкенил, алкинил.

25 В других вариантах реализации одно или более из этих соединений формулы (I) может быть выделено и/или очищено.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁, R₃, R₄ и R₈ каждый представляет собой H; R₂ 30 представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R' или C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; R₅ и R₆ каждый отсутствует; и R₇ представляет собой алкил или аминокислоту.

35 В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁, R₃, R₄ и R₈ каждый представляет собой H; R₂ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; R₅ и R₆ каждый отсутствует; и R₇ представляет собой алкил или аминокислоту; при условии, что 5'-селеноаденозил-метионин, дегидрокси-5'-метилселеноаденозин, этилселеноаденозин, селено(гидроксил)-селенофен-(3'-дезоксиаденозин), аллилселеноаденозил-гомоцистеин, селено-аденозил-гомоцистеин, селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин, селеноаденозин, селено-аденозил-Se(метил)-селеноксид, 40 аденоизил-гидрокси-селеноксид, этил-селеноаденозин, селено-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезокси-аденозин), аденоизил-гидрокси-селеноксид и селено-аденоизил-Se(метил)-селеноксид каждый может быть исключен из композиции.

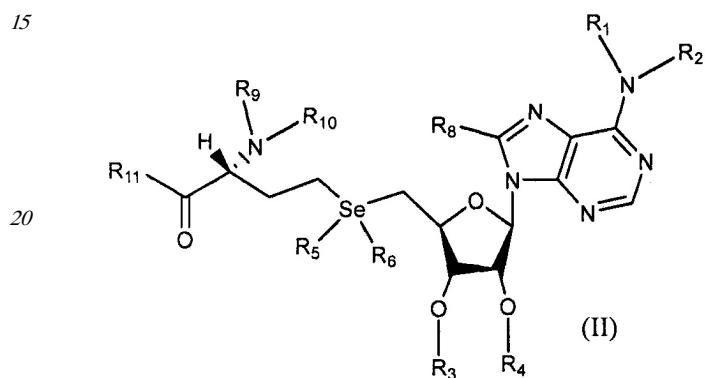
45 В определенном аспекте предложена композиция, содержащая по существу или

состоящая из соединения или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, согласно формуле (I), которое представляет собой 5'-метилселеноаденозин ("соединение C").

В некоторых вариантах реализации композиции состоят по существу или состоят из

5 соединения согласно формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, при условии, что 5'-селеноаденозил-метионин, дегидрокси-5'-метилселеноаденозин, этилселеноаденозин, селено(гидроксил)-селенофен-(3'-дезоксиаденозин), аллилселеноаденозил-гомоцистеин, селено-аденозил-гомоцистеин, селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин, селеноаденозин, селено-аденозил-Se(метил)-селеноксид, 10 аденоцил-гидрокси-селеноксид, этил-селеноаденозин, селено-(гидрокси)-селенофен-(3'-дезокси-аденозин), аденоцил-гидрокси-селеноксид и селено-аденозил-Se(метил)-селеноксид каждый может быть исключен из композиции.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (II):



25 или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' представляет собой алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклик; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с 30 одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R₂ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; или R₁ совместно с R₂ образуют гетероциклическое кольцо, 35 содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R₃ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или C-амидо; или R₃ совместно с R₄ и атомами, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с 40 одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R₄ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, циклоалкил, карбоксил или C-амидо; или

R₃ совместно с R₄ и атомами, к которым они присоединены, образуют 45 гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R₅ представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;
 R₆ представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует;

где

R' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или аралкила;

⁵ R₈ представляет собой водород, азидо, алкил, алкенил, алкинил;

R₉ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил,

циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' представляет собой алкил, циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклик; или R₉ совместно с R₁₀ образуют гетероциклическое кольцо,

¹⁰ содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R₁₀ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил,

циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; или R₉ совместно с R₁₀ образуют гетероциклическое кольцо,

¹⁵ содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота; и

R₁₁ представляет собой OH, OR, алcoxси, аралcoxси или амино, где R выбран из

алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила или фармацевтически приемлемой соли или внутренней соли.

²⁰ В других вариантах реализации одно или более из этих соединений формулы (II) могут быть выделены и/или очищены.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (II) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁, R₃, R₄, R₈ и R₉ каждый представляет собой H;

²⁵ R₂ представляет собой H, ацил, алкил, карбоксил, C(O)R' или C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; R₅ и R₆ отсутствуют; R₁₀ представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, C(O)R', C(O)OR', где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила; и R₁₁ представляет собой OH, OR, алcoxси, аралcoxси или амино, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила или фармацевтически приемлемой соли или внутренней соли.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (II) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрат или пролекарства, где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ определены выше, и где R₁₁ представляет собой OH или OR, где R выбран из метила, этила, пропила, изопропила, бутила, втор-бутила или трет-бутила.

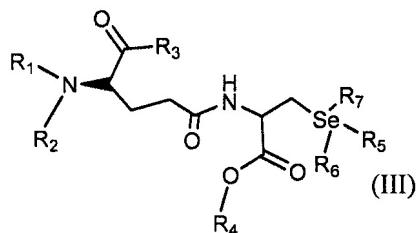
³⁵ В определенном аспекте предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (II) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ определены выше, и где R₁₁ представляет собой OH или OR, где R выбран из метила, этила, пропила, изопропила, бутила, втор-бутила или трет-бутила.

В некоторых вариантах реализации композиции состоят по существу или состоят из соединения согласно формуле (II) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства; при условии, что 5'-селеноаденозил-гомоцистеин (соединение "D") или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации композиции состоят по существу или состоят из соединения согласно формуле (II) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства; при условии, что 5'-селеноаденозил-метионин, аллилселеноаденозил-

гомоцистеин, селено-аденозил-гомоцистеин и селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин каждый может быть исключен из композиции.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (III):



или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R_1 представляет собой H, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, где R' представляет собой алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, аралкил или гетероциклик; или R_1 совместно с R_2 образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R_2 представляет собой Н, ацил, алкил, алкенил, алкинил, аралкил, карбоксил, циклоалкил, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, где R' выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероцикла; или R_1 совместно с R_2 образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 членов в кольце, по меньшей мере с одним гетероатомом, выбранным из кислорода или азота;

R_3 представляет собой OH, OR, алкокси, аралкокси или амино, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила или фармацевтически приемлемой соли или внутренней соли;

25 R_4 представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероциклик или фармацевтически приемлемую соль или внутреннюю соль:

R_5 представляет собой оксо, гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует; где

В' выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или араалкила;

В выборе из апельсина, апельсина, апельсина, цитрусовых, апельсина или апельсина, R₆ представляет собой оксо-гидроксил, алкил, алкенил, алкинил, OR' или отсутствует:

ENR

К выбран из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, арила или арапикала, и В представляет собой H , алкил, алкенил, алкинил, катен $\text{OB}^1\text{--S B}^1$, где B^1

К₇ представляет собой ти, алкил, алкенил, алкинил, кетон, СК₇, СС-К₇,

выбран из Н, алкила, циклоалкила, арила, аралкила или гетероциклила.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (III) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где

В и В₁ каждый представляет собой Н:

40 R_3 представляет собой OH, OR, аллокси, араллокси или амино, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, аралкила, гетероциклила или фармацевтически приемлемой соли или внутренней соли;

R_4 представляет собой Н или фармацевтически приемлемую соль или внутреннюю соль:

R_5 и R_6 отсутствуют; и

R_7 представляет собой алкил, алкенил или алкинил.
В других вариантах реализации одно или более из этих соединений формулы (III)

может быть выделено и/или очищено.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (III) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁ и R₂ каждый представляет собой

⁵ H; R₃ представляет собой OH или OR, где R выбран из метила, этила, пропила, изопропила, бутила, втор-бутила или трет-бутила; R₄ представляет собой H; R₅ и R₆ отсутствуют; и R₇ представляет собой алкил, который представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изо-бутил, втор-бутил или трет-бутил.

¹⁰ В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле III или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, где R₁ и R₂ каждый представляет собой H; R₃

представляет собой OH или OR, где R выбран из метила, этила, пропила, изопропила, бутила, втор-бутила или трет-бутила; R₄ представляет собой H; R₅ и R₆ отсутствуют;

¹⁵ и R₇ представляет собой метил.

В определенном аспекте предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (III) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, которое представляет собой гамма-глутамил-²⁰ метилселеноцистеин ("соединение E") или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из соединения согласно формуле (III) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или пролекарства, при условии, что γ -²⁵

глутамоилселеноцистеин- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-³⁰ селеноцистеин, ди- γ -глутамоилселеноцистеин, селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилселеноцистеин- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-³⁵ селеноцистеин, ди- γ -глутамоилселеноцистеин и селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин каждый может быть исключен из композиции.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из одного или более соединений согласно одной или более формулам (I), (II) и/или (III), при этом каждое из следующих соединений исключают из композиции,

чтобы минимизировать токсичность селена, удалить неактивные или ингибирующие соединения и/или максимально повысить терапевтический индекс композиции, при этом исключенные соединения представляют собой γ -глутамоилселеноцистеин- γ -⁴⁰

глутамоилцистеин, γ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-селеноцистеин, ди- γ -

глутамоилселеноцистеин, селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин, γ -⁴⁵

глутамоилселеноцистеин- γ -глутамоилцистеин, γ -глутамоилцистеин-2,3-DHP-

селеноцистеин, ди- γ -глутамоилселеноцистеин, селеноглутатион- γ -глутамоилцистеин,

⁴⁰ дегидрокси-5'-метилселеноаденозин, этилселеноаденозин, селено(гидроксил)-селенофен-

(3'-дезокси-аденозин), аллилселеноаденозил-гомоцистеин, селено-аденозил-гомоцистеин,

селено-гидрокси-аденозил-гомоцистеин, селеноаденозин, селено-аденозил-Se(метил)-

селеноксид, аденоизил-гидрокси-селеноксид, этил-селеноаденозин, селено-(гидрокси)-

селенофен-(3'-дезокси-аденозин), аденоизил-гидрокси-селеноксид и селено-аденозил-Se

(метил)-селеноксид.

В вариантах реализации любое из соединений, описанных в настоящем документе, может быть модифицировано, чтобы пролонгировать период полураспада, для защиты соединения от окисления, для направления соединения к ткани, для обеспечения прохождения соединением гематоэнцефалического барьера, как описано в настоящем

документе.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из одного или более соединений, каждое согласно формуле (I). В некоторых аспектах композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (I), содержит 5'-метилселеноаденозин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и 5'-селеноаденозил-гомоцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из одного или более соединений, каждое согласно формуле (I) и формуле (III). В некоторых аспектах композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (I) и формуле (III), содержит 5'-метилселеноаденозин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; 5'-селеноаденозил-гомоцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и гамма-глутамил-метилселеноцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации композиция, содержащая по существу или состоящая из одного или более соединений, каждое согласно формуле (I) и формуле (III), содержит 5'-метилселеноаденозин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и гамма-глутамил-метилселеноцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

В некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая по существу или состоящая из одного или более соединений, каждое согласно формуле (II) и формуле (III). В некоторых аспектах композиция, содержащая одно или более соединений, каждое согласно формуле (II) и формуле (III), содержит 5'-селеноаденозил-гомоцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство; и гаммаглутамил-метилселеноцистеин или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или пролекарство.

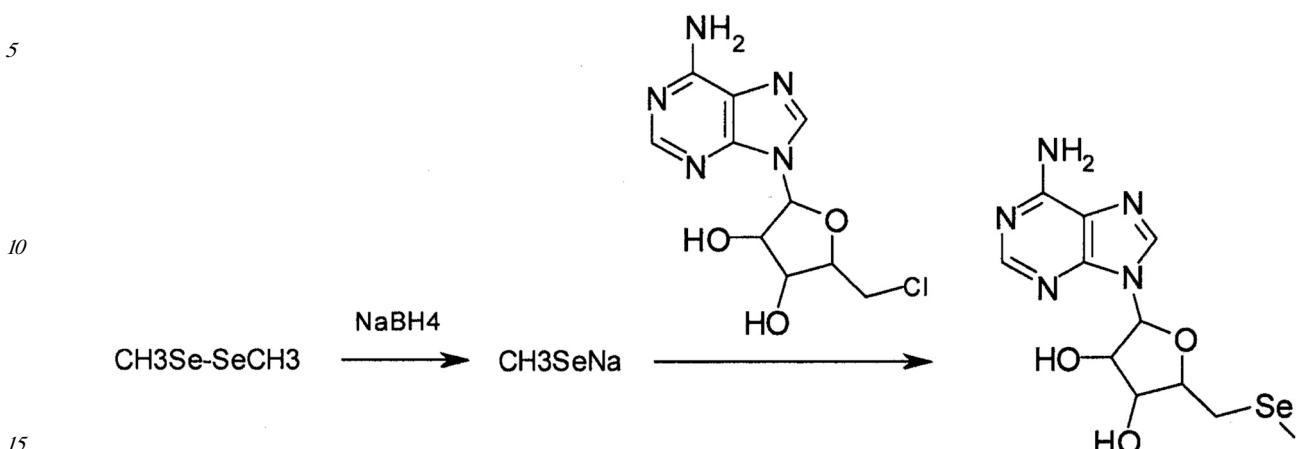
Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, которая по существу состоит из терапевтически эффективного количества одного или более соединений согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира или пролекарства, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. Фармацевтически приемлемые носители включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошок трагакантовой камеди; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для изготовления суппозиториев; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Указанные композиции могут быть приготовлены для любого пути введения, как описано в настоящем документе.

Пример 1

Синтез и характеристика 5'-Метилселеноаденозина ("С")

Схема синтеза и методология представляла собой:

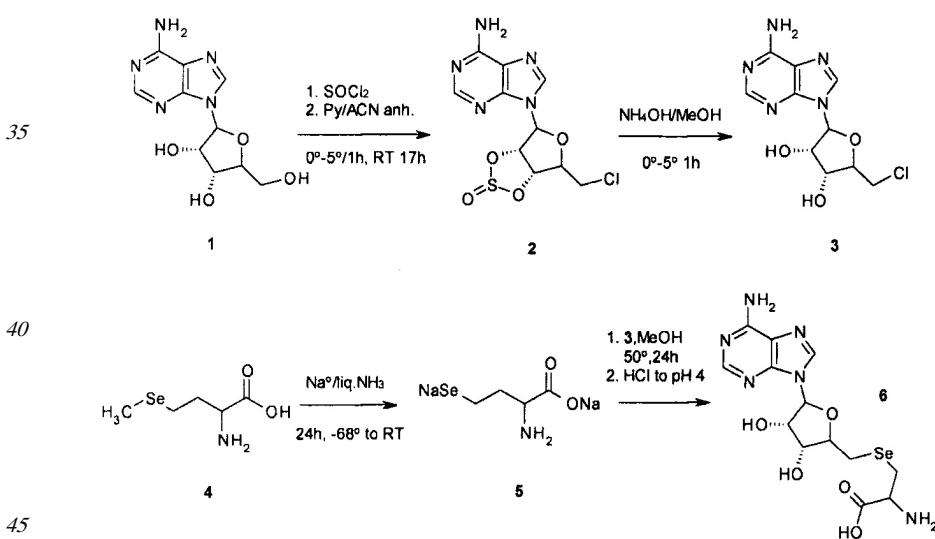


Борогидрид натрия (227 мг, 6,0 мМ, в атмосфере Ar) помещали в 200 мл круглодонную колбу, содержащую 20 мл безводного этилового спирта, оснащенную магнитной мешалкой и помещенную в ледяную охлаждающую баню. Из шприца добавляли диметилдиселенид (190 мкл, 376 мг, 2,0 мМ), при охлаждении, перемешивании и в токе Ar. После обесцвечивания желтоватого раствора добавляли твердый 5'-хлор-5'-дезоксиаденозин (1,143 г, 4,0 мМ). 5'-Cl-Ade является очень плохо растворимым в этиловом спирте. Более 100 мл этилового спирта добавляли для растворения осадка. Перемешивание смеси при комнатной температуре продолжали в течение следующих четырех суток. MS применяли для отслеживания превращения. ~75% превращения завершалось после 5 суток. Растворители выпаривали, и продукт 3,22 г (с ~20% SM) собирали и очищали посредством обратнофазной (C-8) препаративной хроматографии с получением 1,1 г чистого продукта, молекулярную массу которого подтверждали посредством масс-спектрометрии.

Пример 2

Синтез и характеристика Se-Аденозил-L-гомоцистеина ("D")

Схема синтеза и методология представляла собой:



5'-Хлор-5'-дезоксиаденозин (639-62)

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 помещали в высушеннную в печи, 2 л, 4-горлую

колбу, оснащенную капельной воронкой, мешалкой, подводом/отводом газа и термометром. Реакционную смесь помещали в ледяную/соляную баню. Начинали перемешивание, и когда температура раствора опускалась ниже 3°C, начинали очень медленное добавление тионилхлорида (сильная экзотермическая реакция). Температуру 5 реакционной смеси необходимо поддерживать ниже 5°C в процессе добавления тионилхлорида и в течение еще 4 ч (в это время указанный раствор становился желтым, с бело-желтым осадком на дне). Затем реакционную смесь оставляли в течение ночи при температуре окружающей среды. На следующее утро объемный осадок 10 отфильтровывали с применением фильтра из пористого стекла и промывали на фильтре тремя объемами по 100 мл сухого ацетонитрила, в процессе чего цвет осадка изменялся на белый. Влажный осадок затем обратно помещали в 2 л реакционную колбу, 15 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 мин 20 при температуре окружающей среды, и белый осадок, который образовался, отделяли от жидкости посредством фильтрования в вакууме. Фильтрат концентрировали досуха с применением вакуумного роторного испарителя, а осадок кристаллизовали из ~560 25 мл горячей воды, охлаждали на ледяной водяной бане, и первую партию кристаллов отфильтровывали и лиофилизировали. Затем этот фильтрат применяли в качестве растворителя при кристаллизации твердых веществ, полученных после роторного выпаривания первого фильтрата, с получением второй партии продукта, которую также лиофилизировали (2 дня). Обе партии кристаллов в конце высушивали в течение 30 двух суток над пятиокисью фосфора в вакуумном эксикаторе. Получали 84 г белых кристаллов, 80,5% выход. MS (286-M+H), тр. 187°C.

25 Селеноаденозилгомоцистеин (655-40)

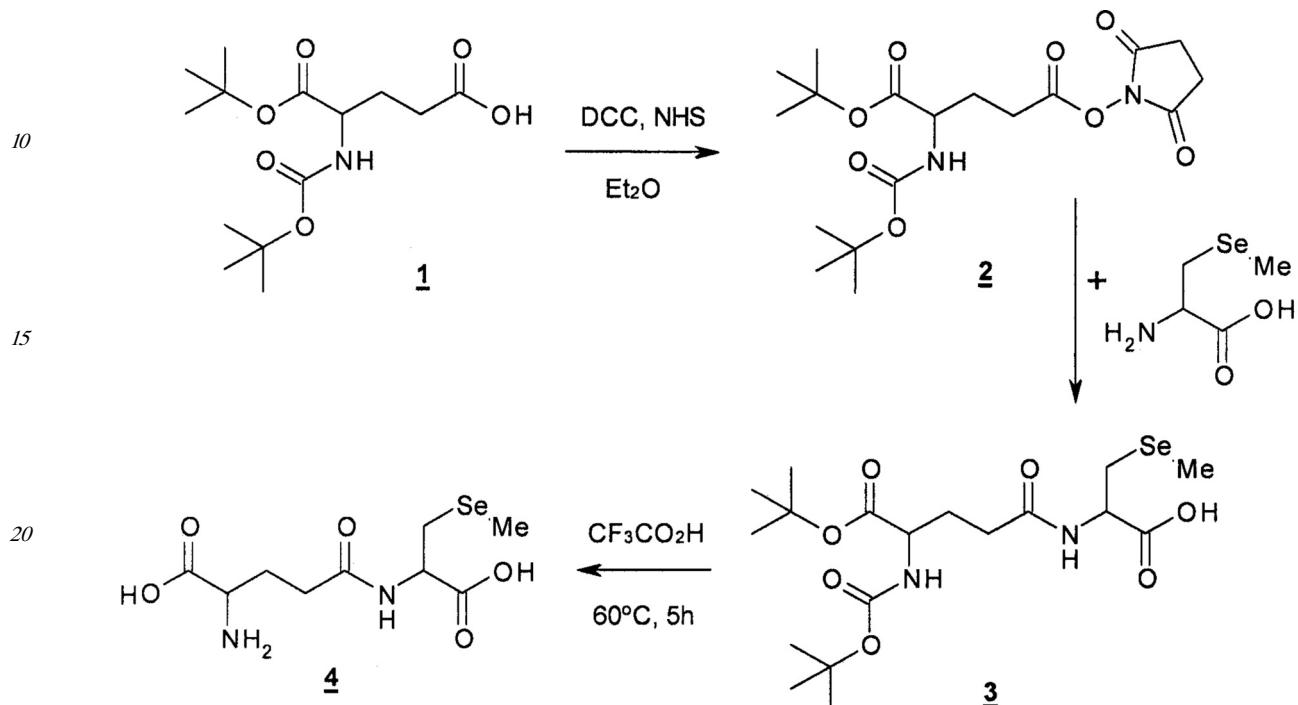
9,806 г (50 мМ, 1 экв.) L-селенометионина загружали в 2 л трехгорлую колбу, оснащенную термометром, большим погружным холодильником (с барботажным измерителем на выходе), подводом газа аммиака (достигающим дна колбы) и магнитной мешалкой, и помещали в 2,5 л сосуд Дьюара, содержащий охлаждающую баню 30 CO₂-ацетон. Ar° пропускали через колбу перед добавлением твердого CO₂ к ацетоновой бане и погружному холодильнику. Когда температура внутри колбы падала ниже -35°C, пропускали поток безводного аммиака (газ), и когда уровень жидкого аммиака достигал объема 800 мл, поток газа прекращали. В это время в хорошо перемешанный раствор добавляли маленькие кусочки металлического натрия до сохранения фиолетово-35 голубого окрашивания раствора в течение ~30 сек. Всего в течение 45 мин добавляли 2,645 г (115 мМ, 2,3 экв.) натрия. Перемешивание и охлаждение поддерживали в течение еще 30 мин. В это время все компоненты находились в растворе. 14,856 г (52 мМ, 1,04 экв.) безводного 5'-хлор-5'-дезоксиаденозина добавляли одной частью, и реакционную смесь оставляли при перемешивании и очень низкой скоростью потока Ar° на ночь. На 40 следующее утро (если весь аммиак вышел) 350 мл безводного метанола добавляли к белому твердому веществу, которое присутствовало в колбе. Колбу помещали на масляную баню, устанавливали обратный холодильник, поддерживали поток газа Ar°, и нагревали на масляной бане до 50°C в течение следующих 24 ч. В это время 1 мл раствора подкисляли до pH 3,5 несколькими каплями 0,1 н. HCl, и образец анализировали 45 на присутствие субстратов с применением масс-спектрометрии. Если они составляют ниже 5%, смесь можно подкислять посредством 1 н. HCl до pH 3,5, фильтровать от солей, концентрировать досуха с применением вакуумного роторного испарителя, и неочищенный продукт можно очищать посредством кристаллизации в смеси вода-

этанол. 15,98 г (74% выход) первой партии кристаллов селеноаденозилгомоцистеина имели ~95% чистоты, и их можно применять в биологических исследованиях без дополнительной очистки.

Пример 3

5 Синтез и характеристизация Гамма-глутамил-метилселеноцистеина

Схема синтеза и методология представляла собой:



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

N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OH (303 мг, 1,0 Ммоль), N-гидрокисукцинимид (121 мг, 1,05 Ммоль) и дициклогексил карбодиимид (227 мг, 1,1 Ммоль) суспендировали/растворяли в 15 мл безводного этилового эфира, и в реакционную смесь добавляли 10 мкл диметилэтилбензиламина из шприца. Перемешивание при температуре окружающей среды (22°C) поддерживали в течение 48 ч. Смесь фильтровали, и осадок промывали 10×10 мл этилового эфира. Фильтрат концентрировали и сушили под глубоким вакуумом с получением белого кристаллического продукта (570 мг, ~90% выход). MS ($\text{M}+\text{Na}^+$) = 423,17;

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

N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu (570 мг, 0,9 Ммоль), метилселеноцистеин (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 магнитной мешалкой поддерживали в течение 100 ч. После этого времени добавляли 1,21 н. HCl (1,65 мл), и постреакционную смесь экстрагировали посредством 3×20 мл этилового эфира, и экстракт концентрировали досуха с применением вакуумного ротационного испарителя с получением 649 мг воскообразного продукта, который подвергали анализу посредством препаративной ВЭЖХ. Собирали 283 мг продукта (75,6% выход). Молекулярную массу продукта и присутствие одного атома Se в нем подтверждали посредством масс-спектра. Расчетный

45 Ms для $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7\text{Se}=468,42$; Фактический 469,4 m/e ($\text{M}+\text{H}^+$) и 491,24 m/e ($\text{M}+\text{Na}^+$).

Синтез Гамма-Глутамил-метилселеноцистеина (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 на масляной бане с перемешиванием на магнитной

мешалке в течение 6 ч и при 63°C и оставляли на ночь при температуре окружающей среды (22°C). После этого времени реакционную смесь добавляли (по каплям) в интенсивно перемешиваемый этиловый эфир (20 мл). Образованный осадок промывали 2×20 мл этилового эфира с получением 138,3 мг кремового осадка, который затем очищали посредством препартивной ВЭЖХ.

5 Пример 4

Три синтетических селеноорганических соединения испытывали по отдельности или в комбинации на клеточной культуре для воздействия на митохондриальную функцию, выживаемость клеток и экспрессию генов. Тестируемые клетки включали клетки печени, 10 клетки почек, нейрональные клетки и клетки скелетной мускулатуры.

Материалы и способы

Клеточные линии и AT соединения

Человеческие эмбриональные клетки почек HEK293T были любезно предоставлены Dr. Qiutang Li (Университет г. Луисвилл). Клеточная линия миобластов скелетных мышц 15 мышей C2C12 была любезно подарена Dr. Xiao (Университет Кентукки). Нейробластные клетки человека IMR-32 и клеточная линия печени мышей AML-12 были приобретены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, Вирджиния). Все эти клетки амплифицировали в культуральных средах, рекомендуемых ATCC.

Соединение C (5'-Метилселеноаденозин), D (Se-Аденозил-L-гомоцистеин)) и E (Гамма-

20 глутамил-метилселеноцистеин)) и их серосодержащие аналоги H (5'-Метилтиоаденозин), I (S-Аденозил-L-гомоцистеин) и J (Гамма-глутамил-метил-цистеин) идентифицировали как отдельные соединения из селенизированных дрожжей, содержащих менее 2% неорганического селена, и или синтезировали, или получали (при условии доступности) из коммерческих источников. Чистота всех тестируемых соединений была подтверждена, 25 как составляющая >99%, что определяли посредством масс-спектрометрии.

Флуоресцентный анализ митохондриального потенциала в клетках HEK293T

Клетки HEK293T культивировали в 8-камерных предметных стеклах (1×10^4 клеток/камера) в течение 24 часов, и затем обрабатывали различными концентрациями соединений или их соответствующими серосодержащими аналогами (растворенными в стерилизованной воде) в течение 4,5 ч. Эти обработанные соединениями клетки дважды промывали посредством PBS и инкубировали с флуоресцентным красителем Mitotracker Orange (Invitrogen) при 37°C в течение 30 мин, и затем PBS заменяли свежим в соответствии с протоколом производителя. Затем флуоресцентные сигналы (митохондриальный потенциал) в этих живых клетках регистрировали с применением 30 флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Vert.A1 (Thornwood, Нью-Йорк). По меньшей 35 мере три образца в каждой обработанной группе анализировали под флуоресцентным микроскопом.

Количественный анализ митохондриального потенциала в клетках C2C12, IMR-32 и AML-12

40 Для клеток C2C12, равное количество клеток (1×10^4), высевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток Corning с прозрачным дном и темными стенками (VWR), культивировали в среде 10% FBS DMEM в течение 24 часов, и затем обрабатывали носителем (стерилизованной водой), соединениями C и D, а также их 45 серосодержащими аналогами в течение 24 и 48 часов. Эти клетки, обработанные носителем или соединением, дважды промывали PBS, инкубировали с флуоресцентным красителем Mitotracker Orange при 37°C в течение 30 мин, и затем PBS заменяли свежим. Интенсивности флуоресценции Mitotracker Orange (митохондриальный потенциал) в этих живых клетках определяли с помощью многорежимного флуоресцентного

спектрофотометра для микропланшетов Bio-Tek Synergy HT (Winooski, VT). Восемь образцов для каждой обработки рассматривали для приведенного выше анализа, и данные представляли как среднее значение \pm СО из восьми образцов.

Для клеток печени AML-12 клетки амплифицировали в 10% FBS среде Игла, 5 модифицированной по способу Дульбекко, и среде F12 Хэма (1:1) (DMEM/F12), дополненной IX инсулин/трансферин/селен (ITS, Sigma). Затем равное количество клеток (1 \times 10⁴ клеток/лунку) высевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток Corning с прозрачным дном и темными стенками (VWR, Рэднор, Пенсильвания), 10 культивировали в свободной от ITS среде 10% FBS DMEM/F12 в течение 24 ч, и затем подвергали обработке различными соединениями или комбинациями соединений в течение 6, 24 и 48 ч. Митохондриальный потенциал в живых клетках определяли посредством количественного анализа интенсивности флуоресценции с применением красителя Mitotracker orange, как описано выше. Кроме того, вышеуказанные 15 обработанные клетки инкубировали также с красителем Hoechst 33342 (Invitrogen, Grand Island, Нью-Йорк), чтобы окрасить клеточные ядра, в соответствии с протоколом производителя. Интенсивности флуоресценции окрашенных клеточных ядер по красителю Hoechst 33342 также определяли на флуоресцентном спектрофотометре для микропланшетов. Митохондриальный потенциал на клетку в живых клетках получали 20 путем нормализации интенсивностей флуоресценции красителя Mitotracker orange по интенсивностям флуоресценции красителя Hoechst 33342 в каждой лунке. Восемь образцов для каждой обработки рассматривали для приведенного выше анализа, и данные представляли как среднее значение \pm СО из восьми образцов.

Аналогично вышеуказанным исследованиям на AML-12 клетках, митохондриальный потенциал на клетку в живых клетках IMR-32 определяли с помощью многорежимного 25 флуоресцентного спектрофотометра для микропланшетов Bio-Tek Synergy HT со следующими изменениями. Для улучшения прикрепления клеток IMR-32 к чашкам для культивирования, планшеты для клеточных культур предварительно покрывали 0,1% желатином (Sigma, St. Louis, MO). По 2 \times 10⁴ клеток на 96 лунок высевали на 30 желатинизированные 96-луночные планшеты для вышеупомянутых исследований. Для того чтобы уменьшить смещение клеток, флуоресцентные красители Mitotracker orange и Hoechst 33342 (разведенные в культуральной среде) добавляли непосредственно в каждую лунку после обработки носителем или соединением. После инкубирования с красителем, среды для культивирования клеток тщательно заменяли IX PBS для 35 количественного анализа флуоресценции на спектрофотометре для считывания микропланшетов. Восемь образцов для каждой обработки рассматривали для приведенного выше анализа, и эксперименты повторяли по меньшей мере пять раз. Данные представляли как среднее значение \pm СО из восьми образцов. Анализ жизнеспособности клеток

40 Жизнеспособность клеток у культивированных клеток определяли с применением наборов для анализа Promega's CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, равное число C2C12 (1 \times 10⁴ клеток/лунку), AML-12 (1 \times 10⁴ клеток/лунку) и IMR-32 (2 \times 10⁴ клеток/лунку) высевали на 96-луночные прозрачные планшеты (VWR) и обрабатывали носителем или 45 соединениями в течение 24, 28 и/или 72 час. Затем культивированные клетки инкубировали с раствором AQueous One solution (100 мкл/лунку) при 37°C в течение 1 ч, и поглощение при OD490 нм в каждом образце определяли с помощью спектрофотометра для микропланшетов Bio-Tek. Жизнеспособность клеток у

культивированных клеток определяли путем вычитания OD490 нм культивируемых клеток от OD490 нм в обычной культуральной среде (без засева клеток). Восемь образцов для каждой обработки изучали для приведенного выше анализа. Данные представляли как среднее значение \pm СО из восьми образцов.

5 Выделение РНК и анализ ПЦР в реальном времени

Клетки человека IMR-32 высевали на желатинизированные 6-луночные ($6,5 \times 10^5$ клеток/лунку) или 24-луночные ($1,3 \times 10^5$ клеток/лунку) планшеты, в то время как клетки печени мышей AML-12 культивировали на непокрытых 6-луночных ($3,33 \times 10^5$ клеток/лунку) или 24-луночных ($6,7 \times 10^4$ клеток/лунку) планшетах. Клетки обрабатывали носителем (контроль) или различными соединениями в течение 6, 24 или 48 часов. Суммарную РНК из этих клеток выделяли с применением тризола (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя, и затем инкубировали с ДНКазой I, чтобы удалить любую потенциальную загрязняющую геномную ДНК. Затем образцы РНК подвергали анализу посредством ПЦР в реальном времени с применением набора Applied-Bioscience's RT kit и предварительно разработанных зондов Taqman (Invitrogen), как описано ранее (Lan et al. EMBO J 2003). От трех до шести образцов анализировали для каждой обработанной группы. Данные нормализовали по уровням актина B (Actb) или глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (Gapdh) в каждом образце, и представляли как среднее значение \pm СО для 3-6 образцов.

Подготовка белка и анализ вестерн-блоттинга

Клетки IMR-32 и AML12 высевали на 6-луночные планшеты, и затем обрабатывали носителем и различными соединениями в течение 6 и 24 ч, как описано выше. После обработки клетки промывали ледяным PBS и лизировали в ледяном RIPA буфере, содержащем полные ингибиторы протеиназы и фосфатазы (Themo-Fisher Scientific, Waltham, MA) на льду в течение 30 мин. Клеточные лизаты собирали с помощью скребка для клеток и пипетки для переноса, и затем центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при 4°C для удаления пеллет ДНК и получения белкового экстракта. Уровни белка в супернатанте этих клеточных лизатов определяли с помощью набора для анализа белка Pierce Micro-BCA protein assay kit (Themo Scientific-Pierce Biotechnology, Rockford, IL) в соответствии с протоколом производителя.

Для анализа вестерн-блоттинга пять микрограммов общего белка из клеток, обработанных носителем и соединением(ями), подвергали разделению на геле SDS-PAGE, и затем переносили на мембранны PVDF, как описано ранее (Reddy, Liu et al. 2008 Science). Мембранны блокировали в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 5% (масс/об.) бычьего сывороточного альбумина (Sigma, St. Louis, MO), и инкубировали с определенными первичными антителами с последующей инкубацией с HRP-конъюгированными вторичными антителами к мыши или кролику (разведение 1:5000, Cell Signaling Inc.). Все первичные антитела, кроме G6PC (Santa Cruz), Actb (Li-COR, Линкольн, Небраска), Elf2be и pElf2be (Abeam, Cambridge, MA) приобретали у Cell Signaling Inc. Положительные сигналы на мембранных блотах детектировали с помощью реагентов усиления хемилюминесценции для вестерн-блоттинга Amersham's enhanced chemiluminescence Western Blotting Prime Detection reagents (GE Healthcare LifeScience, Питтсбург, Пенсильвания). Изображения этих сигналов люминесценции на мембранных блотах получали с помощью системы LI-COR Odyssey Fc Image system (Линкольн, Небраска). Тот же мембранный блот размечали и повторно наносили другое антитело, как описано в протоколе первичного детектирования GE WB ECL (GE Healthcare Lifescience, Питтсбург, Пенсильвания). Плотности полос белка в вестерн-блоттинге

определяли с применением программного обеспечения Li-COR Image studio или программного обеспечения NIH ImageJ, и затем нормализовали по уровню Actb в каждом образце. Данные представляли как среднее значение \pm СО для трех образцов на каждую группу.

5 Статистический анализ

Если это применимо, t-критерий Стьюдента приводили с целью определения статистической разницы между этими двумя группами. Значение Р менее 0,05 считали существенным.

Результаты и обсуждение: митохондриальная функция

10 Чтобы проверить, может ли соединение С или D увеличивать митохондриальный ("МТ") потенциал в культивируемых клетках почек человека, клетки НЕК293Т обрабатывали 37,5 и 75 ppb соединений С или D. Эти количества основаны на работе с анализом Seahorse, где эффективная доза оказалась составляющей 100-150 ppb. Соединение С, а также его серосодержащий аналог Н, инкубировали с клетками 15 НЕК293Т в течение 4,5 часов (ч) и подвергали флуоресцентному анализу под микроскопом. Как показано на фигуре 1, соединение С в более низких дозах (37,5 ppb) увеличивало МТ потенциал, в то время как наблюдали более слабое действие на МТ потенциал в клетках почек, обработанных более высокой дозой (75 ppb) соединения в течение 4,5 ч. В то же время, соединение D во всех тестируемых дозах не влияло на МТ 20 потенциал (фигура 1).

Наши результаты ясно показали, что соединение С увеличивало МТ потенциал в клетках почек, в то время как соединение D было неэффективным. Учитывая, что селен присутствует в обоих соединениях С и D, а также что их серосодержащие аналоги, Н и J, соответственно, оказались неспособными стимулировать активность митохондрий, 25 следует сделать вывод о том, что стимулирующее действие соединения С в клетках почек обусловлено совместным действием селена и молекулярной структуры, окружающей селен, в этом селеноорганическом соединении. Стимулирующая активность не является следствием только действия селена.

Важность способности увеличивать митохондриальную активность в клетках почек

30 может иметь весьма существенные преимущества для здоровья, особенно у пациентов с диабетом. В недавних исследованиях (Sharma et al., J AM Soc Nephrol, 2013: 1901-12) из метаболомического анализа мочи от популяции больных диабетом пришли к выводу, что диабетическое заболевание почек явно связано со снижением митохондриальной функции. Диабетическая болезнь почек (DKD) является основной причиной 35 терминальной стадии почечной недостаточности, и авторы пришли к выводу, что терапевтические подходы, которые восстанавливают или повышают митохондриальную функцию, могут смягчить или даже остановить DKD. Дополнительный интерес представляет тот факт, что авторы связывают митохондриальную дисфункцию в этих случаях со снижением экспрессии транскрипционного коактиватора под названием 40 PGC1a. Как будет показано ниже, PGC1a является мишенью синтетических соединений селена, описанных в настоящей заявке.

Увеличение митохондриального потенциала посредством соединений С и D в клетках мышей C2C12

Чтобы проверить действие соединений С или D на МТ потенциал в клетках скелетной 45 мускулатуры, клетки C2C12 обрабатывали носителем (вода, контроль) и различными концентрациями селеносодержащих и серосодержащих соединений, и затем подвергали количественному анализу МТ потенциалов. Как показано на фигуре 2, МТ потенциал снижался в клетках C2C12 после обработки серосодержащими аналогами в течение 24

часов (по сравнению с контролем), показывая, что серосодержащие соединения показали некоторую МТ токсичность в клетках скелетной мускулатуры. В то же время, соединения селена С и D значительно увеличили потенциал МТ (фиг. 2).

Два аспекта этого результата являются особенно неожиданными и непредвиденными.

- 5 Во-первых, соединение D, в то время как было неактивным в клетках почек, было очень эффективным в стимулировании активности митохондрий в мышечных клетках (некоторые в два раза по сравнению с уровнем контроля в его наиболее эффективной дозе). Более того, в более низких дозировках (37,5 и 75 ppb, фиг. 2), оно оказалось более сильным, чем соединение С, которое (как показано выше) было единственным
- 10 10 эффективным тестируемым соединением в клетках почек.

Во-вторых, серосодержащие аналоги С и D, нежели просто не оказывать никакого действия по сравнению с контрольными клетками, обработанными носителем, ингибировали митохондриальную активность (снижали ее на 2/3 в некоторых случаях). Об этом эффекте ранее не сообщали, но это может помочь объяснить, почему в

- 15 некоторых исследованиях с применением дрожжевых препаратов, обогащенных селеном, сообщали о про-диабетических эффектах у субъектов, получающих эти добавки. Хотя обычно селен заменяет серу в серосодержащих молекулах дрожжей в процессе обогащения селеном, серосодержащие молекулы в них в конечном препарате всегда будут преобладать (сера является макроэлементом, и ее невозможно полностью удалить
- 20 при любом процессе роста или ферментации). Таким образом, присутствие некоторых серосодержащих молекул в дрожжах, обогащенных селеном, может в некоторых случаях ингибировать митохондриальную активность и приводить с течением времени к про-диабетическому состоянию. В литературе хорошо документально подтверждено, что сахарный диабет взрослом возрасте связан с постепенным снижением митохондриальной
- 25 активности в течение периода нескольких лет. Это особенно важно в случае скелетных мышц, которые, по оценкам, используют 75-80% ежедневно употребленной глюкозы. Даже незначительное снижение в способности мышечных митохондрий эффективно утилизировать глюкозу может с течением времени привести к серьезным проблемам со здоровьем. Двукратное стимулирование митохондриальной активности, отмеченное
- 30 в мышечных клетках C2C12 в ответ на соединение D, например, может представлять собой способ избежать или отсрочить снижение митохондриальной функции в мышечной ткани субъектов с пре-диабетическим или диабетическим состоянием.

- Чтобы исследовать, вызвано ли наблюдаемое увеличение МТ потенциала соединением С и D просто увеличением количества жизнеспособных клеток, мы провели анализ на
- 35 жизнеспособность клеток. Было установлено, что соединения С и D не влияют на клеточную жизнеспособность в клетках C2C12 после обработки этими соединениями в тех же дозах в течение 24 ч и 48 ч (данные не представлены). В совокупности наши результаты свидетельствуют о том, что соединения С и D не оказали негативного влияния на выживаемость клеток, но могут временно повысить потенциал МТ в клетках
- 40 C2C12. МТ потенциал временно увеличивали соединениями С, D и E в клетках IMR-32

- Для того чтобы исследовать, могут ли соединения селена регулировать МТ функцию в нейрональных клетках, клетки IMR32 человека обрабатывали различными соединениями в течение 6, 24 и 48 ч, и затем подвергали анализу митохондриального потенциала. Как показано на фиг. 3 (верхний рисунок), обработка соединениями D или E, или их комбинацией в течение 6 ч значительно повышала МТ потенциал по сравнению с контрольными нормальными клетками (с обработкой носителем водой), тогда как также наблюдалась тенденция к повышению МТ потенциала в клетках IMR-32, обработанных соединением С. Увеличение МТ потенциала также наблюдали в клетках,

обработанных соединениями Н или I и J (по сравнению с контролем, фигура 3, верхний рисунок). Однако повышенный потенциал МТ был более выраженным в клетках, обработанных соединением D или E, или комбинацией DE, чем их соответствующим серосодержащим аналогом(ами) (фигура 3, верхний рисунок).

Через 24 часа после обработки соединением наблюдалось значительное увеличение МТ потенциала во всех клетках, обработанных серосодержащим соединением (по сравнению с контролем). В целом, увеличенный потенциал МТ был более выраженным в клетках, обработанных селеносодержащим соединением С, D, E или их комбинацией CDE, чем их серосодержащими аналогами Н, I, J или комбинацией HIJ. Следует отметить, что в одном случае в момент времени 24 ч комбинация I и J вызывала самый высокий митохондриальный ответ. Тем не менее в момент 48 часов не было никаких существенных изменений в МТ потенциале среди всех тестируемых групп. Совместно эти результаты свидетельствуют о том, что селеносодержащие соединения С, D, E или комбинация этих соединений могут временно повысить потенциал МТ в IMR-32 клетках, и действие этих соединений селена более очевидно, чем их серосодержащих аналогов.

Опять же, существует заметный специфичный к клеткам и соединениям ответ, очевидный в этом эксперименте, который подчеркивает различный отклик типов клеток к этим определенным соединениям селена и их комбинациям. Более того, вместо того чтобы ингибировать митохондриальную активность, как и в случае мышечных клеток, серосодержащие соединения стимулировали митохондриальную активность IMR-32 клеток - хотя и в меньшей степени, в целом, чем соединения селена. Кратковременное или временное действие, отмеченное в данном случае, указывает на то, что эти соединения или их комбинации следует повторно вводить субъекту, подлежащему лечению, с тем, чтобы поддерживать воздействие на митохондриальную активность; в сущности, может потребоваться суточная доза.

МТ потенциал повышали посредством повторной обработки соединениями D или E в клетках IMR-32 в течение 48 часов в целом

Наблюданное выше временное действие соединений С, D и E на МТ потенциал побудило нас протестировать, способна ли повторная обработка повысить потенциал МТ. Таким образом, клетки IMR-32 сначала обрабатывали соединением С, D или E в течение 24 ч, и затем повторно обрабатывали свежеприготовленным соединением С, D или E в течение дополнительных 24 ч. В качестве отрицательного контроля клетки IMR-32 только однократно обрабатывали соединением С, D или E в течение 48 часов. Затем на этих клетках проводили анализы МТ потенциала. Как и ожидалось, длительная однократная обработка соединениями С, D или E в течение 48 ч (непрерывная 48 ч однократная обработка) не влияла на МТ потенциал в IMR-32 (фигура 4, верхний рисунок). Тем не менее, повторная обработка соединением D (при 15 и 150 ppb) или E (в дозе 150 ppb) значительно повышала потенциал МТ (по сравнению с контролем или серосодержащими аналогами I или J).

Отсутствие токсического действия соединений С, D, E на выживаемость клеток IMR-32

Для того чтобы исследовать, обладают ли соединения селена токсическим действием на выживаемость клеток IMR32 проводили анализы на клеточную выживаемость на клетках после обработки различными соединениями в течение 24, 48 и 72 ч. Как показано на фигуре 5, обработка всеми соединениями в течение испытуемых моментов времени не вызывала значительного снижения жизнеспособности клеток IMR-32. На самом деле, присутствовало небольшое, но значимое увеличение клеточной жизнеспособности в клетках после обработки соединениями селена в течение 48 и 72 ч (фиг. 5, средние и

нижние рисунки). Эти данные свидетельствуют о том, что соединения селена не оказывают токсического действия на выживаемость IMR-32 клеток, но вместо этого присутствовал небольшой, но значимый положительный эффект на выживаемость нейрональных клеток. Следует отметить, однако, что любое отмеченное повышение 5 жизнеспособности клеток в этом эксперименте является слишком небольшим, чтобы объяснить увеличение МТ потенциала, наблюдавшегося в клеточной линии IMR-32 в ответ на определенные соединения селена или их аналоги.

Экспериментальные данные для демонстрации способности выбранных синтетических соединений селена увеличивать или уменьшать активность митохондрий

10 Водорастворимый экстракт получали из селенизированных дрожжей.

Водорастворимый экстракт приводили к 25% от общего содержания селена, присутствующего в препарате. Мы полагали, что эти виды селена первыми 15 высвобождаются/поглощаются из селенизированных дрожжей при прохождении их через кишечный тракт. После идентификации селеносодержащих соединений в экстракте с помощью масс-спектроскопии, мы синтезировали ряд селеносодержащих соединений и пептидов. Соответственно, в этом цикле синтеза и очистки получали ряд из девяти 20 (9) селеносодержащих видов для дальнейшего тестирования. Учитывая небольшие количества материалов, полученных таким образом (небольшие количества в миллиграммах) сочли нецелесообразным проводить исследования по кормлению живых животных. Так как мы были в первую очередь заинтересованы в потенциальном 25 воздействии этих видов селена на митохондриальную биоэнергетику, было решено протестировать эти селеносодержащие молекулы непосредственно с применением митохондрий.

Концентрацию селена, варьируемую как низкая (50 ppb), средняя (500 ppb) и высокая 25 (1 ppm), первоначально испытывали в качестве возможного диапазона для соединений. На основании отсутствия наблюдаемой токсичности для митохондрий в середине диапазона, мы выбрали концентрацию 500 ppb (5 мкМ) для выполнения отбора наших соединений с применением митохондриальной биоэнергетики в качестве основной 30 оценки результата. Митохондрии мозга взрослых крыс, очищенных с помощью фиколла, инкубировали с 9 соединениями в течение 30 мин при температуре 37°C до загрузки в поточный анализатор Seahorse Biosciences в трех экземплярах. Мы измерили параметры 35 OCR (Скорость потребления кислорода) в трех респираторных состояниях, включая синтез АТФ (стадия III), комплекс I-зависимую (NADH зависимый) максимальную дыхательную емкость (стадия V_{FCCP}) и комплекс II-зависимую (FADH зависимый) максимальную дыхательную емкость (стадия V_{succ}).

Результаты показывают, что различные соединения селена, полученные из водного экстракта, обладали разной активностью способности увеличивать митохондриальный потенциал.

40 Соединение 5: Валин-Селенометионин-Аргинин

Соединение 6: Лейцин-Валин-Селенометионин-Аргинин

45 Соединение 7: Лейцин-Треонин-Глицин-Селенометионин-Аланин-Фенилаланин-Аргинин

Соединение 8: димер Селеноглутатиона

Соединение 9: МетилСеленоаденозин

Соединение 10: Глутамилсelenоцистеин

Соединение 25: Общий водный экстракт дрожжей с pH 6,0

Соединение 28: Глутатион окисленный

Соединение 30: Глутамилцистеин

Таблица 1

5 **Влияние соединений селена на митохондриальную биоэнергетику
(очищенные митохондрии головного мозга крыс 5мкг/лунку)**

	Стадия III	% изменения	Стадия V	% изменения	Стадия Vsucc	% изменения
CTRL	432,6		182,1		350,1	
#5	445,9	3,0	187,8	3,2	292,5	-16,4
#6	477,5	10,3	220,6	21,2	376,4	7,6
#7	372,5	-14,0	147,1	-19,2	288,0	-17,7
#8	424,0	-2,1	192,3	5,7	371,0	6,0
#9	507,8	17,3	210,3	15,6	437,1	24,9
#10	352,1	-18,7	112,7	-38,1	254,4	-27,3
#25	419,0	-3,2	136,2	-25,2	309,3	-11,6
#28	451,6	4,3	149,6	-17,8	319,3	-8,8
#30	423,2	-2,3	153,8	-15,5	305,4	-12,7

20 **Положительная
тенденция**

25 **Положительная/
отрицательная
тенденция**

30 **Отрицательная
тенденция**

35 В частности, соединения 6 и 9 увеличивали митохондриальный потенциал, в то время как соединения 7, 10 и 25 ингибирировали митохондриальный потенциал. Эти результаты показывают, что соединения, полученные из водного экстракта селенизированных дрожжей, имеют очень различное воздействие на митохондриальный потенциал, и привели нас к выделению, скринингу и синтезу соединений-кандидатов с целью выбора только тех, которые вызывают положительные ответы на биологические процессы.

40 Экспериментальные данные для демонстрации способности синтетических соединений селена восстанавливать нормальную активность митохондрий, испытывающих стресс в выделенных митохондриях из головного мозга крыс

45 В следующем примере описан эксперимент, выполненный на анализаторе внешнего потока Seahorse; инструмент для измерения скорости дыхания митохондрий выражали в скорости потребления кислорода или OCR. В эксперименте, о котором идет речь, применяли митохондрии из коры головного мозга нормальных крыс, поддерживаемые на обычной лабораторной среде, которая не была обогащена любыми дополнительными источниками селена. На фигуре 6 показана диаграмма дыхания нормальной митохондрий (верхняя линия) с окончательным OCR, составляющим измеренное расстояние между концом линии графика и осью абсцисс.

50 Идентичный образец того же митохондриального препарата обрабатывали таким же образом, как и контрольный образец, за исключением того, что для обеспечения стресса или повреждения митохондрий путем их деполяризации добавляли кальций (конечная концентрация 10 мкМ). Как показано (нижняя линия), OCR снизилось от значения 1677 до 1066 пмоль/мин O_2 .

55 Опять же, идентичные образцы митохондрий коры головного мозга крыс

инкубировали, как описано выше, за исключением того, что они содержали кальций (10 мкМ) и 150 рpm соединений D и E, соответственно. С не тестировали. Очевидно, что OCR обработанной соединением митохондрии, подверженной стрессу посредством кальция, восстановился почти до контрольного уровня, т.е. 1564 пмоль/мин 02 в случае соединения D и 1531 пмоль/мин 02 в случае соединения E.

На основании этого результата и повторных экспериментов с применением митохондрий мозга крыс мы приходим к выводу, что синтетические соединения селена не только обладают способностью повышать митохондриальную активность нормальных митохондрий (см. примеры с применением клеток различных типов, не подверженных стрессу), но также могут восстанавливать дыхательную способность подверженных стрессу или поврежденных митохондрий.

МТ потенциал увеличивается посредством комбинации C, D и E, а не отдельных соединений в клетках печени мышей AML-12

Чтобы исследовать, могут ли соединения селена регулировать функции МТ в клетках печени, клетки мышей AML-12 обрабатывали различными соединениями в течение 6 и 24 ч, и затем подвергали анализу митохондриального потенциала. Как показано на фиг. 7, отдельная обработка соединениями C, D или E при 150 рfb или их соответствующими серосодержащими аналогами в той же концентрации не оказывает существенного влияния на МТ потенциал по сравнению с контрольными нормальными клетками (при обработке носителем водой). Тем не менее, комбинация C, D и E вызывала весьма значительное увеличение МТ потенциала по сравнению с группами, обработанными носителем или НИJ (фигура 7). Таким образом, в клетках печени требуется определенная комбинация соединений C, D и E, чтобы вызвать увеличение МТ потенциала, в то время как отдельные соединения и их серосодержащие аналоги не оказывали никакого эффекта. Этот эффект полностью отличается от того, что наблюдается в нейрональных клетках, и никогда прежде не был описан в литературе.

Снижение экспрессии UCP2 посредством комбинации соединений C, D и E в клетках AML-12

Одними из кандидатов семейства генов, которые обладают способностью увеличивать или уменьшать митохондриальную активность, являются так называемые гены разобщающего белка или UCP. Повышенный МТ потенциал, наблюдаемый в ответ на обработку комбинацией CDE, привел нас к тестированию, существует ли дифференциальное регулирование этих генов в клетках AML-12, обработанных носителем, НИJ и CDE. В нормальных клетках AML-12 уровни экспрессии мРНК Ucp2 в четыреста шестнадцать раз выше, чем Ucp1, в то время как мРНК Ucp3 не детектировали посредством РТ-ПЦР в реальном времени (фиг. 8A, данные Ucp3 не представлены). Обработка клеток AML-12 соединениями CDE не влияла на экспрессию Ucp1 (фиг. 8B). Тем не менее, наблюдалось значительное снижение экспрессии мРНК Ucp2 в клетках AML-12 после обработки CDE, но не НИJ (фиг. 8C). Так как Ucp2 может ингибировать МТ потенциал, снижение экспрессии Ucp2 может быть по меньшей мере частичной причиной повышения МТ потенциала, вызываемого соединениями CDE в клетках AML-12. Так как пациенты с ожирением в целом имеют высокий уровень Ucp2 в печени, снижение экспрессии Ucp2 с помощью CDE указывает на то, что соединения CDE могут быть полезны для лечения ожирения.

Отсутствие токсического действия соединений CDE на выживаемость клеток AML-12

Чтобы проверить, существует ли токсическое действие соединений селена на выживаемость клеток AML-12, проводили анализы на клеточную жизнеспособность

на клетках после обработки различными соединениями в течение 48 ч. Мы обнаружили, что никакая обработка (как отдельными соединениями, так и их комбинациями) не привела к значительному снижению клеточной жизнеспособности AML-12 клеток (фигура 9), что подтверждает, что соединения селена не имеют токсического действия на выживаемость AML-12 клеток.

5 Поникающая регуляция UCP2/3 комбинацией соединений С, D и Е в клетках IMR-32

Как упоминалось ранее, UCP, такие как Ucp1, 2 и 3, являются важнейшими генами для регуляции МТ потенциала. Повышенный МТ потенциал, наблюдаемый в клетках IMR-32 в ответ на CDE (фиг. 3, два верхних рисунка) побудило нас протестировать,

10 существует ли дифференциальная экспрессия этих двух генов в ответ на обработку комбинацией. Было обнаружено, что мРНК Ucp1 не детектировалось в нормальных клетках IMR-32 посредством анализа РТ-ПЦР в реальном времени (данные не представлены). Обработка клеток IMR-32 соединениями CDE, но не НИJ, в течение 6

15 часов вызывала значительное снижение экспрессии и Ucp2, и Ucp1 (фиг. 10A-B). При обработке 24 ч, экспрессия Ucp2 значительно снижалась в обеих группах, обработанных НИJ и CDE (фиг. 10A), в то время как также наблюдалось значительное снижение экспрессии Ucp3 в клетках, обработанных CDE (фиг. 10B). Эти результаты свидетельствуют о том, что поникающая регуляция UCP2/3 может быть по меньшей мере одной из причин повышенного МТ-потенциала, наблюдавшегося в клетках IMR-32

20 в ответ на CDE соединения.

Обсуждение

Таким образом, мы представили доказательства того, что три синтетических селеноорганических соединения обладают способностью либо по отдельности, либо в различных комбинациях, значительно повышать митохондриальную активность в 25 различных типах клеток; а именно, клетках почек, клетках скелетной мускулатуры, нейрональных клетках и клетках печени. Механически, мы отмечаем, что модуляция UCP может быть одним из объяснений для этого роста, и представляем доказательства ниже, что экспрессия других белков, имеющих решающее значение для митохондриальной функции и биогенеза, также может благоприятно влиять на эти 30 соединения. Вне зависимости от механизма действия, однако, тот факт, что эти соединения таким образом могут стимулировать митохондриальную активность в ткани перекрестным образом означает, что они могут быть особенно ценными для улучшения начала и прогрессирования, казалось бы, различных заболеваний; например, болезни Альцгеймера (AD) и диабета 2 типа (T2DM).

35 В случае болезни Альцгеймера, в литературе наблюдается увеличение сторонников, поддерживающих идею, что AD берет свое начало от нарушения импорта глюкозы, дефектного энергетического метаболизма, митохондриальной дисфункции, хронического окислительного стресса и повреждения ДНК в головном мозге (обзор de la Monte and Wands, 2008). Например, многие исследования пришли к выводу, что дефицит инсулина 40 и резистентность к инсулину может опосредованно влиять на многие из эффектов, отмеченных при AD-дегенерации. Кроме того, было обнаружено, что T2DM вызывает резистентность к инсулину в мозге, окислительный стресс и ухудшение познавательной функции. Обширные нарушения инсулина в мозге и сигнальных механизмов инсулиноподобного фактора роста (ИФР) могут объяснить ряд молекулярных, 45 биохимических и гистологических эффектов, наблюдавшихся при AD.

Хорошо известная статистика, опубликованная Ассоциацией по борьбе с болезнью Альцгеймера Америки, утверждает, что около 80% страдающих болезнью Альцгеймера также имеют T2DM. Эти и другие причины привели многих исследователей,

использующих термин "диабет 3 типа", к отражению того факта, что AD представляет собой форму сахарного диабета, который избирательно затрагивает мозг и имеет молекулярные и биохимические особенности, которые пересекаются с сахарным диабетом типа 1 и типа 2.

- 5 Связь между AD и диабетом 2 типа в научной литературе становится очень прочной, но какова связь между этими заболеваниями и митохондриальной дисфункцией? Она заключается в том, что T2DM, который сочетает в себе дефекты в секреции инсулина поджелудочной железой и резистентность к инсулину в периферических тканях, наиболее заметная в печени и скелетных мышцах, вызван незначительной и постепенной потерей
 10 митохондриальной дыхательной функции в течение длительного периода (Lowell and Shulman, 2005). Следовательно, любой агент, который может увеличить митохондриальную функцию в различных тканях, может быть чрезвычайно ценным в качестве вмешательства для состояний, прослеживая их происхождение до снижения митохондриальной функции.

- 15 Результаты и обсуждение патогенеза болезни Альцгеймера

Понижающая регуляция PSEN комбинацией соединений С, D и Е в клетках IMR-32

Клетки IMR-32, как сообщалось, являются подходящей модельной системой *in vitro* для изучения патогенеза болезни Альцгеймера (AD) (Neill et al., J. Neuroscience Res. 1994 39:482). Одними из ключевых патологических признаков AD являются амилоидные

- 20 бляшки, которые возникают между нейронами и которые способствуют атрофии мозга и гибели клеток. Механизмы, участвующие в образовании амилоидных бляшек, являются сложными, но в основном полагаются на действие фермента, называемого бета-секретазой (BACE), который действует совместно с мультиферментным комплексом, называемым гамма-секретазой. Совместно, при AD эти ферменты действуют, чтобы
 25 неверным образом обработать белок мозга под названием белок-предшественник амилоида (APP). Полученный в результате продукт является нарушенным пептидом бета-амилоида, который группируется вместе с образованием бляшек.

Как было указано, фермент гамма-секретаза является фактически мультимерным комплексом, состоящим из четырех известных членов: Пресенилин-1 (PSEN1 или PSEN),

- 30 Никастрин, APH-1 (Anterior Pharynx Defective 1) и PEN2 (Усилитель Пресенилина 2). Другой паралог PSEN представляет собой Пресенилин 2 или PSEN2. В то время как все четыре компонента имеют важное значение для правильного функционирования гамма-секретазы, два компонента в частности стали фокусом для ассортимента разработки терапевтических препаратов. Это Пресенилин 1 и Никастрин. Это происходит потому, что Пресенилин 1 является фактическим катализитическим компонентом гамма-секретазы - компонентом, который физически расщепляет белок-предшественник амилоида. Более того, ген Пресенилина 1 является наиболее часто мутирующим геном при семейной AD. По отношению к PSEN2, PSEN1 является гораздо более распространенным и лучше определен функционально. Никастрин представляет интерес не потому, что он является
 35 каталитическим, но так как он связывается и ориентирует APP таким образом, что Пресенилин может расщеплять его. PSEN 1 и Никастрин, следовательно, представляют собой цели, представляющие наибольший интерес для вмешательств при AD, ориентированных на гамма-секретазу.

Следует также отметить, что AD, как полагают некоторые исследовательские группы,

- 40 возникает от постепенного снижения митохондриальной функции при старении человека. В связи с этим также интересно отметить, что одним из первых измеряемых физиологических изменений в процессе болезни AD является дефектное поглощение и утилизация глюкозы клетками мозга; очевидно, что оба эти явления могут быть связаны

между собой. Соответственно, мы исследовали экспрессию генов, кодирующих PSEN, в клетках IMR32, обработанных комбинацией соединений C, D и E (CDE) наряду с комбинацией их серосодержащих аналогов (HJ).

Мы обнаружили, что экспрессия PSEN почти в восемь раз выше, чем PSEN-2 в 5 нормальных клетках IMR32 (фиг. 10C). Что еще более важно, экспрессия PSEN1 была значительно снижена в CDE-обработанных клетках по сравнению с контрольной или HJ группами (фиг. 10D). В то же время не было никаких очевидных изменений в экспрессии PSEN-2 между контрольной, HJ и CDE группами (фиг. 10E). Эти результаты свидетельствуют о том, что соединения селена могут селективно подавлять экспрессию 10 PSEN, но не PSEN-2 в клетках IMR-32, и может существовать лидирующее вещество среди соединений CDE против формирования амилоидных бляшек.

Соединение C, лидирующее соединение для предотвращения расщепления APP для образования бляшек при AD посредством ориентирования генов PSEN и Никастрина комплекса гамма-секретазы в клетках IMR-32

15 Как показано выше (фигура 10D), смеси соединений CDE ингибиравали экспрессию PSEN, что свидетельствует о том, что существует биологическое лидерство среди этих трех соединений против компонентов гамма-секретазы для образования бета-пептида амилоида. Это исследование было ограничено экспрессией PSEN, но, так как гамма-секретаза является мультиферментным комплексом, другой важный компонент - белок, 20 Никастрин, был включен в данном конкретном примере. Чтобы идентифицировать лидирующее соединение, клетки IMR-32 обрабатывали отдельными соединениями и подвергали анализам вестерн-блоттинга и РТ-ПЦР.

Как показано на рисунке 11A, PSEN и Никастрин, но не PSEN-2 и белки бета-секретазы BACE, ингибиравали в клетках IMR-32 после 24 ч обработки соединением 25 C. Количественные анализы показали, что наблюдалось значительное снижение уровней белков PSEN и Никастрина только посредством C, в то время как соединения D и E также вызвали тенденцию к снижению экспрессии белка Никастрина (фиг. 11B-C). В соответствии со сниженной экспрессией PSEN, экспрессия мРНК PSEN значительно снижалась соединением C не только через 6 ч, но также через 24 часа обработки (фиг. 30 11D-E). Аналогичным образом, обработка соединением C также вызывала тенденцию к снижению экспрессии мРНК Никастрина в клетках IMR-32 после 6 ч обработки (фиг. 11F), и, что более важно, значительное снижение экспрессии мРНК Никастрина в клетках IMR-32 после 24 ч обработки (фиг. 11G). В то же время, обработка соединениями D и E не ингибиравала, но вместо того стимулировала экспрессию мРНК PSEN и Никастрина 35 в клетках IMR-32 (фиг. 11E и 11G).

Совместно наши данные свидетельствуют о том, что соединение C может ингибиравать экспрессию и PSEN и Никастрина на уровнях белка и мРНК. Эти результаты свидетельствуют о том, что соединение C представляет собой анти-AD соединение из трех кандидатов, и достигает этого путем ориентирования на компоненты 40 комплекса гамма-секретазы, более конкретно на PSEN и Никастрин, которые, как известно, отвечают за образование бляшек при AD.

Соединение C, специфичный к клеткам GSK3b понижающий регулятор против гиперфосфорилирования тау-белка в клетках IMR-32

Вторую основную патологию помимо амилоидных бляшек при AD называют 45 нейрофибрillaryным узлом, NFT или кратно - узлом. Его характеризовали тем, что образование узла при AD вызвано гиперфосфорилированием белка, называемого тау, и что это фосфорилирование вызвано ферментами киназами, такими как DYRK1A (киназа двойной специфичности, регулируемая фосфорилированием тирозина 1A) и,

главным образом, Gsk3b (киназа-3-бета-гликогенсинтазы). Для того, чтобы выяснить, могут ли соединения селена C, D или E потенциально способствовать уменьшению образования узлов при AD, мы сначала исследовали статус фосфорилирования двух биомаркеров при AD, pTau S396 и pTauS400/T403/S404, а также общую концентрацию

5 тау-белка в IMR32 клетках. Фосфорилирование тау-белка на указанных участках связано с дестабилизацией тау-белка и возможным формированием узлов. Для этой цели клетки обрабатывали соединением C, D и E в течение 6 и 24 ч, и затем подвергали анализу вестерн-блоттинга.

Как показано на фигуре 12A, уровни белка всех исследованных видов тау-белка не 10 были затронуты при 6 ч обработке. Однако после 24 ч обработки уровни белка pTauS396, pTauS400/T403/S404 и/или общего тау-белка в клетках IMR-32 были значительно снижены с помощью соединения C и/или E. Количественный анализ показал, что соединение C не влияет на общий уровень тау-белка, но значительно ингибирует фосфорилирование тау-белка на S400/T403/S404, но не на S396 (фиг. 12B-C). Соединение D не оказывает 15 влияния на фосфорилирование тау-белка на всех тестируемых остатках серин/треонин или на уровень общего тау-белка, в то время как фосфорилирование тау-белка на S396 и S400/T403/S404 и общего тау-белка было значительно снижено соединением E (фиг. 12 B-C).

Анализ соотношения общего pTauS396 и pTauS400/T403/S404 к общему тау-белку 20 показал, что только соединение C, но не D или E, значительно нарушило полное фосфорилирование тау-белка в IMR-32, несмотря на то, существует тенденция к снижению фосфорилирования тау-белка по всем тестируемым остаткам серин/треонин посредством соединения E (фиг. 12E).

Совместно наши данные показали, что соединение C может заметно ингибировать 25 фосфорилирование тау-белка, но не влияет на общий тау-белок в клетках IMR32, в то время как соединение D не оказывает никакого влияния на процесс. Соединение E также может играть роль в регуляции фосфорилирования тау-белка, но действие этого соединения вероятно является понижающей регуляцией общего тау-белка в клетках IMR-32. Учитывая, что гиперфосфорилирование тау-белка является причиной 30 образования узлов при AD, наши данные свидетельствуют о том, что C ингибирует гиперфосфорилирование тау-белка, что способствует образованию узлов при AD.

Чтобы исследовать, вызвана ли понижающая регуляция фосфорилирования тау-белка посредством соединения C Gsk3 и DYRK1A (двумя ключевыми киназами для фосфорилирования тау-белка при AD), проводили анализ вестерн-блоттинга для 35 изучения уровней этих белков. Как показано на фиг. 12A, на фосфорилирование белков Gsk3b, общего Gsk3a и DYRK1A не оказалось влияние любое из трех соединений в клетках IMR-32. Тем не менее, уровни белка Gsk3b в клетках IMR-32 заметно уменьшились после обработки соединением C, но не D или E, в течение 24 ч, но не 6 ч (фиг. 12A).

Количественный анализ показал, что существует статистически значимое снижение 40 уровня белка Gsk3b посредством соединения C, но не D или E, в обработанных IMR-32 клетках (по сравнению с контрольными клетками) (фиг. 12F).

Для дальнейшего подтверждения, что экспрессия Gsk3b ингибируется соединением C, количественную РТ-ПЦР проводили с целью изучения уровня его мРНК. Как показано на фиг. 12G, уровни мРНК Gsk3b значительно уменьшились в клетках IMR32 45 после обработки соединением C в течение 6 часов. Тенденция снижения экспрессии мРНК Gsk3b также наблюдалась в клетках IMR-32, после обработки соединением C в течение 24 ч (фиг. 12H). В то же время, обработка соединением D и E в течение 6 часов существенно не ингибировала экспрессию мРНК Gsk3b в клетках IMR-32 (фиг. 12G).

Вместо этого, наблюдалось значительное увеличение экспрессии мРНК Gsk3b в клетках IMR-32 после обработки соединениями D или E в течение 24 часов (фиг. 12Н). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что соединение С может ингибировать экспрессию Gsk3b на уровнях мРНК и белка, и что понижающая регуляция GSK3b 5 посредством соединения С, вероятно, является причиной снижения фосфорилирования тау-белка, указанного выше.

Чтобы исследовать, является ли ингибирующее действие соединения С на экспрессию Gsk3b специфичным по отношению к нейронам, мы исследовали уровни его белка в клетках печени мыши. Белковые экстракты получали из клеток печени в то же время 10 и в тех же экспериментальных условиях, что и клетки IMR-32 выше. Было установлено, что уровни белка Gsk3b не были затронуты соединением С в клетках печени (фиг. 16). Таким образом, понижающая регуляция экспрессии Gsk3b является специфичной по отношению к нейронам. Отсутствие ответа GSK3b на соединение С в клетках печени может иметь существенное значение с терапевтической точки зрения. Это означает, 15 что соединение С можно применять в качестве терапевтического средства в нервной ткани без риска причинения серьезных нарушений в углеводном метаболизме печени.

Совместно наши результаты свидетельствуют о том, что соединение С является специфичным по отношению к нейронам понижающим регулятором Gsk3b, и может ингибировать фосфорилирование тау-белка в нейрональных клетках, которое будет 20 благоприятным против образования узлов при AD. Эти данные обеспечивают дополнительное доказательство *in vitro*, что соединение С может быть ценным терапевтическим агентом в области AD.

Понижающая регуляция FOXO фосфорилирования, специфичная по отношению к нейронам, и повышающая регуляция белка PGC1a посредством CDE в клетках IMR32 25

Учитывая наблюдаемое действие соединений CDE на митохондриальную активность в клетках IMR-32, мы хотели бы рассмотреть, могут ли эти соединения регулировать ключевые факторы, ответственные за клеточный рост и обмен веществ, функции митохондрий и энергетику. FOXO (Forkhead box) белки представляют собой семейство 30 ключевых нуклеарных факторов транскрипции, играющих различные роли в клеточной пролиферации, дифференцировке и продолжительности жизни. Они частично контролируют ключевые функции в клетке, такие как глюконеогенез (получение глюкозы из неуглеводных субстратов). Проникновение их в ядро клетки контролируется посредством фосфорилирования; фосфорилированный FOXO выводится из ядра, в то время как дефосфорилированный FOXO может проникать.

PGC1a (коактиватор 1 альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксидом гамма) является мощным активатором транскрипции, который регулирует гены, 35 участвующие в метаболизме энергии, а также является главным регулятором митохондриального биогенеза и роста. Он обеспечивает прямую связь между внешними раздражителями (например, физические упражнения) и регуляцией митохондриального биогенеза. Он выполняет свои разнообразные функции, объединяясь с различными 40 факторами транскрипции для коактивации генов. В контексте митохондриальной активности, специфичной по отношению к нейронам, и прогрессирования AD интересно отметить, что экспрессия PGC1a снижается в мозге при болезни Альцгеймера, как функция деменции (Qin et al., 2009 Arch Neurol; 66:352-361).

Соответственно, мы были заинтересованы изучить, может ли какое-либо из соединений CDE влиять на экспрессию этих мощных сигнальных факторов. Как показано на фигуре 13, фосфорилирование Foxo4 и Foxo3 подавлялось в клетках IMR-32 после обработки CDE для 6 и 24 ч, в то время как белок PGC1a возрастал в клетках IMR-32 45

после 24 ч обработки. Наблюдалось незначительное влияние или отсутствие влияния на экспрессию белка других тестируемых сигнальных молекул. Увеличенный PGC1a белок может способствовать МТ биогенезу, что иным образом объясняет, почему МТ потенциал был усилен комбинацией CDE в клетках IMR-32 (фиг. 3, верхний и средний 5 рисунки). Хорошо охарактеризовано, что дефосфорилирование FOXO, например, Foxo4 по T28 и S193, приводит к нуклеарной локализации FOXO белков. Этот результат наводит на мысль о том, что комбинация соединений CDE, скорее всего, усиливает действие нуклеарного FOXO. Совместно наши данные свидетельствуют о том, что CDE 10 содержит один или несколько FOXO-активатор(ов) и повышающий(х) POC1a-регулятор (ов) в нейрональных клетках.

Этот результат может быть весьма значительным с терапевтической точки зрения в нейрональных клетках, таких как клетки мозга. Хорошо установлено, что совместная локализация некоторых FOXO белков и PGC1a в ядре может привести к мощной 15 активации глюконеогенеза (образование глюкозы). Хотя такая ситуация была бы нежелательной, скажем, для печени субъекта с диабетом, ее можно рассматривать как чрезвычайно благоприятную в ситуации субъекта на ранней стадии AD, когда нарушается импорт глюкозы в нейроне и, следовательно, клетка мозга лишается своего основного источника топлива. Увеличенная способность вырабатывать глюкозу из 20 углеродных скелетов других молекул была бы очень полезной при таких обстоятельствах.

Чтобы проверить, является ли наблюдаемая активация FOXO и PGC1a (выше) специфичной по отношению к нейрональным клеткам, мы также изучили их уровни белка в клетках печени мышей AML-12. Белковые экстракты получали из клеток печени в то же время и в тех же экспериментальных условиях, что и клетки IMR-32. Однако 25 отмеченное действие в клетках печени (фиг. 15), описанное в следующем разделе, было совершенно противоположным полученному для клеток IMR-32, и безусловно позволяет предположить, что дефосфорилирование FOXO и повышающая регуляция PGC1a посредством CDE не является явлением в масштабах ткани и может быть ограничено нейрональными клетками.

30 Соединение С, активатор FOXO, специфичный по отношению к нейронам, и повышающий регулятор PGC1a

Как описано выше, соединения CDE совместно приводили к дефосфорилированию FOXO и стимулированию экспрессии белка PGC1a (фиг. 13). Чтобы определить, какое соединение в смеси CDE оказывает это действие, мы исследовали экспрессию 35 вышеупомянутых белков в С-, D- и E-обработанных клетках IMR32. Как показано на фиг. 14A, уровни pFOXO4 в клетках IMR32 резко снизились после 6 ч обработки всеми тремя соединениями. После 24 ч обработки снижение уровня pFOXO4 T28 также наблюдалось для IMR-32 клеток, обработанных посредством С- и E-, но не D.

Количественный анализ показал, что снижение уровней pFoxo4 в клетках IMR-32 40 посредством С, D и E при 6 ч обработке и посредством С и E при 24 ч обработке было статистически значимым (фиг. 14B-C).

Важно отметить, что ни комбинация CDE, ни обработка отдельными С, D или E не привели к каких-либо изменениям общих уровней FOXO (фиг. 13 и 14), а скорее просто изменили контроль действия FOXO посредством его дефосфорилирования. Снижение 45 FOXO фосфорилирования маловероятно происходило вследствие понижающей регуляции фосфорилирования AKT, так как уровни белка PAKT заметно не снизились в клетках, обработанных посредством С-, D- или E- (фиг. 14A). Кроме того, С, D или E также не оказали влияния на уровень белка pElf2beS539, указывая, что эти соединения, вероятно,

не влияют на трансляцию белка в нейрональных клетках (фиг. 14А). В то же время, уровни белка PGC1a заметно увеличились после 24 ч обработки всеми тремя соединениями (фиг. 14А, 14D), что может объяснить, почему МТ потенциал в IMR-32 клетках активировался этими соединениями (фиг. 3, верхний и средний рисунок).

5 Совместно наши данные свидетельствуют о том, что соединение С и Е являются FOXO активаторами и повышающими регуляторами PGC1a, в то время как соединение D является повышающим регулятором PGC1a и оказывает смешанное влияние на регуляцию FOXO фосфорилирования.

Обсуждение

10 При рассмотрении в их совокупности, наши результаты в нейрональных клетках определили соединение С в качестве предпочтительного агента, вызывающего положительный эффект в этих клетках. Хотя результаты, описанные непосредственно выше, показывают, что все три соединения способны вызывать дефосфорилирование FOXO и повышающую регуляцию PGC1a - крайне желательное действие с энергетической 15 точки зрения в нейрональных клетках, следует напомнить о том, что соединение С является единственным кандидатом, который вызывает это FOXO/PGC1 действие, и, в то же время, значительно снижает уровни PSEN и Никастрина (фиг. 11). Кроме того, оно является соединением, которое продемонстрировало благоприятный ответ с точки зрения снижения уровней фосфорилирования тау-белка и GSK3b в клетках IMR-32 (фиг. 20 12).

Таким образом, соединение С, по-видимому, оказалось выбранным соединением, вызывающим ряд полезных эффектов в нейрональных клетках, следующим образом; 1) благоприятное воздействие на митохондриальную активность и функции, стимулируя общий митохондриальный потенциал, повышение уровня PGC1 и снижение FOXO 25 фосфорилирования - таким образом обеспечивая ему доступ в ядро, 2) предполагаемое действие по снижению накопления амилоида за счет уменьшения экспрессии PSEN1 и Никастрина, и 3) предполагаемое действие по снижению образования узлов тау-белка за счет снижения уровней фосфорилированного тау-белка и фермента (GSK3b), который считают ответственным за фосфорилирование тау-белка.

30 Снова, чтобы протестировать клеточную специфичность этого действия, белковые экстракты клеток печени AML-12, обработанных комбинацией СДЕ, зондировали теми же антителами для определения различий в FOXO фосфорилировании и уровнях PGC1a. Как показано на фигурах 15 и 16 и более подробно описано в следующем разделе, указанное действие, наблюдаемое для трех соответствующих соединений, подтвердило, 35 что действие для клеток IMR-32, без сомнения в печени не наблюдается. На самом деле, можно сказать, что были отмечены прямо противоположные эффекты; а именно, увеличение FOXO фосфорилирования (исключения из ядра), отсутствие изменений в уровнях PGC1a и отсутствие изменений в уровнях GSK3b. Как станет ясно, однако, это тип действия можно было бы желать наблюдать в печени, особенно в случае субъекта 40 с диабетом, которому необходимо контролировать высвобождение глюкозы в печени. Наиболее важно, было установлено, что, в полном отличии от нервных клеток, клетки печени AML-12 не реагировали на обработку отдельными соединениями и, вместо этого, отвечали только на смесь С, D, E. Опять же, это указывает на очень определенную 45 клеточную специфичность и непредусмотренный клеточный ответ в отношении способа действия этих соединений.

Результаты и обсуждение: Клетки печени

Специфичная по отношению к клеткам печени и PDK1/AKT-независимая повышающая регуляция FOXO фосфорилирования Соединением СДЕ в комбинации, но не посредством

отдельных соединений или их серосодержащих аналогов

Как и в случае с нейрональными клетками IMR-32, наблюдения, что соединения селена (комбинация CDE, в данном случае) усиливают МТ активность и модулируют экспрессию ключевого гена, контролируемого в клеточной энергетике (UCP2), побудило нас искать действия, которые эта комбинация соединений селена может оказывать на других важные гены, участвующие в энергетическом обмене в печени, передаче сигналов инсулина и клеточной пролиферации. Соответственно, анализ вестерн-блоттинга проводили на CDE-обработанных клетках AML-12.

Как было описано ранее, FOXO являются основными сигнальными молекулами

сигнализации глюконеогенеза и чувствительности к инсулину в печени. Следует напомнить, что функциональность FOXO белков определяется их состоянием фосфорилирования. Фосфорилирование FOXO исключает их из ядра, тем самым по существу инактивируя их. Дефосфорилирование позволяет вводить FOXO белки в ядро, где они могут участвовать в регуляции транскрипции нескольких ключевых генов, связанных с энергетическим метаболизмом. Как показано на фиг. 15A, фосфорилированные формы FOXO3 и 4 (уровни белка pFOXO3 и pFOXO4) были обнаружены значительно повышенными в клетках AML-12 после обработки CDE, но не НИJ, в течение 6 часов. Количественный анализ показал, что имело место приблизительно 2,5-кратное увеличение pFoxo3 и примерно 3,2-кратное увеличение pFoxo4 в CDE-обработанных клетках AML-12 (фиг. 15B-C). Поскольку фосфорилирование FOXO вызывает исключение из ядра для инактивации FOXO в ядре, наши результаты свидетельствуют о том, что CDE будут функционировать как инактиваторы FOXO в клетках печени. Так как в CDE обработанных IMR-32 нейрональных клетках не наблюдалось увеличенного FOXO фосфорилирования по результатам анализов, которые проводили в то же время и при тех же экспериментальных условиях (см. фигуру 13 выше), можно сделать вывод о том, что инактивация FOXO посредством CDE является специфичной по отношению к клеткам печени.

Совместно наши результаты свидетельствуют о том, что комбинация CDE будет

функционировать в качестве новых специфичных к клеткам печени инактиваторов FOXO. В самом деле, в нейрональных клетках IMR-32 заметная и весьма значительная активация (дефосфорилирование) FOXO белков происходила в ответ на единичное соединение или комбинацию соединений селена C, D и E. Таким образом, в случае этих определенных соединений мы имеем способность избирательно активировать FOXO белки в нейрональных клетках и инактивировать их в клетках печени. Общая значимость и новизна этого факта становится очевидной, если учесть его в контексте обрата глюкозы при диабете 2-го типа и болезни Альцгеймера.

В качестве краткого описания, в активированном или нефосфорилированном состоянии FOXO находится в ядре, где связывается с областью промотора для глюкозо-6-фосфатазы и, наряду с другими факторами, такими как PGC-1a, повышает транскрипцию глюкозо-6-фосфатазы, тем самым увеличивая скорость продукции глюкозы. Глюкозо-6-фосфатаза катализирует последнюю стадию глюконеогенеза и гликогенолиза, вызывая высвобождение глюкозы из печени. Поэтому она крайне важна контроля гомеостаза глюкозы, особенно у субъектов с диабетом. Как правило, процесс фосфорилирования FOXO контролируется непосредственно другим ферментом-киназой под названием АКТ (протеинкиназа В). АКТ фосфорилирует FOXO и перемещает его из ядра, тем самым уменьшая продукцию глюкозы через уменьшение скорости транскрипции глюкозо-6-фосфатазы. АКТ сама по себе находится под контролем

посредством мини-молекулярной каскадной реакции против направления каскада, которая начинается связыванием инсулина с его рецептором на поверхности клетки. Это инициирует ряд событий с участием двух других ферментов-киназ, фосфатидилинозитол-3-киназы (РБК) и фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы 1 (PDK1). Общий путь известен как путь инсулин/PBK/PDK1/Akt, и работает как контролирующий гомеостаз глюкозы посредством инсулиновой сигнализации. В контексте контроля FOXO, PDK1 фосфорилирует и активирует Akt, который, в свою очередь, фосфорилирует и инактивирует FOXO.

Так как PI3K/PDK1/Akt является основным сигнальным путем FOXO по направлению

- 10 каскада для инсулин-опосредованного контроля продукции глюкозы в печени, мы задались вопросом, обусловлено ли повышенное фосфорилирование FOXO посредством CDE активацией PI3K/PDK/Akt сигнального пути в клетках печени. Чтобы протестировать это, мы исследовали уровни протеина pPDK1, PAKT T308 и S473 и общей AKT в CDE-обработанных клетках печени. Неожиданно, CDE не влияло на
- 15 фосфорилирование PDK1, AKT или общие уровни AKT (фиг. 15A). Мы также исследовали уровни двух других нижестоящих сигнальных молекул pGSK3a и pGSK3b, которые непосредственно контролируются AKT, и не наблюдали каких-либо изменений в их уровнях белка (фиг. 15A), что согласуется с отсутствием изменения pAKT в CDE-обработанных клетках. Уровни p4Ebp (нижестоящая по направлению каскада
- 20 молекулярная мишень AKT/mTor сигнализации) и pElf2be S539 (нижестоящая по направлению каскада молекулярная мишень Gsk3), которые являются ключевыми для инсулин-управляемого синтеза белка или трансляции, также не были затронуты (фиг. 15A). Это обеспечивает дополнительное непосредственное молекулярное доказательство того, что CDE не оказывает токсического действия при воздействии на пролиферацию/
- 25 жизнеспособность клеток печени, как описано ранее.

Как описано в контексте нейрональных клеток IMR-32, PGC1a является решающим геном для биогенеза МТ и углеводного обмена. В клетках печени он также действует совместно с FOXO, чтобы управлять транскрипцией генов, участвующих в

- 30 глюконеогенезе, но не в состоянии это осуществить при отсутствии FOXO в ядре. Мы исследовали экспрессию белка PGC1a и не наблюдали значительного изменения уровня белка PGC в клетках печени после лечения комбинацией CDE путем количественного анализа (фиг. 15A и D). Тем не менее, из-за стойкого эффекта, отмеченного при фосфорилировании FOXO в ответ на CDE, почти достоверно, что он будет исключен из ядра и, следовательно, уровень PGC1a станет мало значимым, так как FOXO требуется
- 35 для инициирования процесса глюконеогенеза. Совместно эти результаты свидетельствуют о том, что комбинация CDE не влияет на сигнализацию PI3k/PDK1/ AKT и некоторые другие прямые или косвенные сигнальные молекулы по направлению сигнального каскада AKT, за исключением описанных выше, но важнейших FOXO.

Другими словами, комбинация CDE может избирательно инактивировать FOXO, и это действие, по-видимому, не зависит от сигнализации PI3K/PDK1/AKT в клетках печени.

- 40 По сути, таким образом, механизм действия CDE в клетках печени может быть полностью независимым от инсулин-управляемого PI3K/PDK1/Akt сигнального пути, т.е. он может быть инсулиннезависимым. Важность этого сразу становится очевидной любому специалисту в области метаболических сигнальных путей, так как он уменьшает
- 45 физиологические последствия клетки печени, становясь резистентным к инсулину, в контексте контроля выброса глюкозы печенью. Игнорирование сигналов инсулина при способности контролировать гомеостаз глюкозы путем регулирования FOXO открывает множество терапевтических возможностей для лечения сахарного диабета

в целом; что делает его менее зависимым от введения экзогенного инсулина.

Кроме того, важность поиска потенциального АКТ-независимого ингибитора FOXO в печени не следует недооценивать с более широкой точки зрения здоровья. Хорошо установлено, что путь PI3k/PDK1/AKT является прототипичным путем, который

5 способствует росту клеток и является конститутивно активным при многих видах рака. АКТ, когда активируется, выполняет важнейшую роль в различных клеточных процессах - не только гомеостаза глюкозы через инактивацию FOXO. Главным среди этих других путей является прогрессирование рака. В связи с этим интересно отметить, что АКТ был первоначально идентифицирован как онкоген в трансформирующем ретровирусе
10 АКТ8. Таким образом, любое соединение, которое может выполнять ключевую роль АКТ, но осуществлять это АКТ-независимым способом, является одновременно очень новым и ценным.

Снова, чтобы завершить наши исследования по специфичности соединений, мы хотели определить, обладают ли отдельные соединения в CDE способностью

15 инактивировать FOXO в клетках печени, AML-12 клетки обрабатывали отдельными соединениями в тех же экспериментальных условиях. Анализ вестерн-блоттинга показал, что инактивация FOXO (на что указывало повышение pFOXOs) не наблюдалась в клетках печени, обработанных отдельным соединением, после 6 или 24 ч обработки (фиг. 16). Мы также изучили ряд других сигнальных молекул, и повышенного
20 фосфорилирования АКТ, Gsk3a/b и Elf2be в клетках печени после обработки C, D или E в течение 6 или 24 ч не наблюдалось (фиг. 16). Единственное отмеченное действие было связано с соединением E, что представляло собой незначительно уменьшенные уровни pAKT и pElf2be S539 в клетках AML-12 после 6 ч обработки (фиг. 16). Действие на АКТ соединения E, однако, должно быть минимальным, поскольку это не отразилось
25 на снижении фосфорилирования FOXO, опосредованном соединением E (непосредственная нижестоящая мишень АКТ). Таким образом, это не указывает на значительные изменения в глюкогенетическом потенциале в клетках, обработанных посредством E. Дефосфорилирование EIF2be может означать повышенный уровень трансляции мРНК/белка, но это не было тщательно изучено. Тем не менее, очевидно,
30 что экспрессия белка видов, протестированных в этих анализах вестерн-блоттинга, не была изменена посредством любого из этих трех соединений селена (фиг. 16). Несмотря на это, наши результаты свидетельствуют о том, что отдельные соединения селена C, D или E в одиночку не увеличивали FOXO фосфорилирования в клетках печени. Таким образом, существует синергетический эффект между соединениями C, D и E для
35 инактивации FOXO в клетках печени.

Совместно наши результаты свидетельствуют о том, что CDE, но не отдельные соединения, будут функционировать как специфичные к клеткам печени и PI3K/PDK/AKT-независимые FOXO инактиваторы.

Понижающая регуляция экспрессии G6pc, нижележащая по направлению каскада
40 FOXO мишень для продукции глюкозы, в клетках AML-12 после обработки соединениями селена CDE

Как упоминалось выше, каталитическая субъединица глюкозо-6-фосфатазы (G6PC) является непосредственной нижестоящей мишенью FOXO, которая усиливает выработку глюкозы, особенно в печени. Повышенные уровни pFOXO (неактивный) в CDE-
45 обработанных клетках печени позволяют предполагать, что CDE может играть определенную роль в контроле продукции глюкозы и в повышении чувствительности к инсулину в клетках печени. Реальным доказательством того, что комбинация соединений селена, CDE, может модулировать глюконеогенез или гликогенолиз через

фосфорилирование FOXO, было бы увидеть уменьшенную экспрессию G6PC в среде печени. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали экспрессию G6pc в клетках печени путем количественного анализа РТ-ПЦР.

Как показано на фигуре 17, обработка клеток печени человека AML-12 комбинацией

- 5 CDE, но не комбинацией серосодержащих аналогов НП, вызвала значительное 45% снижение экспрессии G6pc в клетках печени. Кроме того, мы также исследовали экспрессию G6pc в клетках AML-12 после обработки всеми отдельными соединениями, и не наблюдали каких-либо значительных изменений (увеличения или уменьшения) в экспрессии G6pc (фиг. 17); эти данные совпадают с неизменными уровнями
- 10 фосфорилирования FOXO, отмеченными для клеток печени, обработанных соединением D или E, как это определено с помощью анализа вестерн-блоттинга (фиг. 16). Эффект снижения экспрессии G6pc в ответ на комбинацию CDE наблюдали в трех повторных экспериментах с применением разных партий клеток (данные не представлены).

Совместно наши результаты показывают, что CDE, но не отдельные соединения,

- 15 может значительно снизить экспрессию G6pc, таким образом представляя новый способ уменьшения выработки глюкозы в печени. Наши суммарные результаты далее указывают на способ действия этих соединений, опосредованный АКТ-независимым увеличением FOXO фосфорилирования. Эти данные обеспечивают сильное доказательство *in vitro*, что CDE обладает значительным потенциалом в качестве
- 20 терапевтической возможности для контроля выработки глюкозы в печени у субъектов с ожирением и диабетом 2 типа.

Общее резюме и обсуждение

- Мы определили, что соединение C, но не D, усиливало МТ потенциал в клетках почек, и что оба соединения C и D усиливали МТ потенциал в клетках скелетных
- 25 мышечных миобластов мыши C2C12. Эти результаты свидетельствуют о том, что соединение C может быть полезно против прогрессирующей почечной недостаточности, и C и D - против саркопении, вызванной прогрессирующей утратой МТ функции в почках или скелетной мускулатуре. В случае скелетной мускулатуры мы также ожидаем, что C и D являются потенциально полезными в области исследования и контроля T2DM,
- 30 учитывая, что скелетная мускулатура перерабатывает 75-80% суточной употребленной глюкозы, и что митохондриальная дисфункция в скелетной мускулатуре, как полагают, является ключевым инициатором T2DM.

- Кроме того, наши эксперименты с применением нейрональных IMR-32 клеток человека показывают, что одно из этих соединений в частности (соединение C) может быть однозначно против AD патогенеза. Этот вывод основан на следующих ключевых выводах:

- (1) МТ потенциал временно усиливается посредством C (фиг. 3)
- (2) Улучшенная выживаемость нейрональных клеток посредством соединения C (фиг. 5)
- 40 (3) Понижающая регуляция FOXO фосфорилирования, специфичная по отношению к нейрональным клеткам (ключевого для клеточного метаболизма) и повышающая регуляция PGC1a (ключевого для МТ биогенеза) (фиг. 14 против данных клеток печени на фиг. 15);
- (4) Селективное ориентирование генов комплекса гамма-секретазы PSEN и
- 45 Никастрина для ингибирования их экспрессии для расщепления APP (фиг. 11);
- (5) Ингибирование фосфорилирования тау-белка вероятно действует против образования узлов при AD (фиг. 12); и
- (6) Понижающая регуляция GSK3b, специфичная по отношению к нейрональным

клеткам, которая также показывает снижение потенциала фосфорилирования тау-белка и снижение образования узлов в случаях AD (фиг. 12 против данных клеток печени на фиг. 15).

Мы идентифицировали новую комбинацию соединений (CDE), специфичную по

5 отношению к клеткам печени и PI3K/PDK1/AKT-независимым образом инактивирующую FOXO (т.е. комбинацию CDE, но не отдельные соединения). Такая комбинация соединений резко подавляет экспрессию G6rc в клетках печени посредством исключения FOXO белков из ядра. Мы предполагаем, что эта комбинация может быть особенно полезной в исследованиях и ослаблении симптомов и патологий, связанных с 10 метаболическим синдромом, ожирением и T2DM. Наше мнение основано на следующих выводах:

(1) МТ потенциал значительно увеличился в клетках печени только посредством комбинации CDE; не посредством любых других соединений или их комбинаций (фиг. 7);

15 (2) Отсутствие токсического эффекта на выживаемость клеток печени или нейрональных клеток (фиг. 5, фиг. 9)

(3) Гены разобщающего белка 2 (Ucp2) специфически и значительно подавляются только посредством CDE (фиг. 8); Особо следует отметить в этом отношении результаты последних исследований, что ингибирование экспрессии UCP2 способствует устранению 20 диабета, индуцированного питанием, воздействуя на секрецию и действие инсулина.

(4) FOXO, специфичный по отношению к клеткам печени, был инактивирован (fosфорилирован) посредством CDE (фиг. 15 против данных нейрональных клеток на фиг. 13);

(5) Было отмечено отсутствие эффекта на инактивирование FOXO индивидуальными 25 соединениями (фиг. 16)

(6) Отмечено отсутствие эффекта на фосфорилирование PI3K/PDK/Akt сигналы посредством CDE (фиг. 15). Это указывает, что CDE представляет собой новый АКТ-независимый инактиватор FOXO.

(7) Значительная понижающая регуляция важнейшего FOXO целевого гена G6rc 30 посредством CDE (фиг. 17), но не любыми отдельными соединениями (фигура 16). Следует напомнить, что высвобождение глюкозы в печени регулируется FOXO-опосредованной активацией транскрипции G6rc.

На основании приведенных выше экспериментальных данных, мы полагаем, что комбинация CDE может специфически действовать как мощный FOXO инактиватор в 35 клетках печени для уменьшения экспрессии G6rc и более низкого высвобождения глюкозы в печени. Кроме того, мы показали, что это действие не зависит от PI3K/PDK/Akt сигнализации. Иллюстрация того, как этот процесс может работать, показано на фигуре 18. Принимая во внимание, как правило, что FOXO фосфорилирование и его последующее проникновение или исключение из ядра регулируется путем инсулина/ 40 PDK/PDK1/AKT, мы показываем, что определенная комбинация соединений C, D и E приводит к фосфорилированию FOXO посредством фермента еще неидентифицированной киназы. Фосфорилированные FOXO, исключенные из ядра, не могут транскрипционно активировать G6PC, что приводит, в свою очередь, к уменьшению высвобождения глюкозы из печени. Снижение высвобождения глюкозы 45 в печени и связанное с ним снижение концентрации глюкозы в крови приведет к инсулин-конкурирующему эффекту, т.е. снижению сигнала поджелудочную железу вырабатывать инсулин в ответ на высокий уровень глюкозы в крови.

Кроме того, вполне разумно ожидать, что более низкий уровень глюкозы в крови

может привести к повышенной чувствительности к инсулину в периферических тканях и более контролируемому высвобождению инсулина бета-клетками поджелудочной железы. То есть, высвобождение инсулина в поджелудочной железе, менее вероятно, будет избыточным из-за снижения уровня циркулирующей глюкозы в целом. Из

5 экспериментов, проведенных и представленных в данной заявке, мы не смогли выявить каких-либо отрицательных эффектов на любой рост всех типов тестируемых клеток или активацию путей, которые могут сигнализировать начало бесконтрольной пролиферации и роста, т.е. вызывающих рак. В самом деле, способность этих соединений игнорировать АКТ-сигнальный путь (по меньшей мере в печени) делает их особенно 10 интересными с точки зрения пониженной токсичности.

На основании результатов, представленных выше, мы также считаем, что мы можем выдвинуть гипотезу вероятной модели действия соединения С, в частности, на смягчении последствий патологии AD (амилоидные бляшки и узлы тау-белка). Как показано на 15 фигуре 19А-С, ключевые AD-связанные гены, экспрессия которых снижена или изменена в клетках IMR-32, содержат связывающие участки (сайты) для FOXO 1, 3 или 4 в их генных промоторных участках. Это верно для Gsk3b (фиг. 19А), Psen1 (фиг. 19В) и Никастрина (фиг. 19С). Это означает, что FOXO белки, локализованные в ядре, могут связываться и отрицательно регулировать транскрипцию от этих промоторов генов. Зная это, довольно легко таким образом визуализировать ситуацию (фиг. 19Д), где 20 соединение С дефосфорилирует FOXO белки и позволяет им проникать в ядро. Здесь активные белки FOXO связываются и ингибируют транскрипцию из промоторных участков генов, упомянутых выше. Более низкие уровни GSK3b в клетках IMR (фиг. 12) приведут к снижению фосфорилирования тау-белка с последующим снижением 25 стабилизации микротрубочек и снижением образования узлов в качестве непосредственного результата.

Кроме того, связывание FOXO белков с промоторными регионами PSEN и Никастрина ингибирует транскрипцию из этих генов, что приводит к снижению количества этих важнейших компонентов гамма-секретазы, вырабатываемых в 30 нейрональных клетках. Естественным следствием этого были бы более низкие уровни аномального процессинга APP, более низкая концентрация пептида бета-амилоида и снижение амилоидных бляшек в результате.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящий 35 документ посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и композиций согласно настоящей заявке будут очевидны специалистам в данной области техники, не выходя за рамки объема и сущности настоящей заявки. Хотя настоящая заявка была описана в связи с конкретными предпочтительными вариантами реализации, следует понимать, что настоящая заявка, как заявлено, не должна быть чрезмерно ограничена такими определенными вариантами реализации. Действительно, 40 различные модификации описанных способов реализации настоящей заявки, которые находятся в пределах объема нижеследующей формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ усиления митохондриальной функции в одной или более клетках, 45 выбранных из группы, состоящей из клеток скелетной мускулатуры, нейрональных клеток и их комбинаций, при этом указанный способ включает:

введение эффективного количества композиции одной или более клеткам, при этом композиция содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из 5'-

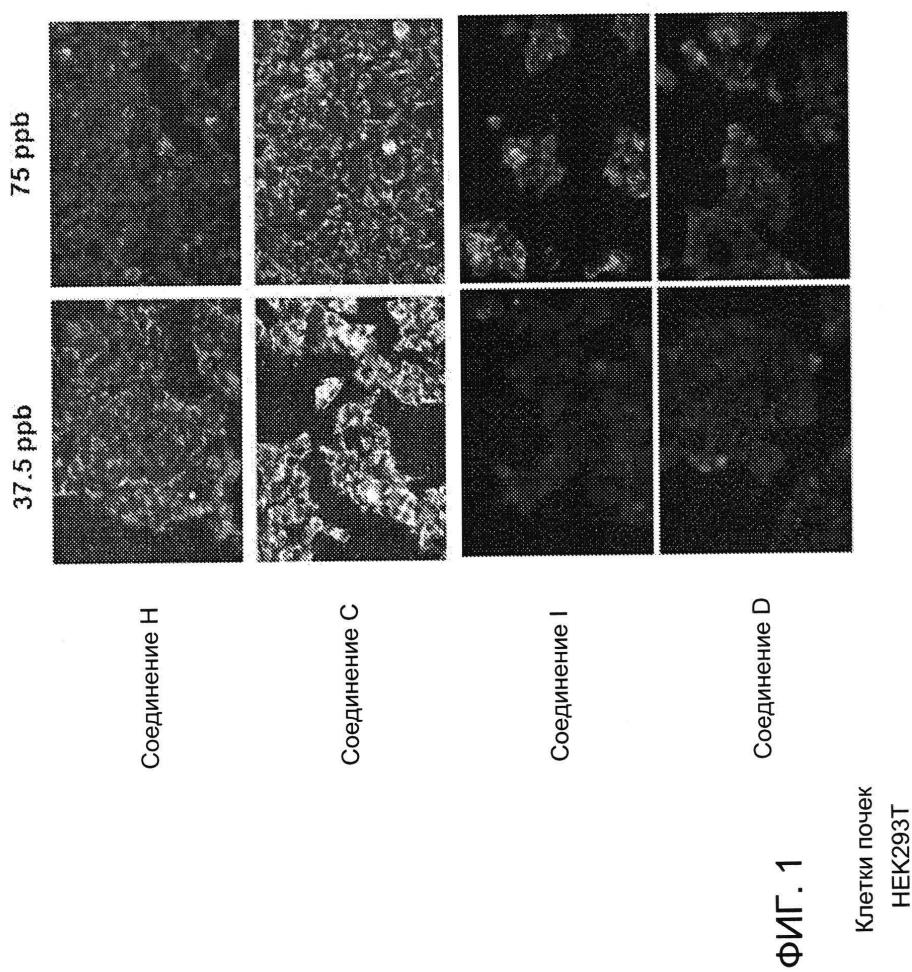
Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина и их комбинаций, при этом эффективное количество усиливает митохондриальную функцию по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией.

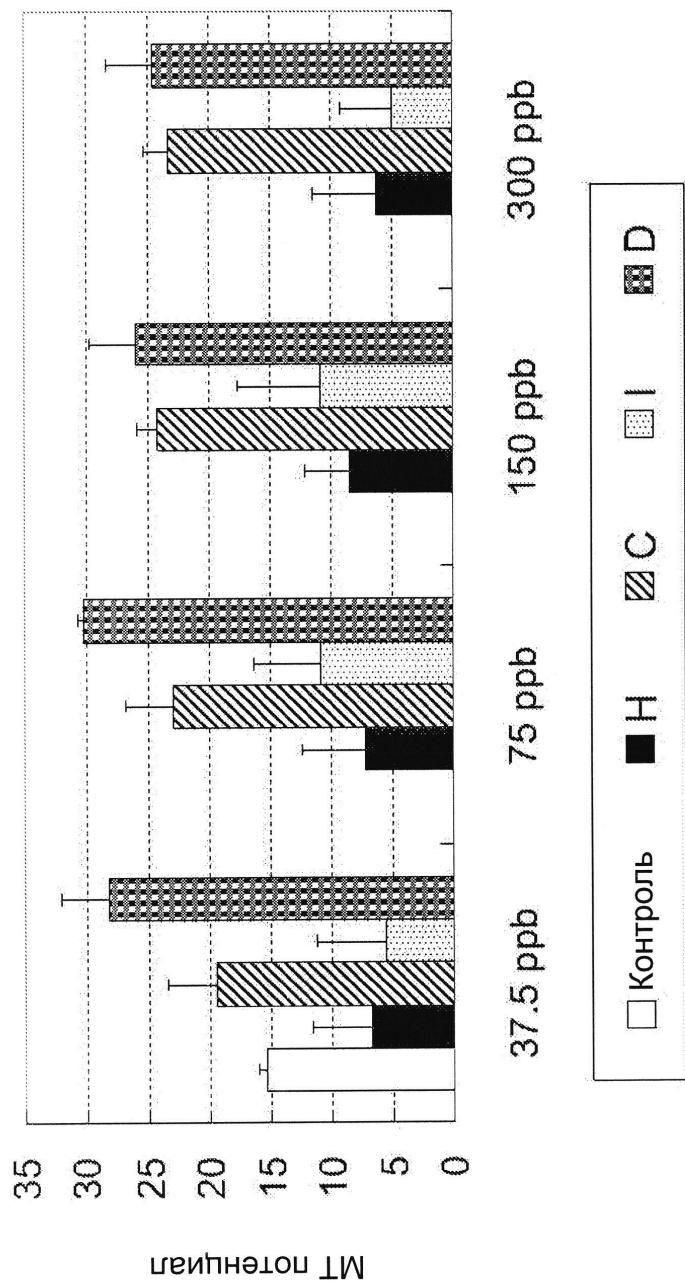
- 5 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное соединение выделено.
- 3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанное соединение очищено.
- 4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная композиция содержит 5'-Метилселеноаденозин.
- 5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная композиция не включает
- 10 глутамил-селеноцистеин, метионин или селенометионин.
- 6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что эффективное количество составляет 200 микрограммов или менее в день.
- 7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную композицию вводят один раз в день ежедневно.
- 15 8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что 5'-Метилселеноаденозин или соединение формулы (I) представляет собой селеногликозид.
- 9. Способ усиления митохондриальной функции в одной или более клетках печени, включающий:
 - введение эффективного количества композиции одной или более клеткам печени,
- 20 при этом композиция состоит из 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина, Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, при этом эффективное количество усиливает митохондриальную функцию по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией.
- 10. Способ уменьшения выработки глюкозы в одной или более клетках, выбранных
- 25 из группы, состоящей из клеток печени, клеток скелетной мускулатуры и их комбинаций, при этом указанный способ включает:
 - введение эффективного количества композиции одной или более клеткам, при этом композиция состоит из: 5'-Метилселеноаденозина, Se-Аденозил-L-гомоцистеина и Гамма-глутамил-метилселеноцистеина, при этом эффективное количество модулирует
- 30 метаболизм глюкозы в одной или более клетках по сравнению с клетками, не обработанными указанной композицией.

35

40

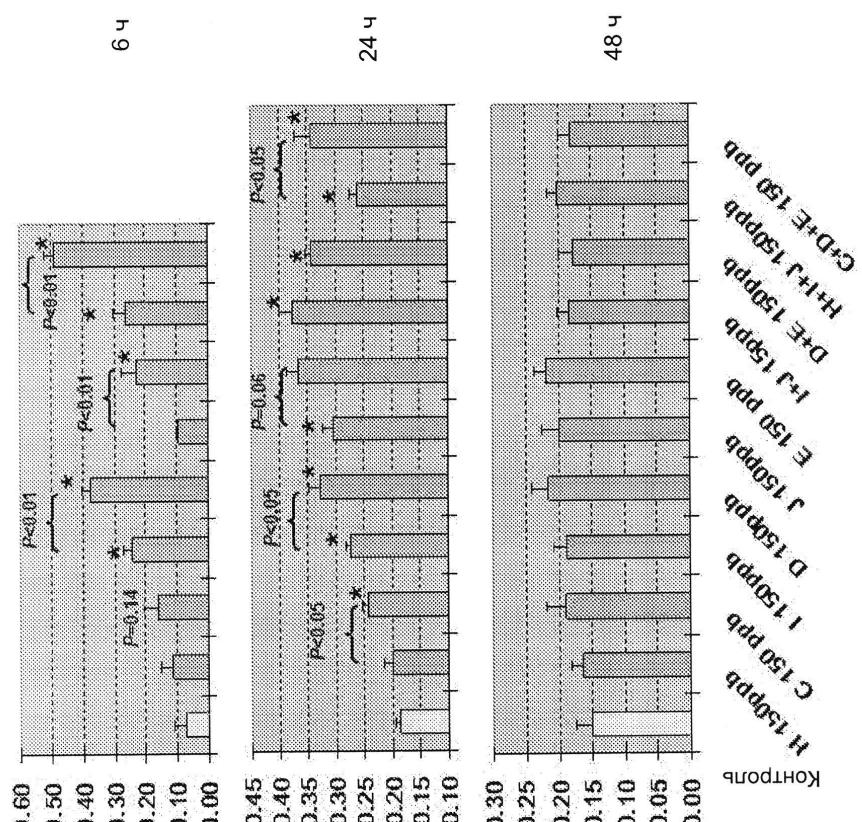
45





ФИГ. 2

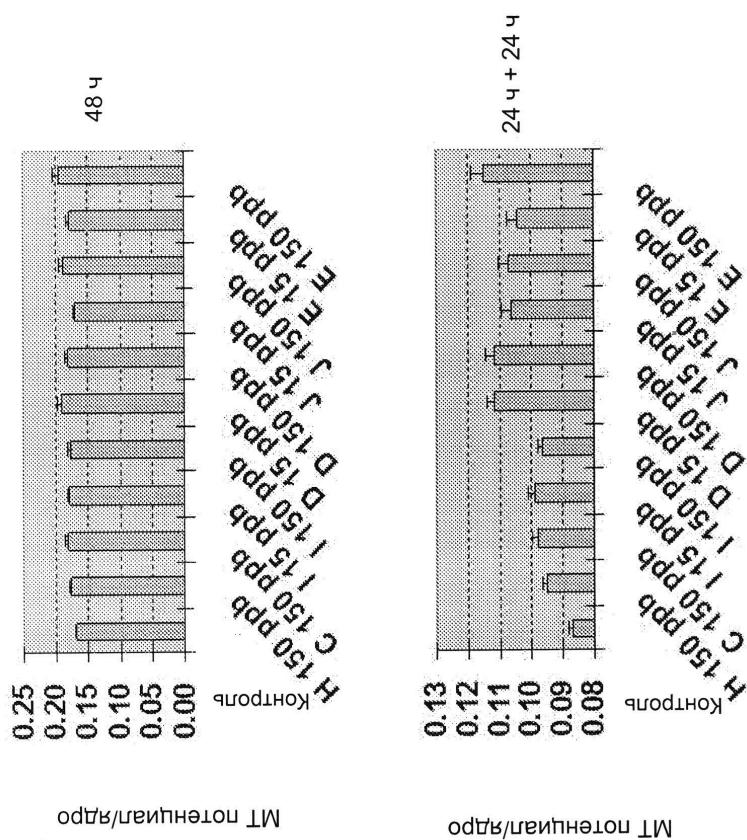
Клетки скелетной мускулатуры С2С12



MT норемнанар, хомманинсабхарин то АРДИ күтөктөн

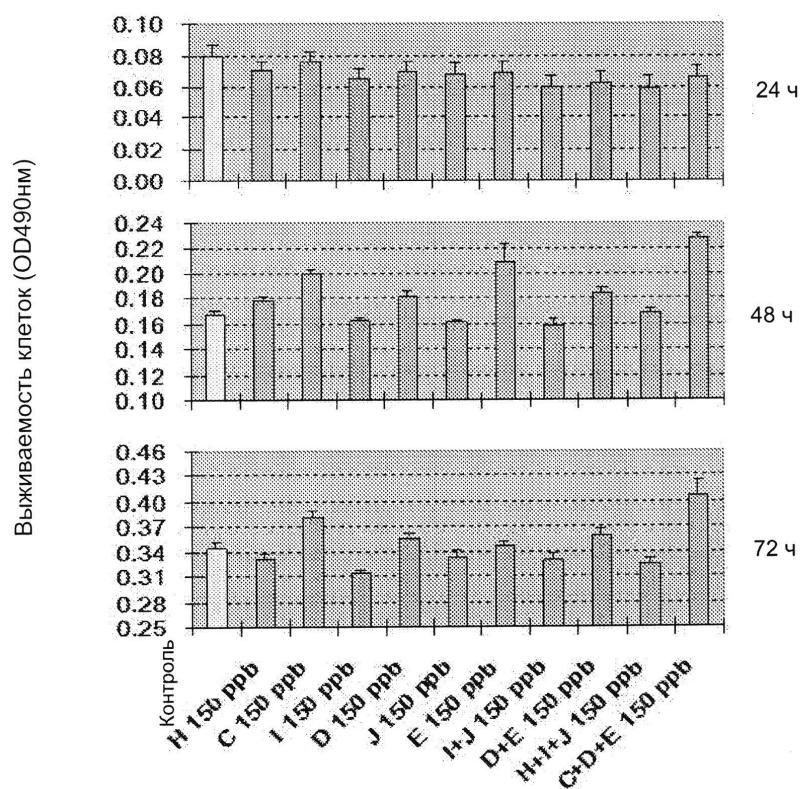
ФИГ. 3

Нейрональные клетки IMR-32



ФИГ. 4

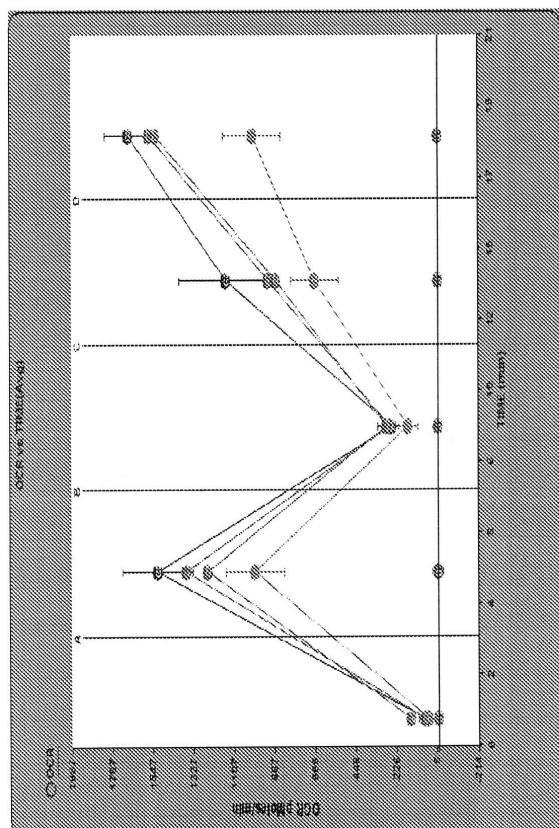
Нейрональные клетки IМR-32



ФИГ. 5

Нейрональные
клетки IMR-32

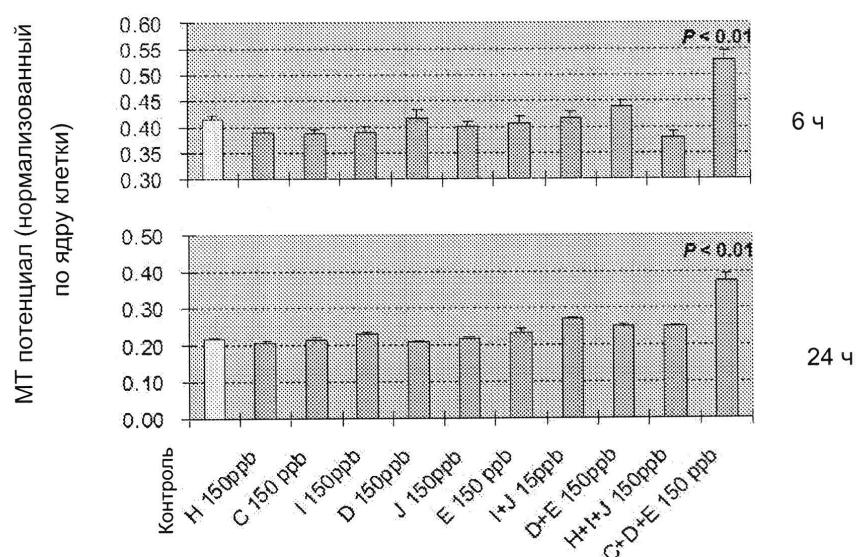
6/22



ФИГ. 6

МТ функция в мозге крыс,
подверженных стрессу

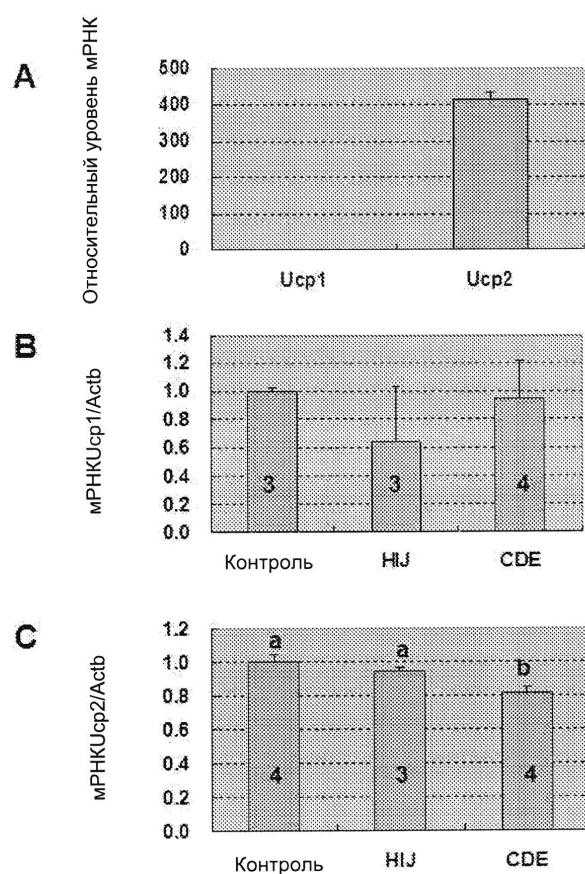
7/22



ФИГ. 7

Клетки печени AML-12

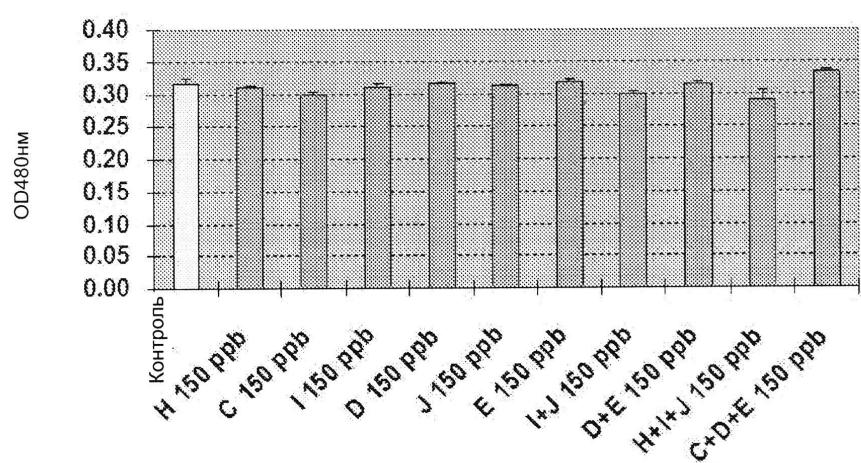
8/22



ФИГ. 8

Клетки печени AML-12

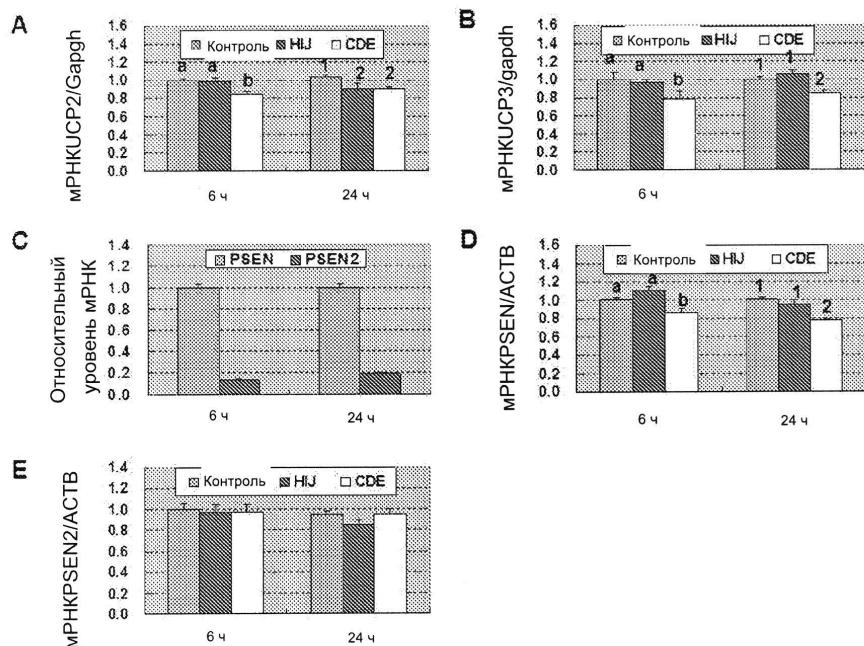
9/22



ФИГ. 9

Клетки печени AML-12

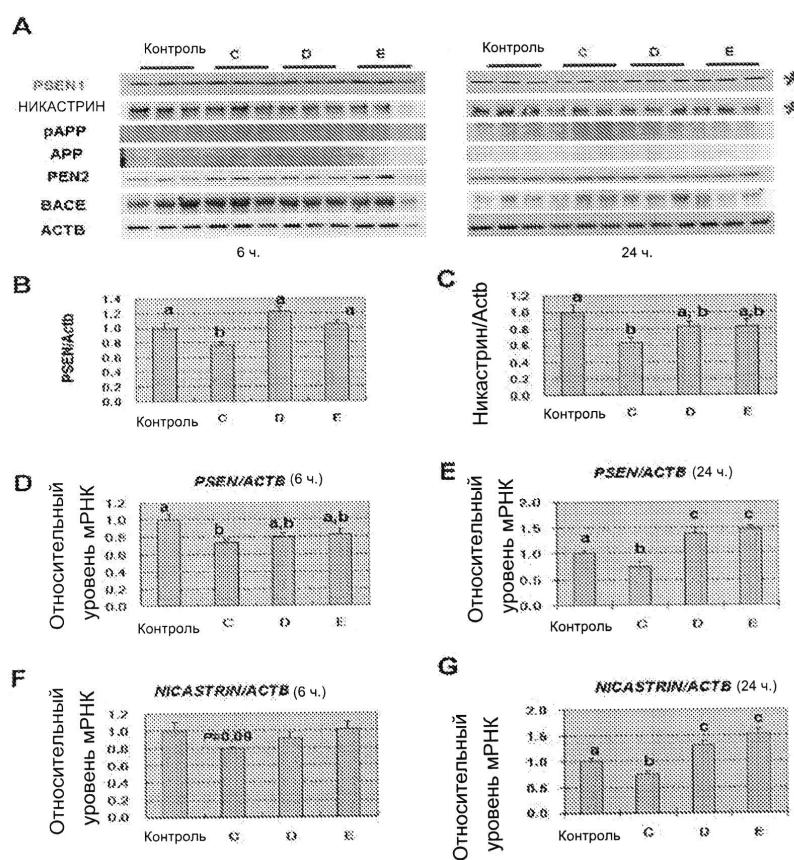
10/22



ФИГ. 10

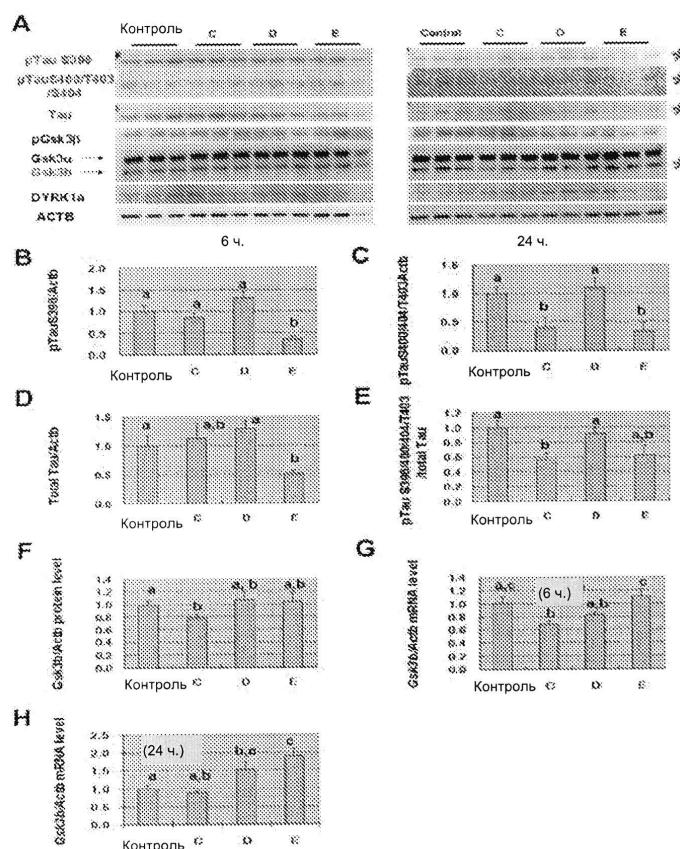
Нейрональные клетки IMR-32

11/22



ФИГ. 11

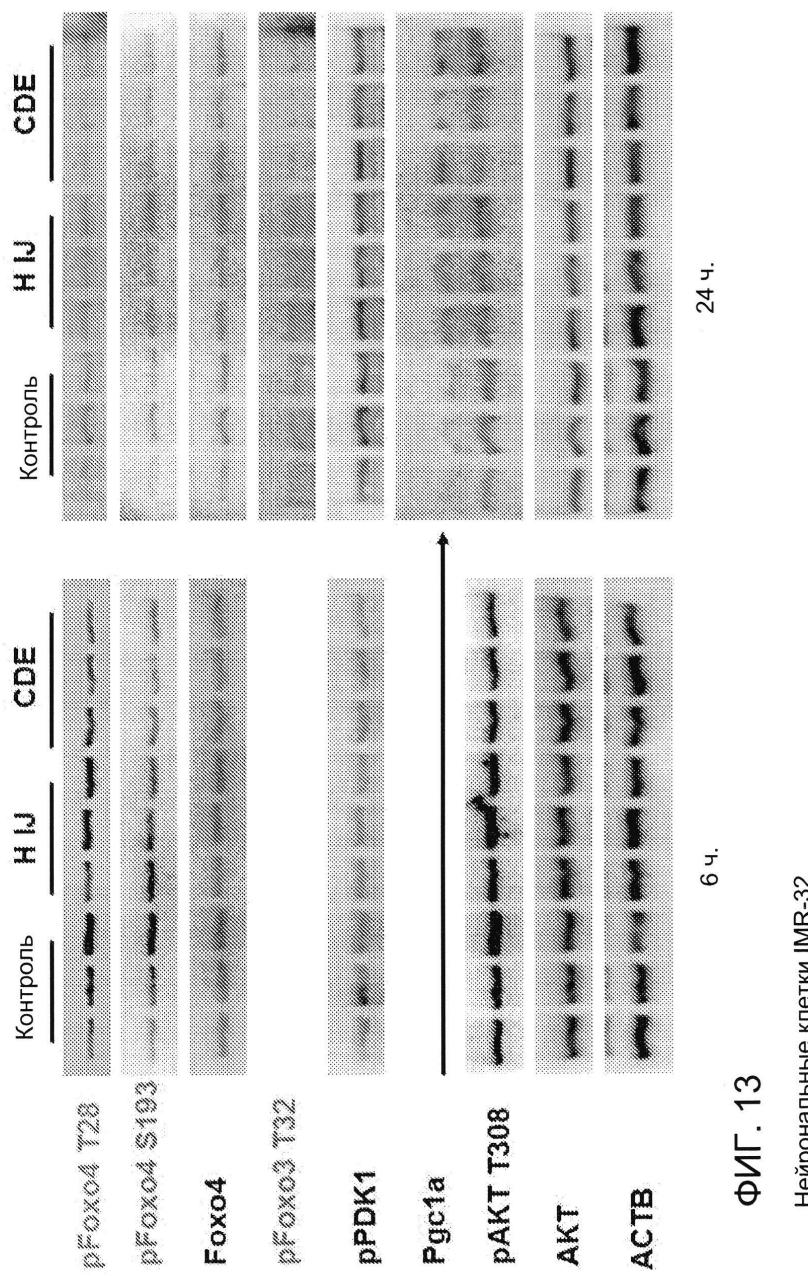
Нейрональные клетки IMR-32



ФИГ. 12

Нейрональные клетки IMR-32

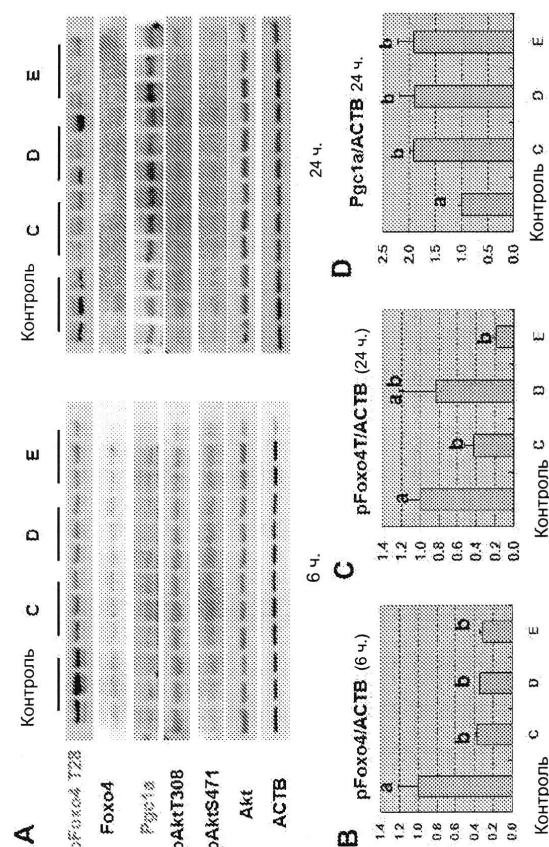
13/22



ФИГ. 13

Нейрональные клетки IMR-32

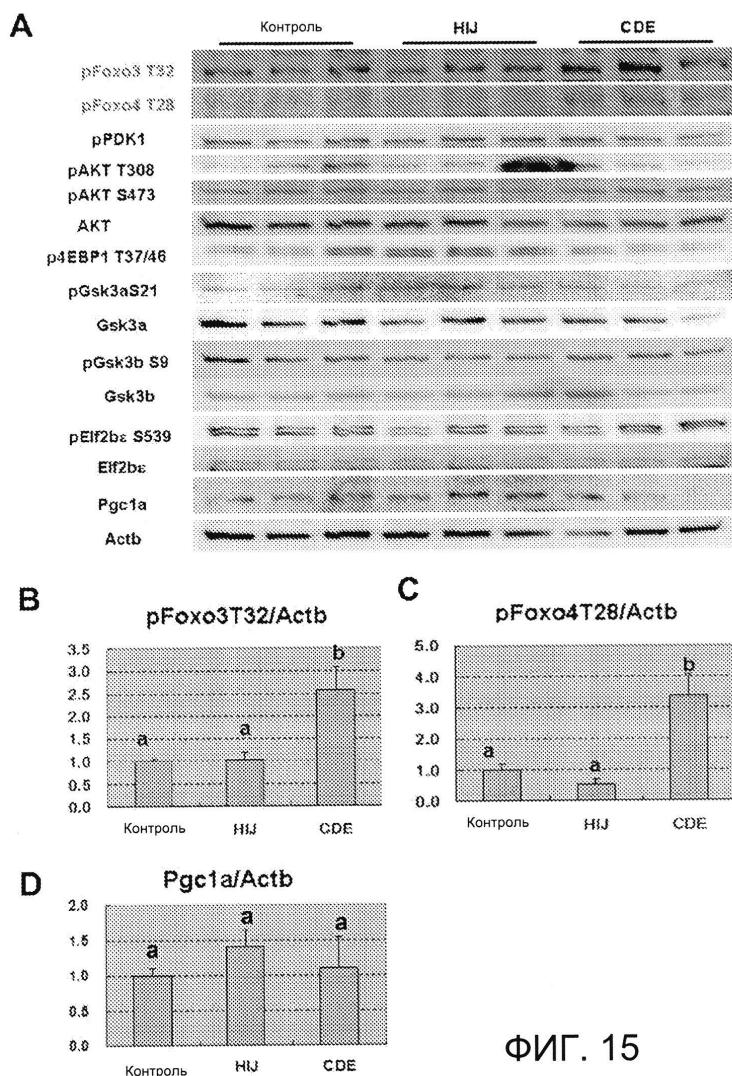
14/22



ФИГ. 14

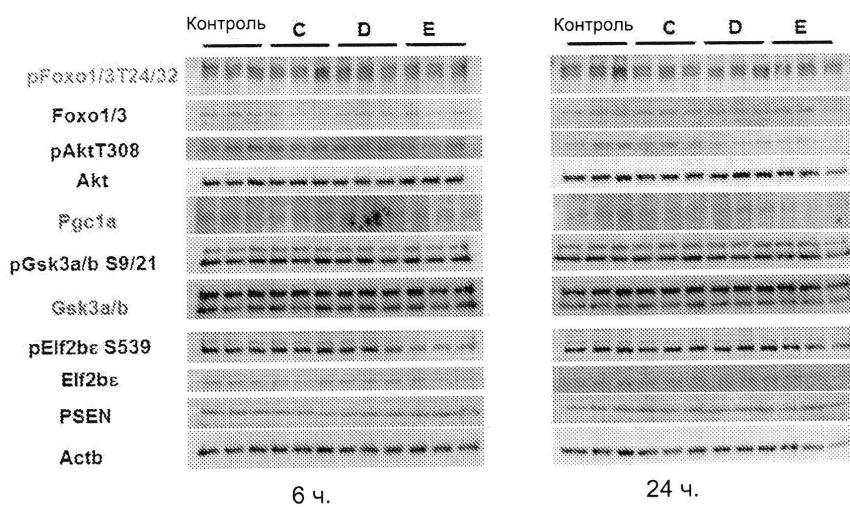
Нейрональные клетки IMR-32

15/22



ФИГ. 15

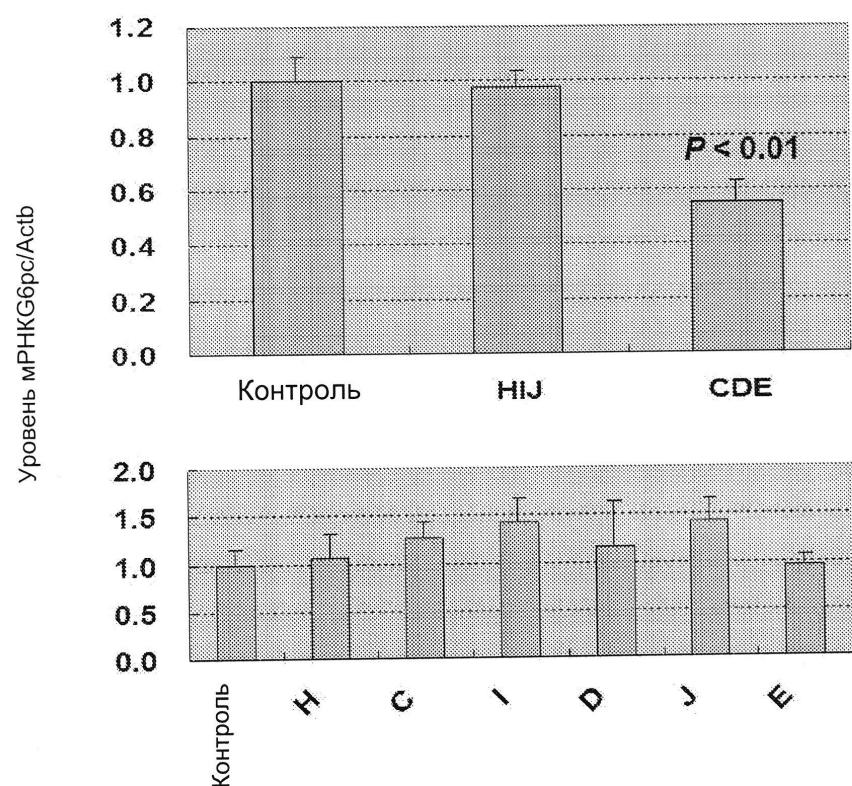
Клетки печени AML-12



ФИГ. 16

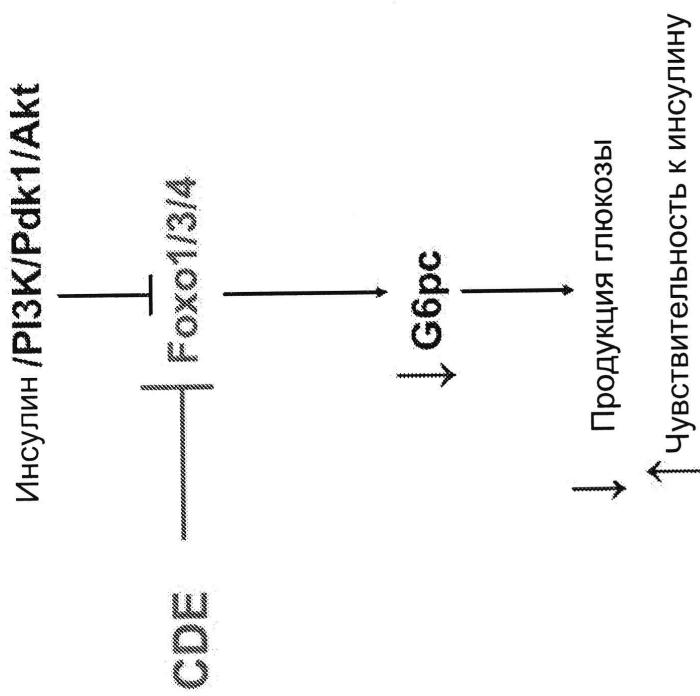
Клетки печени AML-12

17/22



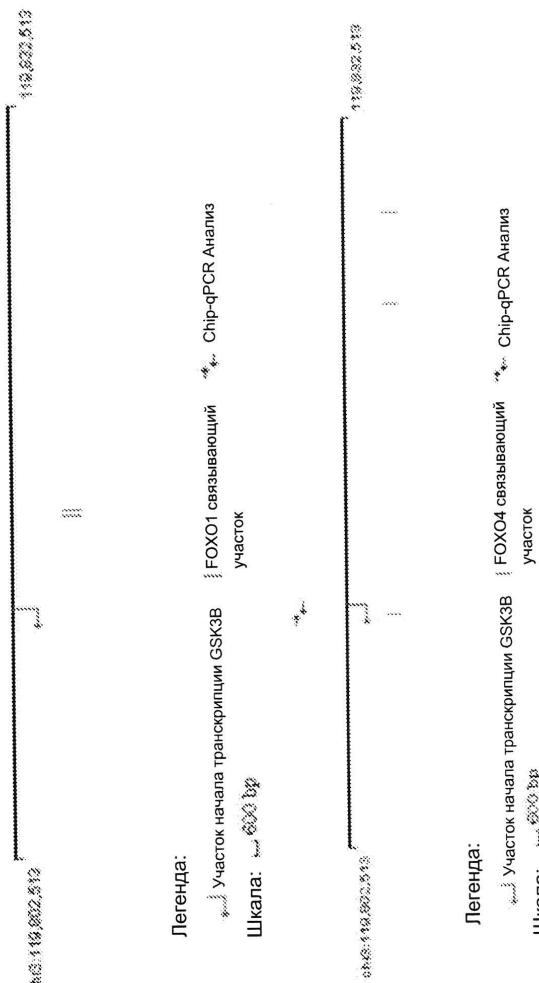
ФИГ. 17

18/22



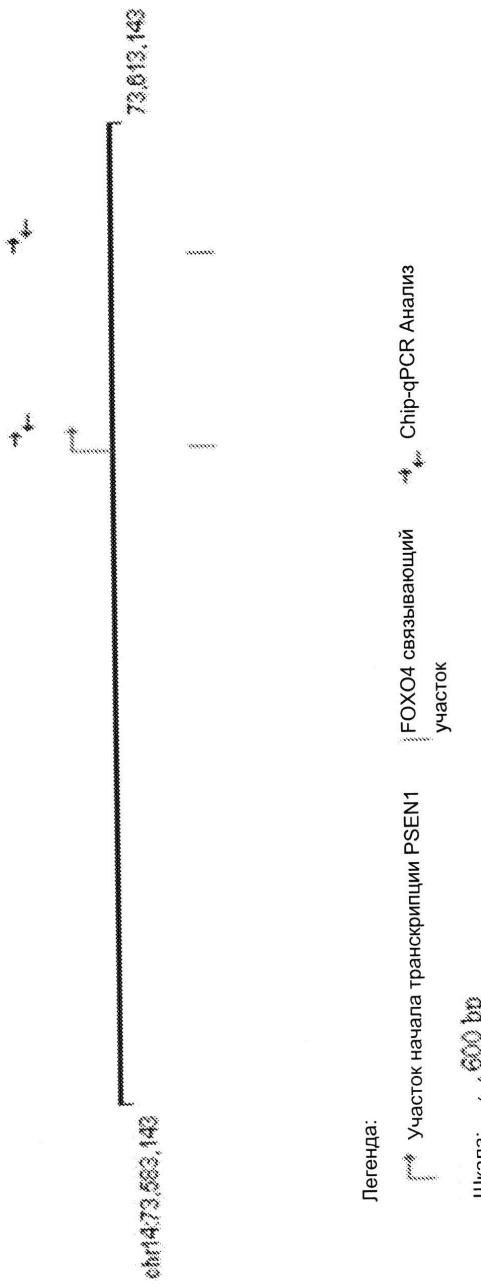
ФИГ. 18

Присутствие пяти FOXO1/3/4 связывающих фрагментов на промоторе GSK3B человека



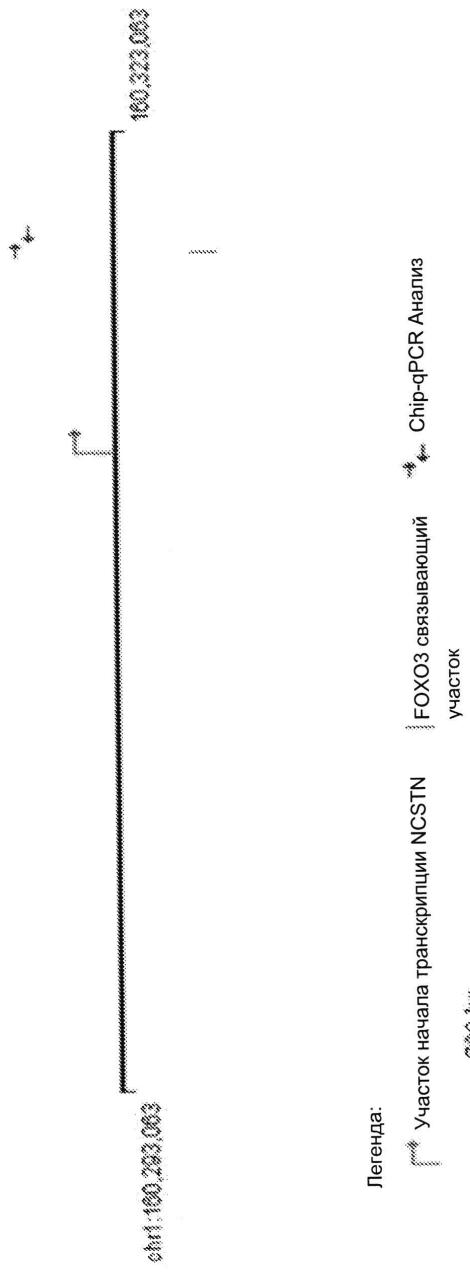
ФИГ. 19а

При отсутствии двух FOXO1/3/4 связывающих фрагментов на промоторе PSEN человека



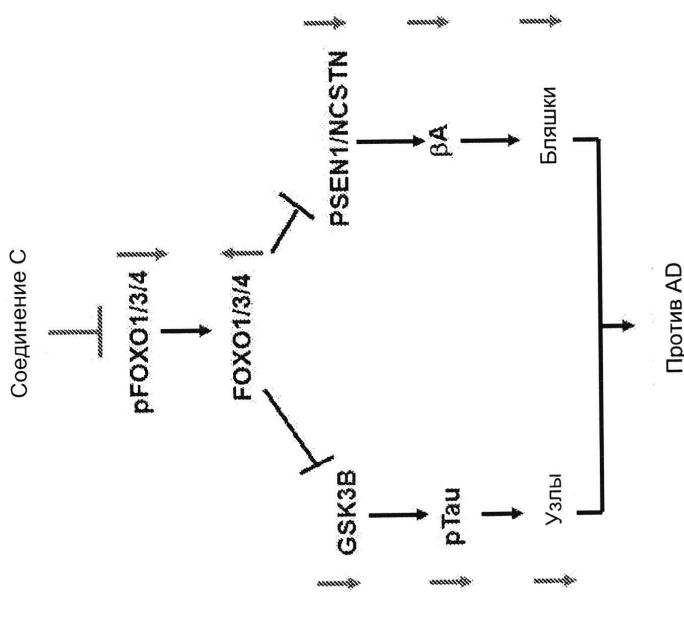
ФИГ. 19б

Присутствие FOXO1/3/4 связывающего фрагмента на промоторе Никастрина (NCSTN) человека



ФИГ. 19с

Рабочая модель-МОА соединения С против AD



ФИГ. 19d