(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106456658 A
(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201480077179.9
(22)申请日 2014.03.14
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.09.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/029542 2014.03.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/137983 EN 2015.09.17
(71)申请人 全技术公司
地址 美国肯塔基州
(72)发明人 R.鲍威尔 兰子鉴
A.伊安尼库里斯
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 黄登高 林森
(51)Int.Cl.
A61K 31/7076(2006.01)

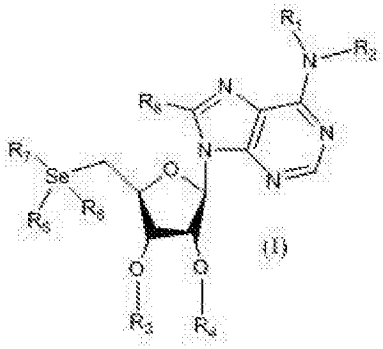
权利要求书4页 说明书58页 附图21页

(54)发明名称

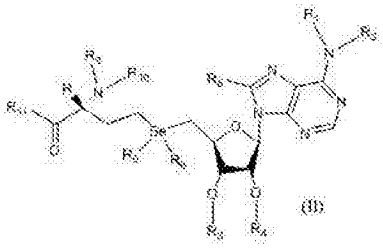
硒有机化合物的组合物和其使用方法

(57)摘要

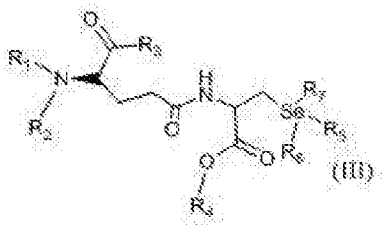
本申请涉及包含硒化合物的组合物和使用所述组合物增强线粒体功能或治疗线粒体功能障碍的方法，所述硒化合物例如5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合。



(I)



(II)



(III)

CN 106456658 A

1.用于治疗阿尔茨海默病的方法,包括:

给予受试者有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物。

2.用于在一种或多种神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚的方法,包括:

给予所述一种或多种神经元细胞有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物,其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比,所述有效量抑制神经元细胞中的B淀粉样蛋白积聚。

3.用于在一种或多种神经元细胞中抑制tau磷酸化的方法,包括:

给予所述一种或多种神经元细胞有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物,其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比,所述有效量抑制神经元细胞中的tau磷酸化。

4.权利要求1-3中任一项的方法,其中所述化合物经分离。

5.权利要求4的方法,其中所述化合物经纯化。

6.权利要求1-5中任一项的方法,其中所述组合物包含5'-甲基硒代腺苷。

7.权利要求1-6中任一项的方法,其中所述组合物排除谷氨酰基硒代半胱氨酸、甲硫氨酸或硒代甲硫氨酸的一种或多种。

8.权利要求1-7中任一项的方法,其中所述有效量是每天200微克或更少。

9.权利要求1-8中任一项的方法,其中所述组合物每天一次给予。

10.权利要求1-9中任一项的方法,其中所述5'-甲基硒代腺苷或式(I)的化合物是硒代糖苷。

11.用于在选自骨骼肌细胞、神经元细胞和其组合的一种或多种细胞中增强线粒体功能的方法,所述方法包括:

给予所述一种或多种细胞有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物,其中与未用所述组合物处理的细胞相比,所述有效量增强线粒体功能。

12.用于在一种或多种肝细胞中增强线粒体功能的方法,包括:

给予所述一种或多种肝细胞有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物,其中与未用所述组合物处理的细胞相比,所述有效量增强线粒体功能。

13.在选自肝细胞、骨骼肌细胞和其组合的一种或多种细胞中调节葡萄糖代谢的方法,所述方法包括:

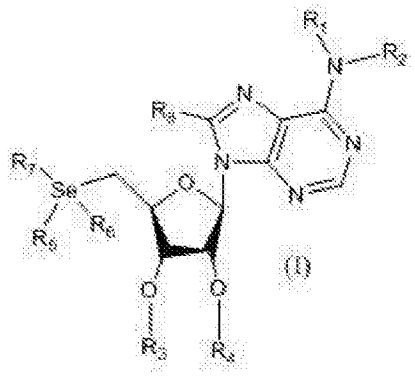
给予所述一种或多种细胞有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物,其中与未用所述组合物处理的细胞相比,所述有效量调节一种或多种细胞中的葡萄糖代谢。

14.在一种或多种肝细胞中减少葡萄糖6磷酸酶复合物的表达的方法,所述方法包括:

给予所述一种或多种细胞有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、

Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量抑制在一种或多种肝细胞中的葡萄糖6磷酸酶的表达。

15.一种组合物，其包含式(I)的化合物：



(I)

或其药学上可接受的盐、水合物或前药，其中

R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_4是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

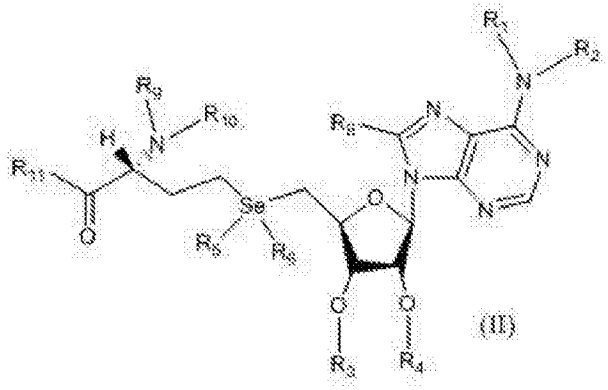
R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_7是H、烷基、烯基、炔基、酮、氨基醇、氨基酸、OR'、Se-R'、S-R'，其中R'选自H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；和

R_8是氢、叠氮基、烷基、烯基、炔基。

16.一种组合物，其包含式(II)的化合物：



(II)

或其药学上可接受的盐、水合物或前药，其中

R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_4是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

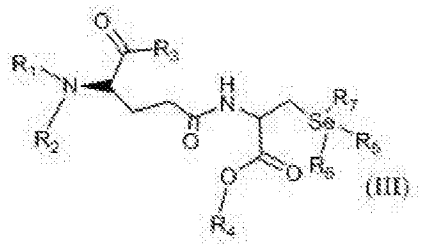
R_8是氢、叠氮基、烷基、烯基、炔基；

R_9是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_9与R_{10}一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_{10}是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_9与R_{10}一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；和

R_{11}是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基，或药学上可接受的盐或内盐。

17.一种组合物，其包含式(III)的化合物：



(III)

或其药学上可接受的盐、水合物或前药，其中

R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基，或药学上可接受的盐或内盐；

R_4是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基，或药学上可接受的盐或内盐；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；和

R_7是H、烷基、烯基、炔基、酮、OR'、Se-R'、S-R'，其中R'选自H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基。

硒有机化合物的组合物和其使用方法

发明领域

[0001] 本申请涉及硒有机组合物和化合物的组合物，和它们用于各种生物途径以提高线粒体功能、治疗疾病和抑制或增强特定类型的动物和人类细胞中的特定过程的方法。

[0002] 发明背景

硒(Se)是在许多生物过程中起关键作用的必需微量元素，所述生物过程例如生殖、甲状腺激素代谢、DNA合成和保护免于氧化损伤和感染。硒在各种硒依赖性酶的催化位点处掺入，所述酶例如谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、硫氧还蛋白还原酶和一种亚砜甲硫氨酸还原酶。这些含硒酶促进代谢活性的调节、免疫功能、抗氧化防御、胞内氧化还原调节和线粒体功能。

[0003] 称为线粒体(“MT”)的细胞器是高等生物细胞中的主要能量来源。线粒体提供广泛的细胞呼吸、氧化和代谢过程的直接和间接生物化学调节。这些过程包括电子传递链(ETC)活性，其驱动氧化磷酸化以产生呈腺苷三磷酸(ATP)形式的代谢能量，并且其还是胞内钙稳态中重要的线粒体功能的基础。线粒体呼吸发生在线粒体内膜上，经过电子传递系统通过电子流实现，所述电子传递系统包含四种复合物(复合物I、II、III和IV)，以及用作ATP合成(ATP合酶)位点的另一种复合物(复合物V)。任何复合物的活性的损害或降低破坏电子流并可导致线粒体呼吸功能障碍(参见例如，Schildgen等, Exp Hematol 2011;39:666-67510, 11; Arthur等, Mol Neurodegener 2009;4:37)。

[0004] 导致细胞死亡、活性氧物质产生、氧化DNA损伤增加、自噬增加和线粒体膜电位损失的线粒体功能障碍与病况，例如糖尿病、肥胖、年龄相关神经变性(包括阿尔茨海默病)、中风、胰岛素抵抗和动脉粥样硬化有关。已经表明无机形式的硒，亚硒酸钠，在某些情况下影响线粒体功能。Mehta等表明线粒体生物发生的标志物PGC1a在缺血的脑组织中增加，并且在缺血和再循环后亚硒酸钠进一步增加PGC1a。(Mehta等, BMC Neuroscience 2012 13:79)。Tirosh等表明，高剂量而非中等剂量的亚硒酸钠阻止因结肠组织中半抗原诱导的炎症导致的半抗原诱导的线粒体功能损害。(Tirosh等Nutrition 2007 23:878)。这些结果表明，无机硒可影响遭受损害的细胞中的线粒体功能。然而，一些研究发现，亚硒酸钠的生物利用度低于其它形式的硒，质疑其功效。(Rider等, J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2010 94(1):99-110)。

[0005] 此外，文献中的结果表明，不同化学形式的硒具有不同的生物活性。例如，selenozolidine在降低肺肿瘤数量方面比硒代甲硫氨酸更有效。(Poerschke等, J Biochem Molecular Toxicology 2012 26:344)。Barger等表明，饲喂不同来源的硒例如硒甲硫氨酸、亚硒酸钠和硒化酵母的小鼠，对基因表达和对线粒体结构和功能的特定功能途径具有不同的影响。(Barger等, Genes and Nutrition 2012 7:155)。

[0006] 因为不同化学形式的硒的生物活性和利用度明显不同，因此需要鉴定硒的化学形式和表征它们对生物过程的作用。对生物过程的这些作用的表征可导致重要的生物过程的医学调节，以预防或对抗疾病，例如与线粒体功能障碍有关的那些疾病。与线粒体功能障碍有关的疾病可通过给予在一种或多种类型的动物或人类细胞中减少线粒体功能障碍或上

调线粒体功能的特定化学形式的硒来预防或治疗。对生物活性变化的一种解释可能是不同形式的硒在分子水平上对生物途径具有不同的作用。

[0007] 发明简述

本申请涉及硒-有机化合物、组合物和使用所述化合物和组合物的方法。所述化合物包括5'-甲基硒代腺苷(“化合物C”)、Se-腺苷-L-高半胱氨酸(“化合物D”)、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸(“化合物E”)、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合。如本文所述,组合物和其组合可用于增强线粒体功能,治疗线粒体功能障碍,治疗阿尔茨海默病和以组织特异性和组织合适的方式调节葡萄糖代谢。

[0008] 在本申请的一个方面,不同化学形式的有机硒鉴定为具有生物活性。如本文所述的含硒化合物可获自硒化酵母或可如本文所述经化学合成。硒化酵母包含许多硒和硫化合物,但硒化酵母中并非所有的硒化合物都影响生物过程。此外,已经表明硒化酵母中硒和硫化合物的混合物彼此抑制或负面影响生物过程。

[0009] 本申请的另一方面提供本文所述的生物活性硒化合物的类似物或衍生物。含硒化合物的类似物和/或衍生物可经合成制备。在一些实施方案中,类似物具有增加的稳定性、降低的氧化作用、增加的半寿期和/或将化合物靶向特定组织。

[0010] 在本申请的另一方面,不同化学形式的硒显示具有不同的组织特异性(例如,一些化合物对神经元细胞有活性,但对肝细胞没有活性)。此外,所述含硒组合物可激活一个细胞类型中的转录激活物,而其使不同细胞类型中的所述转录激活物失活。不同含硒化合物和其组合的这些不同的活性和组织特异性是令人惊讶和意想不到的。

[0011] 本申请的一个方面提供包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式II的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物的组合物。在进一步的实施方案中,可分离和/或纯化这些化合物中的一种或多种。

[0012] 在其它实施方案中,组合物可排除5'-甲基硫代腺苷、S-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸或谷氨酰基硒代半胱氨酸中的一种或多种,因为这些化合物的一种或多种可能对于组合物是不必要的,或抑制组合物中的其它化合物。

[0013] 本申请的另一方面提供使用本文所述的组合物增强线粒体功能、治疗线粒体功能障碍、治疗阿尔茨海默病和/或调节葡萄糖代谢的方法。

[0014] 在实施方案中,用于治疗阿尔茨海默病的方法包括:给予受试者有效量的组合物,所述组合物包含5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物或其混合物。在其它实施方案中,可分离和/或纯化这些化合物中的一种或多种。

[0015] 在仍其它的实施方案中,用于治疗阿尔茨海默病的方法包括:给予受试者有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物。在本发明的实施方案中,可分离和/或纯化这些化合物中的一种或多种。

[0016] 在其它实施方案中,用于在一种或多种神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚的方法包括:给予所述一种或多种神经元细胞有效量的组合物,所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物,其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比,所述有效量抑制在一种或多种神经元细胞中的B淀粉样蛋白积聚。在进一步的实施方案

中，可分离和/或纯化这些化合物中的一种或多种。

[0017] 在另一个实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚的方法包括：给予一种或多种神经元细胞有效量的组合物，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比，所述有效量抑制在神经元细胞中的B淀粉样蛋白积聚。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化这些化合物中的一种或多种。

[0018] 在实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制tau磷酸化的方法包括：给予所述一种或多种神经元细胞有效量的组合物，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物，其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比，所述有效量抑制在一种或多种神经元细胞中的tau磷酸化。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化这些化合物中的一种或多种。

[0019] 在其它实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制tau磷酸化的方法包括：给予所述一种或多种神经元细胞有效量的组合物，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比，所述有效量抑制在神经元细胞中的tau磷酸化。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0020] 在实施方案中，组合物包含5’-甲基硒代腺苷或式(I)的化合物或其硒代糖苷。在仍其它的实施方案中，组合物可排除谷氨酰基硒代半胱氨酸、甲硫氨酸或硒代甲硫氨酸，因为在组合物中它们对组合物中的活性化合物的可能的抑制作用。

[0021] 在一些实施方案中，给予受试者的有效量是每天200微克或更少。在实施方案中，本发明的组合物每天一次给予受试者。

[0022] 在另一方面，用于在选自骨骼肌细胞、神经元细胞和其组合的一种或多种细胞中增强线粒体功能的方法包括：给予所述一种或多种细胞有效量的组合物，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量增强线粒体功能。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0023] 在其它实施方案中，用于在一种或多种肝细胞中增强线粒体功能的方法包括：给予所述一种或多种肝细胞有效量的组合物，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量增强线粒体功能。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0024] 在另一方面，在选自肝细胞、骨骼肌细胞和其混合物的一种或多种细胞中调节葡萄糖代谢的方法，所述方法包括：给予所述一种或多种细胞有效量的组合物，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量调节葡萄糖代谢。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0025] 在实施方案中，在一种或多种肝细胞中降低葡萄糖6磷酸酶复合物的表达的方法，包括：给予所述一种或多种细胞有效量的组合物，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量抑制葡萄糖6磷酸酶的表达。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0026] 附图简述

结合到本说明书中并构成其一部分的附图举例说明了本发明的数个方面，并且和本说明书一起用于解释本发明的原理。附图的简单描述如下：

图1表明在用5'-甲基硒代腺苷("化合物C")而非Se-腺苷-L-高半胱氨酸("化合物D")处理HEK293T肾细胞时线粒体("MT")电位(荧光)提高。在相同的曝光时间和放大倍数下在荧光显微镜下捕获图像。

[0027] 图2表明在用化合物C (5'-甲基硒代腺苷)和D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)处理时在骨骼肌C2C12细胞中的线粒体("MT")电位提高。硫类似物H (5'-甲基硫代腺苷)和I (S-腺苷-L-高半胱氨酸)在所有浓度下降低线粒体电位。

[0028] 图3表明在用化合物C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)或其组合处理的IMR-32人神经元细胞中在6小时和24小时时线粒体("MT")电位的瞬时增加。它们的硫类似物H (5'-甲基硫代腺苷)、I(S-腺苷-L-高半胱氨酸)、J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)和其组合也显示线粒体功能的瞬时增加。数据通过染色的细胞核的荧光强度标准化。*表示与对照的*P*值。

[0029] 图4表明C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)或它们的硫类似物H (5'-甲基硫代腺苷)、I (S-腺苷-L-高半胱氨酸)、J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)的重复处理提高IMR-32神经元细胞中的线粒体(MT)电位。细胞用化合物处理一次，持续48小时(hr.) (上图)或用化合物处理两次，共48小时(hr.)(下图)。数据通过染色的细胞核的荧光强度标准化。

[0030] 图5表明化合物C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)或其组合经72小时时间对人IMR-32神经元细胞的成活力(通过OD490 nm表示)缺少毒性作用。相比之下，硫类似物H (5'-甲基硫代腺苷)、I(S-腺苷-L-高半胱氨酸)、J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)和其组合显示经72小时时间成活力略微降低。结果显示为平均值 +sem; n=8。

[0031] 图6表明在由10微摩尔钙应激的大鼠皮层细胞中通过化合物D和E恢复线粒体功能。该图表明正常线粒体(最高线)的呼吸图，其中最终OCR为图线的末端与X-轴之间的测量距离。最低线表明通过10微摩尔钙抑制线粒体呼吸。中间的两条线表示在化合物C或D和10微摩尔钙存在时的线粒体呼吸。

[0032] 图7表明与H (5'-甲基硫代腺苷)、I (S-腺苷-L-高半胱氨酸)和J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)的组合相比在6和24小时时，在用硒化合物C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)(各化合物150 ppb)的组合处理的AML-12小鼠肝细胞中线粒体(MT)电位的显著增加。数据通过染色的细胞核的荧光强度标准化。柱状图中显示的*P*值通过比较CDE组与对照或HIJ组确定。

[0033] 图8表明在AML-12小鼠肝细胞中线粒体解偶联蛋白2 (Ucp2)的显著表达，和通过

化合物C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合(各化合物150ppb)下调其表达。(A) 在正常AML-12细胞中(用水溶媒处理6小时后)线粒体解偶联蛋白1 (Ucp1)和Ucp2的相对表达。n=4,如柱中所示。(B) C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合对Ucp1表达无影响。(C) C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合下调Ucp2表达。数据表示为各柱中指示的样品数的平均值 + sem。在柱状图中不同的字母(a与b)意指在这些组中的显著差异($P< 0.05$)。

[0034] 图9表明化合物C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)、E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)和其组合或它们的硫类似物H (5'-甲基硫代腺苷)、I (S-腺苷-L-高半胱氨酸)、J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)和其组合对AML-12小鼠肝细胞的成活力(通过OD490 nm表示)无毒性作用。

[0035] 图10表明在用C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)(各化合物150ppb)化合物的组合处理后下调人IMR-32神经元细胞中的Ucp2、Ucp3和早老素(PSEN)表达。(A) 在6和24小时的Ucp2 mRNA表达。(B) 在6和24小时的Ucp3 mRNA表达。(C) 用溶媒(水)处理的人IMR-32神经元细胞中在6和24小时的相对PSEN1和PSEN2 mRNA水平。(D) 用C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)、E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合(各化合物150ppb)或H (5'-甲基硫代腺苷)、I (S-腺苷-L-高半胱氨酸)和J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)的组合(各化合物150ppb)处理的人IMR-32神经元细胞中根据肌动蛋白β (ACTB) mRNA水平的量标准化后在6和24小时的PSEN mRNA表达。(E) 在用C (5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合或H (5'-甲基硫代腺苷)、I (S-腺苷-L-高半胱氨酸)和J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)的组合处理的人IMR-32神经元细胞中根据(ACTB) mRNA水平标准化后在6和24小时的PSEN2表达。数据表示为3-4个样品/组的平均值 + sem。柱状图中的不同字母(a与b)和不同的数字(1与2)意指在这些组中显著差异($P< 0.05$)。

[0036] 图11表明γ分泌酶复合物PSEN和Nicastrin是化合物C (5'-甲基硒代腺苷)的靶标,如通过蛋白质印迹和实时聚合酶链反应("RT-PCR")分析所测定的。(A) 用150ppb化合物C(5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)或E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)处理6和24小时的人IMR-32神经元细胞中的各种蛋白(对阿尔茨海默病(AD)中的斑块形成是关键的)的蛋白质印迹分析照片。(B-C) 上述蛋白质印迹中(B) PSEN和(C) Nicastrin蛋白水平的定量分析(用所列化合物处理24小时后,右图)。数据表示为3个样品的平均值 + sem。(D-G) 用水溶媒(对照)和所列的化合物处理(D、F) 6和(E、G) 24 hr的人IMR-32神经元细胞中的(D-E) PSEN和(F-G) Nicastrin表达的定量RT-PCR分析。数据表示为4个样品的平均值 + sem。柱状图中的不同的字母(a与b、a与c或b与c)意指在这两个组之间显著差异($P < 0.05$)。字母"a,b"表示与a或b无显著差异。

[0037] 图12表明化合物C(5'-甲基硒代腺苷)是Tau磷酸化的新的抑制剂,和糖原合酶激酶3 β ("GSK3b")下调剂(downregulator),如通过蛋白质印迹和RT-PCR分析所测定的。(A)用150ppb的化合物C(5'-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)或E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)处理6和24小时的人IMR-32神经元细胞中的各种蛋白(对于AD中缠结形成是关键的)的蛋白质印迹分析照片。(B-E) 上述蛋白质印迹(24小时处理后,右图)中(B)

位置396的丝氨酸残基上的磷酸化Tau (“pTau S396”)和(C) 位置400的丝氨酸残基、位置403的苏氨酸残基和位置404的丝氨酸残基上的磷酸化Tau (“pTau S400/T403/S404”)、(D)总Tau和(E) 合并的pTauS396和pTau S400/T403/S404/总Tau蛋白水平的定量分析。数据表示为3个样品的平均值 + sem。(F) 用水溶媒(对照)或化合物处理24小时的IMR-32细胞的上述蛋白质印迹中GSK3b蛋白水平的定量分析。数据表示为3个样品的平均值 + sem。(G-H)用水溶媒(对照)和所列的化合物处理(G) 6和(H) 24小时的人IMR-32神经元细胞中GSK3b mRNA表达的定量RT-PCR分析。数据表示为4个样品的平均值 + sem。柱状图中的不同的字母(a与b、a与c或b与c)意指在这两个组之间显著差异($P < 0.05$)。字母“a,b”或“b,c”表示与a或b或c无显著差异。

[0038] 图13表明通过化合物C(5’-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合(各化合物150ppb)导致的在人IMR-32神经元细胞中FOXO磷酸化降低和PGC1a蛋白表达增加。

[0039] 图14表明各种其它信号转导分子的蛋白质印迹分析,所述其它信号转导分子包括在用化合物C(5’-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)或E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)处理的IMR-32神经元细胞中的在苏氨酸28上磷酸化的磷酸化forkhead box蛋白O4 (“pFOXO4 T28”)、forkhead box蛋白O4 (“FOXO4”)、在苏氨酸308上的磷酸化鼠胸腺瘤病毒癌基因同源物1 (“pAktT308”)、在丝氨酸471上的磷酸化鼠胸腺瘤病毒癌基因同源物1 (“pAktS471”)、Akt和过氧化物酶体增殖子活化受体γ共活化剂1α (“PGC1a”),各化合物150ppb。(A) 蛋白质印迹照片。(B-C) 用所列化合物处理(B) 6和(C) 24小时的AML-12细胞的上述蛋白质印迹中在位置28的苏氨酸上的磷酸化forkhead box蛋白O4 (pFOXO4 T28)的定量分析。数据表示为3个样品的平均值 + sem。柱状图中的不同的字母(a与b)意指在这两个组之间显著差异($P < 0.05$)。字母“a,b”表示与a或b无显著差异。

[0040] 图15表明在用C(5’-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合处理6小时的小鼠肝AML-12细胞中(各化合物150ppb)各种其它信号转导分子的蛋白质印迹分析,所述其它信号转导分子包括FOXOs、PDK1、AKT、Gsk3a/b、4EBP1、Eif2be和PGC1a。(A) 蛋白质印迹照片。(B-C) 上述蛋白质印迹中所示的AML-12细胞中(B) 在T32的磷酸化FOXO3和(C) 在T28的磷酸化FOXO4的定量分析。数据表示为3个样品的平均值 + sem。柱状图中的不同的字母(a与b)意指在这两个组之间显著差异($P < 0.05$)。

[0041] 图16表明用溶媒(水,对照)或各自150 ppb的化合物C(5’-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)或E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)处理6和24小时后,在小鼠肝AML-12细胞中各种所列分子的蛋白质印迹分析。

[0042] 图17表明小鼠肝AML-12细胞中的葡萄糖6磷酸酶催化亚基(“G6pc”)表达被化合物C(5’-甲基硒代腺苷)、D (Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E (γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)的组合显著地下调,但不被单独的化合物下调。细胞用溶媒(对照)、单独的硒化合物(十亿分之150份(150ppb))或CDE组合(各化合物150 ppb)以及它们各自的硫类似物处理48小时,然后进行定量RT-PCR。在柱状图中数据表示为4个样品的平均值 + sem。

[0043] 图18表明化合物CDE的组合在肝细胞中调节G6pc表达的示意图。

[0044] 图19表明在人Gsk3b、PSEN和*NICASTRIN*基因的启动子区中存在FOXO结合基序,以

及化合物C对在神经元细胞的斑块和缠结形成中重要介质的调节的作用示意图。子图(A)表明在人*GSK3B*启动子上5个FOXO1/3/4结合基序的位置。子图(B)表明在人*PSEN*启动子上两个FOXO1/3/4结合基序的位置。子图(C)表明在人*Nicastrin (NCSTN)*启动子上FOXO1/3/4结合基序的位置。子图(D)表明化合物C对在神经元细胞的斑块和缠结形成中重要介质的调节的作用示意图。

[0045] 发明详述

定义

本文使用的术语"给药"和"给予"是指给予药物、前药或其它试剂或治疗性处理(例如本申请的组合物)至受试者(例如受试者或体内、体外或离体细胞、组织和器官)的行为。给药至人体的示例性的途径可通过眼(经眼)、口(经口)、皮肤(局部或经皮)、鼻(经鼻)、肺(吸入)、口腔粘膜(含服)、耳、直肠、阴道、通过注射(例如静脉内、皮下、瘤内、腹膜内等)等。

[0046] 术语"烷基"是指1-24个碳原子的支链或非支链饱和的烃基。本文优选的"烷基"包含1-16个碳原子;即C_{1-16}烷基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、己基、异己基、3-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、新己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基和十六烷基。最优选"低级烷基",其指1-6个、更优选1-4个碳原子的烷基。烷基可任选被酰基、氨基、酰胺基、叠氮基、羧基、烷基、芳基、卤代、胍基、氧代、硫烷基、亚氧硫基、磺酰基、杂环基或羟基取代。

[0047] 术语"碱金属"是指金属盐,包括但不限于合适的碱金属(1a族)盐、碱土金属(I1a族)盐和其它生理学可接受的金属。这样的盐可自铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌制备。

[0048] 术语"烯基"是指含有至少1个碳-碳双键的直链或支链碳链。在示例性的实施方案中,"烯基"是指含有2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子的烃,即C_{1-10}烯基。烯基的实例包括但不限于乙烯、丙烯、丁烯、戊烯、己烯、庚烯、辛烯、壬烯和癸烯。烯基可任选被氨基、烷基、卤代或羟基取代。

[0049] 术语"酰胺基"是指C-酰胺基例如--CONR'R''或N酰胺基例如--NR'COR'',其中该定义中使用的R'和R''独立地是氢、烷基、烯基、炔基、烷氧基、碳环、杂环、芳基或芳烷基。"磺酰胺基"包括--NR'--SO_2--R''。最优选R'和R''是氢、烷基、芳基或芳烷基。

[0050] 术语"炔基"是指含有至少1个碳-碳三键的直链或支链碳链。在示例性的实施方案中,"炔基"是指含有2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子的烃,即,C_{2-10}炔基。炔基的实例包括但不限于乙炔、丙炔、丁炔、戊炔、己炔、庚炔、辛炔、壬炔和癸炔。炔基可任选被氨基、烷基、卤代或羟基取代。

[0051] 术语"芳基"是指含有1、2或3个环的碳环芳族系统,其中所述环可以侧接的方式连接在一起,或可以是稠合的。术语"稠合"意指第二个环通过具有两个与第一个环共同(即,共享)的相邻原子而存在(即,连接或形成)。术语"稠合"等同于术语"缩合"。术语"芳基"包含芳族基团,例如苯基、萘基、四氢萘基、1,2,3,4-四氢化萘、二氢化茚、茚和联苯基。芳基可任选地被氨基、烷基、卤代、羟基、碳环、杂环或另一芳基取代。

[0052] 术语"环烷基"是指单环饱和的或部分饱和的碳环,其中环原子的数量通过数值范围表示。在示例性的实施方案中,"环烷基"是指上述定义的含有3-12个环原子的碳环(即C_{3-12}环烷基)。如本文使用的,环烷基包括单环、桥接、螺、稠合、二环和三环的环结构。环烷

基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基、环庚烯基、降冰片基、十氢化萘、金刚烷基和环辛基。环烷基可任选被氨基、烷基、卤代或羟基取代。

[0053] 术语"芳烷基"是指芳基-取代的烷基部分。优选的芳烷基是具有与1-6个碳原子的烷基连接的芳基的"低级芳烷基"。这样的基团的实例包括苄基、二苯甲基、三苯甲基、苯基乙基和二苯乙基。术语苄基和苯基甲基可互换使用。

[0054] 术语"芳基氧基"是指与氧原子连接的上文定义的芳基。芳基氧基可任选地被卤代、羟基或烷基取代。这样的基团的实例包括苯氧基、4-氯-3-乙基苯氧基、4-氯-3-甲基苯氧基、3-氯-4-乙基苯氧基、3,4-二氯苯氧基、4-甲基苯氧基、3-三氟甲氧基苯氧基、3-三氟甲基苯氧基、4-氟苯氧基、3,4-二甲基苯氧基、5-溴-2-氟苯氧基、4-溴-3-氟苯氧基、4-氟-3-甲基苯氧基、5,6,7,8-四氢萘基氧基、3-异丙基苯氧基、3-环丙基苯氧基、3-乙基苯氧基、4-叔丁基苯氧基、3-五氟乙基苯氧基和3-(1,1,2,2-四氟乙氧基)苯氧基。

[0055] 术语"烷氧基"是指被烷基或环烷基取代的含有氧基的基团。实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、叔丁氧基和环己基氧基。最优选具有1-6个碳原子的"低级烷氧基"。这样的基团的实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、异丙氧基和叔丁氧基。

[0056] 术语"芳烷氧基"是指通过氧原子与其它基团连接的含有氧基的芳烷基。"低级芳烷氧基"是与上文所述的低级烷氧基连接的那些苯基。这样的基团的实例包括苄基氧基、1-苯基乙氧基、3-三氟甲氧基苄基氧基、3-三氟甲基苄基氧基、3,5-二氟苄基氧基、3-溴苄基氧基、4-丙基苄基氧基、2-氟-3-三氟甲基苄基氧基和2-苯基乙氧基。

[0057] 术语"酰基"是指 -C(=O)R,其中该定义中使用的R是氢、烷基、烯基、炔基、碳环、杂环、芳基或芳烷基。最优选R是氢、烷基、芳基或芳烷基。

[0058] 术语"羧基"是指--R'C(=O)OR'',其中该定义中使用的R'和R''独立地是氢、烷基、烯基、炔基、碳环、杂环、杂环烷基、芳基、醚或芳烷基,或R'可另外是共价键。"羧基"包括羧酸和羧酸酯两者。术语"羧酸"是指其中R''是氢或盐的羧基。这样的酸包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、2-甲基丙酸、环氧乙烷-甲酸和环丙烷甲酸。术语"羧酸酯"或"酯"是指其中R''是烷基、烯基、炔基、碳环、杂环、芳基或芳烷基的羧基。羧酸的实例包括但不限于甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、环丙烷甲酸、环丁烷甲酸、环戊烷甲酸、环己烷甲酸、环庚烷甲酸、环辛烷甲酸或环壬烷甲酸。

[0059] 术语"羰基"是指是指C=O部分,亦称为"氧代"基团。

[0060] 术语"杂环"或"杂环基"或"杂环状环"是指具有3-12或5-6个碳原子的任选取代的、饱和的或非饱和的、芳族或非-芳族的环状烃,其中至少1个环原子是O、N、S、P或Se。例如在一些实施方案中,来自杂环基的环N原子是与-C(O) 形成酰胺、氨基甲酸酯或脲的成键原子。在示例性的实施方案中,"杂环基"是指含有4、5或6个环原子的上文描述的环状烃(即,C_{4-6} 杂环基)。杂环基的实例包括但不限于氮丙啶、环氧乙烷、硫杂环丙烷、氮杂环丁烷、环氧丙烷、硫杂环丁烷、吡咯烷、咪唑、四氢呋喃、吡喃、噻喃、硫代吗啉、硫代吗啉S-氧化物、噁唑啉、四氢噻吩、哌啶、四氢吡喃、硫杂环己烷(thiane)、咪唑烷、氧代二氧杂环戊烯基、噁唑烷、噻唑烷、二氧杂环戊烷、二硫杂环戊烷、哌嗪、噁嗪、二硫杂环己烷、二噁烷、吡啶基、呋喃基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、吡咯基、噻吩基、1,2,3-三唑基、1,2,4-三唑基、吲哚基、咪唑基、噻唑基、噻二唑基、嘧啶基、噁唑基、三嗪基和四唑基。示例性的杂环包括苯并咪唑、二

氢噻吩、二氧杂环己烯、二噁烷、二氧杂环戊烷、二硫杂环己烷、二噻嗪、二噻唑、二硫杂环戊烷、呋喃、吲哚、3-H吲唑、3-H-吲哚、吲嗪、异吲哚、异噻唑、异噁唑、吗啉、噁唑、噁二唑、噁噻唑、噁噻唑烷、噁嗪、噁二嗪、哌嗪、哌啶、嘌呤、吡喃、吡嗪、吡唑、吡啶、嘧啶、嘧啶、哒嗪、吡咯、吡咯烷、四氢呋喃、四嗪、噻二嗪、噻二唑、噻三唑、噻嗪、噻唑、噻吩、三嗪和三唑。杂环可任选被氨基、烷基、烯基、炔基、卤代、羟基、碳环、硫代、其它杂环或芳基取代。

[0061] 术语"杂芳基"是指环状烃，其中至少1个环原子是O、N、S、P或Se，所述环的特征为环成员中共享的离域[pi]电子(芳族性)，和其中环原子数通过数值范围指示。本文定义的杂芳基部分具有C、N、S、P或Se成键侧基(bonding hands)。例如在一些实施方案中，来自杂芳基的环N原子是与-C(O)形成酰胺、氨基甲酸酯或脲的成键原子。在示例性的实施方案中，"杂芳基"是指含有5或6个环原子的上文描述的环状烃(即C_{5-6} 杂芳基)。杂芳基的实例包括但不限于吡咯、呋喃、噻吩、噁唑、噻唑、异噁唑、异噻唑、咪唑、吡唑、噁二唑、噻二唑、三唑、四唑、吡啶、嘧啶、吡嗪、哒嗪和三嗪。

[0062] 术语"羟基"或"羟基"是指取代基-OH。

[0063] 术语"氧代"是指取代基=O。

[0064] 术语"硝基"是指NO_2。

[0065] 术语"叠氮基"是指N_3。

[0066] 术语"硫类似物"是指目的化合物的类似物，其中1个或多个硒原子分别被1个或多个硫原子替换。

[0067] 术语"硫烷基"是指 --SR'，其中该定义中使用的R'是氢、烷基、烯基、炔基、碳环、杂环、芳基或芳烷基。

[0068] 术语"亚氧硫基"是指 --SOR'，其中该定义中使用的R'是氢、烷基、烯基、炔基、碳环、杂环、芳基或芳烷基。

[0069] 术语"磺酰基"是指 --SOR'，其中R'是指氢、烷基、烯基、炔基、碳环、杂环、芳基或芳烷基。

[0070] 术语"酮"是指含有至少1个羰基的部分，其中羰基碳与两个其它碳原子结合。在示例性的实施方案中，"酮"是指含有3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子的上文描述的含有羰基的部分(即C_{3-10} 酮)。酮基团的实例包括但不限于丙酮、丁酮、戊酮、己酮、庚酮、辛酮、壬酮、癸酮、环丁酮、环戊酮、环己酮、环庚酮、环辛酮、环壬酮和环癸酮。

[0071] 术语"氨基"是指式--NR'R''的伯、仲或叔氨基，其中该定义中使用的R'和R''独立地是氢、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、芳基、羧基、环烷基、杂环或其它氨基(在酰肼的情况下)或R'和R''与它们所连接的氮原子一起形成具有4-8个原子的环。因此，术语"氨基"包括未取代的、单取代的(例如一烷基氨基或一芳基氨基)和二取代的(例如二烷基氨基或芳烷基氨基)氨基。氨基包括--NH_2、甲基氨基、乙基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、甲基-乙基氨基、吡咯烷-1-基或哌啶子基、吗啉代等。其它示例性的形成环的"氨基"包括吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吲嗪基、咪唑基、异吲哚基、吲哚基、吲唑基、嘌呤基、喹嗪基。含有氨基的环可任选被另一氨基、烷基、烯基、炔基、卤代或羟基取代。

[0072] 术语"胺"是指式--NR'R''的伯、仲或叔氨基，其中该定义中使用的R'和R''独立地是氢、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、芳基、羧基、环烷基、杂环或其它氨基(在酰肼的情况

下)或R'和R'' 与它们所连接的氮原子一起形成具有4-8个原子的环。因此,本文使用的术语"氨基"包括未取代的、单取代的(例如一烷基氨基或一芳基氨基)和二取代的(例如二烷基氨基或芳烷基氨基)氨基。氨基包括--NH_2、甲基氨基、乙基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、甲基-乙基氨基、吡咯烷-1-基或哌啶子基、吗啉代等。其它示例性的形成环的"氨基"包括吡咯基、咪唑基、吡唑基、异噻唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吲嗪基、咪唑基、异吲哚基、吲哚基、吲唑基、嘌呤基、喹嗪基。含有氨基的环可任选被另一氨基、烷基、烯基、炔基、卤代或羟基取代。

[0073] 术语"醇"是指"羟基"或"羟基"是指取代基 -OH。

[0074] 术语"氨基醇"是指含有醇和胺基团两者的官能团。如本文使用的,"氨基醇"还指具有替换羧酸基团的与醇结合的碳的上文定义的氨基酸。在示例性的实施方案中,术语"氨基醇"是指其中胺与邻接带有醇的碳的碳结合的上文定义的氨基醇。在示例性的实施方案中,"氨基醇"是指含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子的上文定义的含有胺和醇的部分(即,C_{1-12} 氨基醇)。氨基醇的实例包括但不限于乙醇胺、庚胺醇、乙基异丙肾上腺素、去甲肾上腺素、丙醇胺、鞘氨醇、甲醇胺、2-氨基-4-巯基丁-1-醇、2-氨基-4-(甲基硫代)丁-1-醇、半胱氨醇、苯基甘氨醇、脯氨醇、2-氨基-3 -苯基- 1-丙醇、2-氨基-1-丙醇、环己基甘氨醇、4-羟基-脯氨醇、亮氨醇、叔-亮氨醇、苯基丙氨醇、a-苯基甘氨醇、2-吡咯烷甲醇、酪氨醇、缬氨醇、丝氨醇、2-二甲基氨基乙醇、组氨醇、异亮氨醇、亮氨醇、甲硫氨醇、1-甲基-2-吡咯烷甲醇、苏氨醇、色氨醇、丙氨醇、精氨醇、甘氨醇、谷氨醇、4-氨基-5-羟基戊酰胺、4-氨基-5-羟基戊酸、3-氨基-4-羟基丁酸、赖氨醇、3-氨基-4-羟基丁酰胺和4-羟基-脯氨醇。

[0075] 术语"氨基酸"是指含有羧酸和与紧接羧酸基团的碳原子结合的胺的基团,包括天然和合成的氨基酸两者。氨基酸的实例包括但不限于精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、硒代半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸。羧基被H、盐、酯、烷基或芳烷基取代。氨基被H、酰基、烷基、烯基、炔基、羧基、环烷基、芳烷基或杂环基取代。

[0076] 术语"醚"是指基团--R'--O--R'',其中该定义中使用的R'和R''独立地是氢、烷基、烯基、炔基、碳环、杂环、芳基或芳烷基,和R'可另外是与碳连接的共价键。

[0077] 术语"卤素"是指氟、氯、溴或碘原子。

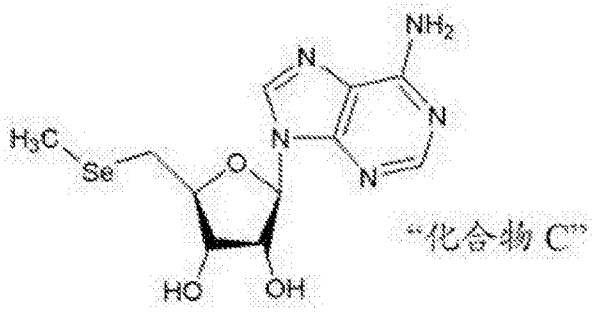
[0078] 术语"卤化物"是指含有与氟、氯、溴或碘原子键合的原子的官能团。本文公开的示例性的实施方案可包括"烷基卤化物"、"烯基卤化物"、"炔基卤化物"、"环烷基卤化物"、"杂环基卤化物"或"杂芳基卤化物"基团。在示例性的实施方案中,"烷基卤化物"是指含有碳-卤素键的部分,其含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子(即,C_{1-10} 烷基卤化物)。烷基卤化物基团的实例包括但不限于氟甲基、氟乙基、氯甲基、氯乙基、溴甲基、溴乙基、碘甲基和碘乙基。除非另外说明,本文涉及的任何含碳基团可包含1个或多个碳-卤素键。通过非限制性实例的方式,Ci烷基可以是但不限于甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、溴甲基、二溴甲基、三溴甲基、碘甲基、二碘甲基、三碘甲基、氯氟甲基、二氯氟甲基和二氟氯甲基。

[0079] 在本文所述的化合物中,杂原子能够带有多个不同的原子价。通过非限制性实例的方式,S、Se和N可以是中性的或带有正电荷,和O可以是中性的或带有正电荷或负电荷。

[0080] 在一些实施方案中,式(I)、(II)或(III)的化合物包括所示化合物的非对映体和

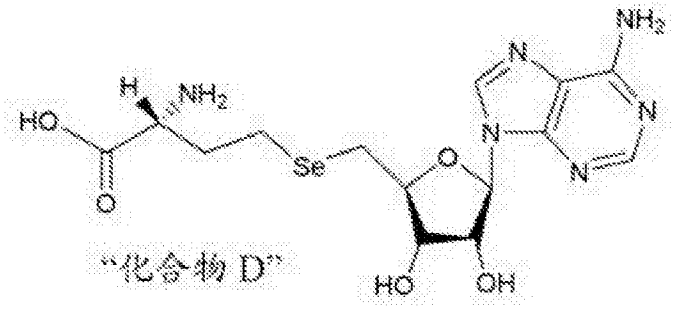
对映体。对映体定义为彼此成镜像和不重叠的一对分子实体之一。非对映体或非对映异构体定义为并非对映体的立体异构体。非对映体或非对映异构体是不作为镜像相关的立体异构体。非对映异构体通过物理性质的差异来表征。

[0081] 本文所示的术语“化合物C”或“化合物C”是指5’-甲基硒代腺苷;亦称为(2R,4S,5S)-2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-5-((甲基硒烷基)甲基)四氢呋喃-3,4-二醇,CAS登记号5135-40-0,和包括其任何药学上可接受的盐。



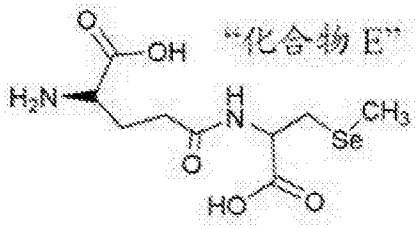
“化合物 C”

[0082] 本文所示的术语“化合物D”或“化合物D”是指5’-硒代腺苷高半胱氨酸;(2R)-2-氨基-4-((((2S,3S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基)硒烷基)丁酸,CAS登记号4053-91-2和包括其任何药学上可接受的盐。



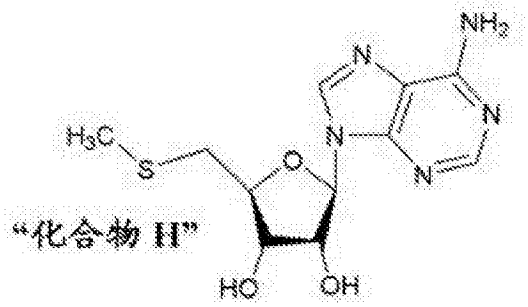
“化合物 D”

[0083] 本文所示的术语“化合物E”或“化合物E”是指γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或γ-L-谷氨酰基-Se-甲基-L-半胱氨酸;亦称为N5-(1-羧基-2-(甲基硒烷基)乙基)-L-谷氨酰胺或其任何药学上可接受的盐。



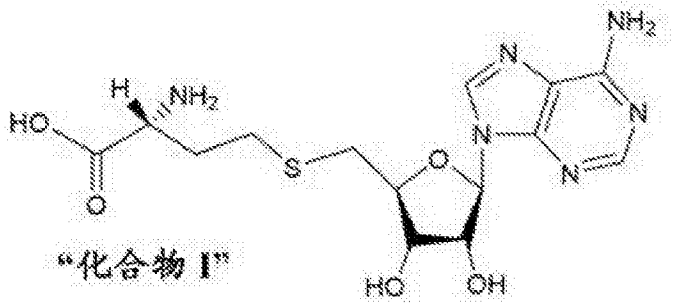
“化合物 E”

[0084] 本文所示的术语“化合物H”或“化合物H”是指5’-甲基硫代腺苷;5’-S-甲基-5’-硫代腺苷,CAS登记号2457-80-9或其药学上可接受的盐。



“化合物 H”

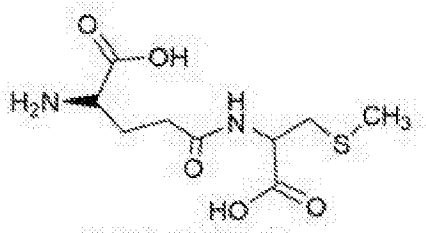
[0085] 术语“化合物I”或“化合物I”是指S-腺苷-L-高半胱氨酸，亦称为(S)-5’-(S)-(3-氨基-3-羧基丙基)-5’-硫代腺苷，CAS登记号979-92-0或其药学上可接受的盐。



“化合物 I”

[0086] 本文所示的术语“化合物J”或“化合物J”是指γ-L-谷氨酰基-甲基-L-半胱氨酸，亦称为γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸或其药学上可接受的盐。

[0087]



“化合物 J”

术语“化合物CDE”是指化合物C、化合物D和化合物E或其药学上可接受的盐的混合物。

[0088] 术语“化合物HIJ”是指化合物H、化合物I和化合物J或其药学上可接受的盐的混合物。

[0089] 术语"类似物"和"衍生物"可互换使用，并且是指给定分子的至少1个位置的天然或非天然的修饰。例如，给定化合物或分子的衍生物通过添加官能团或原子、除去官能团或原子或改变官能团或原子为不同的官能团或原子(包括但不限于同位素)而被修饰。

[0090] 术语“包含”是指包括和不排除其它要素或方法步骤的组合物、化合物、制剂或方法。

[0091] 术语“由……组成”是指排除任何其它组分或方法步骤的存在的化合物、组合物、制剂或方法。

[0092] 术语“基本上由……组成”是指包括另外的要素或方法步骤的组合物、化合物、制剂或方法，所述另外的要素或方法步骤在实质上不影响组合物、化合物、制剂或方法的特征。

[0093] 术语"化合物"是指任何一种或多种化学实体、药剂、药物等，其可用于治疗或预防身体机能的疾病、生病、不适或病症。化合物包含已知和潜在的治疗性化合物两者。可通过

使用本申请的筛选方法进行筛选确定化合物为治疗性的。"已知的治疗性化合物"是指已经表明(例如通过动物试验或给予至人的在先实验)在所述治疗中有效的治疗性化合物。换句话说,已知的治疗性化合物不限于在治疗疾病(例如神经变性疾病)中有效的化合物。

[0094] 术语"组合物"是指一种或多种化合物与或不与另一种试剂,例如但不限于载体试剂的组合(例如一种或多种含硒化合物与惰性或活性的载体,使得组合物特别适合于体外、体内或离体诊断或治疗用途)。

[0095] 术语"组分"是指化合物或组合物的组成部分。例如,组合物的组分可包括化合物、载体和组合物中存在的任何其它试剂。

[0096] 术语"有效量"是指足以实现有益或所需结果的组合物或化合物的量。有效量可在一次或多次施用或剂量中给予,和不意欲限制于具体制剂或给药途径。

[0097] 术语"水合物"是指以分子形式与水缔合的本文公开的化合物,即,其中H- OH键未断裂,并且可表示为例如式R x H_2O,其中R是本文公开的化合物。给定的化合物可形成超过一种水合物,包括例如一水合物(R x H_2O)、二水合物(R$_2$ x H_2O)、三水合物(R$_3$ x H_2O)等。

[0098] 术语"抑制性"或"拮抗性"是指降低、限制或阻断另一化合物的作用或功能的化合物的性质。

[0099] 术语"分离的"是指混合物中一种材料与至少一种其它材料分离,或与天然伴随该材料的材料分离。例如,合成的化合物与原料或中间体分离。

[0100] 术语"线粒体电位"是指跨越线粒体内膜的电压差,其通过跨膜的净正电荷移动来维持。

[0101] 术语"调节"是指化合物自己知或确定状态的状态(例如,活性或量)变化。

[0102] "任选的"或"任选地"是指其中其后描述的事件或情况可能发生或可能不发生的情况,和该描述包括其中所述事件或情况发生的例子和其中所述事件或情况不发生的例子。"任选地"包括其中所述条件存在的实施方案和其中所述条件不存在的实施方案。例如,"任选取代的苯基"意指苯基可以被取代,或可以不被取代,和该描述包括未取代的苯基和其中存在取代的苯基两者。"任选地"包括其中所述条件存在的实施方案和其中所述条件不存在的实施方案。

[0103] 术语"有机硒"或"硒有机化合物"是指其中硒替换硫的任何有机化合物。因此,有机硒可指通过酵母生物合成的任何这样的化合物,或其可指化学合成的游离的有机硒化合物。后者的实例是游离的硒代甲硫氨酸。在一些情况下,硒有机化合物还包括硒代谢物。

[0104] 术语"患者"或"受试者"可互换使用和是指动物界的任何成员。优选受试者是哺乳动物,例如人、家养哺乳动物或家畜哺乳动物。

[0105] 短语"药学上可接受的"是指在合理的医学判断范围内适合用于与人和动物的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症、与合理的收益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0106] 短语"药学上可接受的载体"是指药学上可接受的材料、组合物或溶媒,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包胶材料,其参与从身体的一个器官或部分携带或运输所述包含硒的化合物或类似物或衍生物至身体的另一个器官或部分。在与制剂的其它成分相容和对患者无害的意义上,各种载体必须是"可接受的"。可用作药学上可接受载体的材料的一些实例包括:(1) 糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2) 淀粉,例如玉米淀粉和马铃

薯淀粉；(3) 纤维素和其衍生物，例如羧基甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4) 西黄蓍胶粉；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石粉；(8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格溶液；(19) 乙醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；和(21) 药物制剂中使用的其它无毒相容物质。

[0107] 术语“前药”是指通过代谢转化转变成药理学活性剂的药理学活性或更通常是无活性化合物。任何上式的化合物的前药通过修饰任何上式化合物中存在的官能团制备，其方式为所述修饰可在体内裂解以释放母体化合物。在体内，前药容易地在生理条件下经历化学变化(例如水解或受到天然存在的酶作用)，导致释放药理学活性剂。前药包括任何上式的化合物，其中羟基、氨基或羧基与可在体内裂解以分别再生游离羟基、氨基或羧基的任何基团键合。前药的实例包括但不限于任何上式化合物的酯(例如乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物)或在处于生理pH或通过酶作用时转变成活性母体药物的任何其它衍生物。在本领域中描述了用于选择和制备合适的前药衍生物的常规程序(见例如Bundgaard. Design of Prodrugs. Elsevier,1985)。

[0108] 术语"纯化的"或"纯化"或“基本上纯化的”是指从组合物除去组分例如无活性、抑制性组分、未反应化合物或在合成中产生的代替化合物(例如污染物)至组合物的10%或更少(例如10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少)不是活性化合物或药学上可接受的载体的程度。

[0109] 术语“盐”可包括酸加成盐或游离碱的加成盐。优选盐是药学上可接受的。可用于形成药学上可接受的酸加成盐的酸的实例包括但不限于源自无毒无机酸例如硝酸、磷酸、硫酸或氢溴酸、氢碘酸、氢氟酸、亚磷酸的盐，以及源自无毒有机酸例如脂肪族一和二羧酸、苯基-取代的链烷酸、羟基链烷酸、链烷二酸、芳族酸、脂肪族和芳族磺酸和乙酸、马来酸、琥珀酸或柠檬酸的盐。这样的盐的非限制性实例包括萘二磺酸盐、苯磺酸盐、硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、硝酸盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乙酸盐、三氟乙酸盐、丙酸盐、辛酸盐、异丁酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、苯基乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐等。还预期氨基酸的盐例如精氨酸盐等和葡萄糖酸盐、半乳糖醛酸盐(见例如Berge,等“Pharmaceutical Salts,” *J. Pharma. Sci.* 1977;66:1)。

[0110] 术语"药学上可接受的盐"包括但不限于本领域技术人员众所周知的盐，例如本发明的化合物的一盐(例如，碱金属和铵盐)和多盐(例如，二-或三-盐)。本公开内容的化合物的药学上可接受的盐是其中例如，可交换基团例如--OH、--NH--或--P(=O)(OH)—中的氢被替换为药学上可接受的阳离子(例如，钠、钾或铵离子)，和可从本文公开的相应的化合物通过例如与合适的碱反应合适地制备。在化合物是足够碱性或酸性以形成稳定的无毒酸或碱盐的情况下，化合物作为盐给予可能是合适的。药学上可接受的盐的实例是与形成生理学可接受的阴离子的酸形成的有机酸加成盐，例如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、

丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、α-酮戊二酸盐和α-甘油磷酸盐。也可形成合适的无机盐，包括盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐。药学上可接受的盐可使用本领域众所周知的标准程序获得，例如通过使足够碱性的化合物例如胺与提供生理上可接受的阴离子的合适酸反应。也可制备羧酸的碱金属(例如钠、钾或锂)或碱土金属(例如钙)盐。

[0111] 术语"富硒酵母"和"硒化酵母"是指在含有无机硒盐的培养基中培养的任何酵母(例如酿酒酵母)。本申请不受限于使用的硒盐。事实上，预期各种硒盐可用于本申请，包括但不限于亚硒酸钠、硒酸钠、亚硒酸钴或硒酸钴。这样的酵母制备物中的含硒化合物是硒代甲硫氨酸，其以掺入至多肽/蛋白的形式存在。在这样的制备物中以硒代甲硫氨酸的形式存在的总细胞硒的量将不同，但可在10和100%之间、20-60%、50-75%和在60和75%之间。硒化酵母制备物中剩余部分的有机硒主要由硒代甲硫氨酸生物合成途径中的中间体构成。这些包括但不限于硒代半胱氨酸、硒代胱硫醚、硒代高半胱氨酸和硒代腺苷硒代甲硫氨酸。最终产物中残余的无机硒盐的量通常非常低(例如< 2%)。

[0112] 关于部分(moiety)的术语"取代的"是指另外的取代基，其与所述部分在所述部分的任何可接受的位置上连接。除非另外说明，部分可通过碳、氮、氧、硫或任何其它可接受的原子键合。取代基的实例包括但不限于胺、醇、硫醇、醚、烯、炔、环氧化物、氮丙啶、环氧乙烷、氮杂环丁烷、二氢呋喃、吡咯烷、吡喃、哌啶、醛、酮、酯、羧酸、羧酸酯、亚胺、酰亚胺、叠氮化物、偶氮基、烯胺、烷基卤化物、烯基卤化物、炔基卤化物、芳基卤化物、膦、氧化膦、次膦酸酯、亚膦酸酯、亚磷酸酯、膦酸酯、磷酸酯、硫酸酯、硫氧化物、磺酰基、次硫酰基(sulfoxyl)、磺酸酯、硝酸酯、亚硝酸酯、腈、硝基、亚硝基、氰酸酯、硫代氰酸酯、异硫代氰酸酯、碳酸酯、酰基卤化物、过氧化物、氢过氧化物、半缩醛、半缩酮、缩醛、缩酮、原酸酯、原碳酸酯、硫化物、二硫化物、磺酸、磺酸、硫酮、硫醛、磷酸二酯、硼酸、硼酸酯、硼酸和硼酸酯。

[0113] 术语“治疗(treating, treat或treatment)”是指治疗性处理，其中目的是减慢(例如减轻或延迟发生)不需要的生理学病况、病症或疾病，或获得有益或需要的结果，例如已经或将变得异常的参数、值、功能或结果的下降的部分或全部恢复或抑制。有益或需要的结果包括但不限于症状减轻；病况、病症或疾病的发展的程度或活力或速率的降低；病况、病症或疾病的状态的稳定(即，不恶化)；病况、病症或疾病的发作延迟或进展减慢；病况、病症或疾病状态的改善；和实际临床症状的减轻(无论部分或全部) (无论其是否转变为实际临床症状的直接减轻)或病况、病症或疾病的提高或改善。

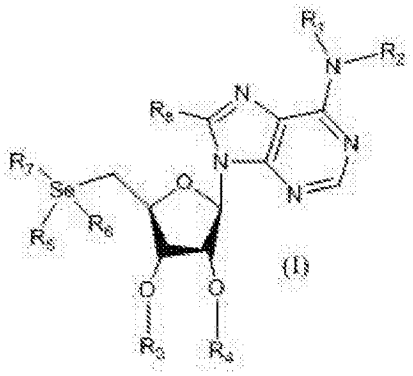
[0114] 术语"能够特异性检测基因表达的试剂"是指能够或足以检测本文详细描述的各种基因的表达的试剂。合适试剂的实例包括但不限于能够与mRNA或cDNA特异性杂交的核酸探针，和抗体(例如单克隆或多克隆抗体)。

[0115] 术语"毒性的"是指与给予毒性剂之前的相同细胞或组织相比，对受试者、细胞或组织的任何有损或有害作用。

[0116] 化合物和组合物

本申请的一个方面涉及5'-甲基硒代腺苷(“化合物C”)、Se-腺苷-L-高半胱氨酸(“化合物D”)、γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸(“化合物E”)和其类似物。一些实施方案包括包含式I、式II和/或式III的化合物和其组合的组合物。

[0117] 在一些实施方案中，提供包含式(I)化合物：



或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，

其中R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_4是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_7是H、烷基、烯基、炔基、酮、氨基醇、氨基酸、OR'、Se-R'、S-R'，其中R'选自H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；和

R_8是氢、叠氮基、烷基、烯基、炔基。

[0118] 在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化这些式(I)化合物中的一个或多个。

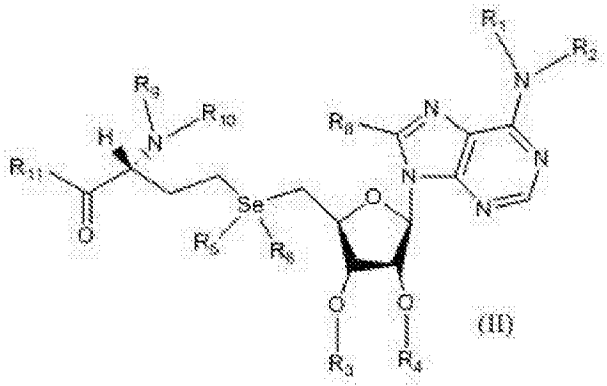
[0119] 在一些实施方案中，提供包含式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中R_1、R_3、R_4和R_8各自为H；R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'或C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；R_5和R_6各自不存在；和R_7是烷基或氨基酸。

[0120] 在一些实施方案中，提供包含式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中R_1、R_3、R_4和R_8各自是H；R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；R_5和R_6 各自不存在；和R_7是烷基或氨基酸；条件是5'-硒代腺苷甲硫氨酸、脱羟基5'-甲基硒代腺苷、乙基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸、硒代羟基腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷、硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、腺苷-羟基硒亚砜和硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜可各自从组合物中排除。

[0121] 在特定的方面，提供包含式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，所述化合物是5'-甲基硒代腺苷(“化合物C”)。

[0122] 在一些实施方案中，组合物包含式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药，条件是5'-硒代腺苷甲硫氨酸、脱羟基5'-甲基硒代腺苷、乙基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸、硒代羟基腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷、硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、腺苷-羟基硒亚砜和硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜可各自从组合物中排除。

[0123] 在一些实施方案中，提供包含式(II)化合物的组合物：



(II)

或其药学上可接受的盐、水合物或前药，

其中R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_4是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_8是氢、叠氮基、烷基、烯基、炔基；

R_9是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_9与R_{10}一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_{10}是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_9与R_{10}一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；和

R_{11}是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐。

[0124] 在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化这些式(II)化合物中的一个或多个。

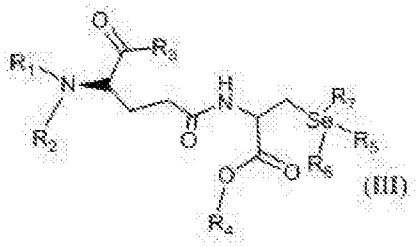
[0125] 在一些实施方案中，提供包含式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中R_1、R_3、R_4、R_8和R_9各自是H；R_2是H、酰基、烷基、羧基、C(O)R'或C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；R_5和R_6不存在；R_{10}是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；和R_{11}是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐。

[0126] 在一些实施方案中，提供包含式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、R_{10}如上文所定义和其中R_{11}是OH或OR，其中R选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基。

[0127] 在特定的方面，提供包含式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，所述化合物是5'-硒代腺苷高半胱氨酸(化合物"D")或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0128] 在一些实施方案中，组合物包含式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药；条件是5'-硒代腺苷甲硫氨酸、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸和硒代羟基腺苷高半胱氨酸可各自从组合物中排除。

[0129] 在一些实施方案中，提供包含式(III)化合物：



(III)

或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中

R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐；

R_4是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；和

R_7是H、烷基、烯基、炔基、酮、OR'、Se-R'、S-R'，其中R'选自H、烷基、环烷基、芳基、芳烷

基或杂环基。

[0130] 在一些实施方案中，提供包含式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中

R_1和R_2各自是H；

R_3是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐；

R_4是H或药学上可接受的盐或内盐；

R_5和R_6不存在；和

R_7是烷基、烯基或炔基。

[0131] 在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化这些式(III)化合物中的一个或多个。

[0132] 在一些实施方案中，提供包含式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中R_1和R_2各自是H；R_3是OH或OR，其中R选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基；R_4是H；R_5和R_6各自不存在；和R_7是烷基，其是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。

[0133] 在一些实施方案中，提供包含式III化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，其中R_1和R_2各自是H；R_3是OH或OR，其中R选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基；R_4是H；R_5和R_6 不存在；和R_7是甲基。

[0134] 在特定的方面，提供包含式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药的组合物，所述化合物是γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸(“化合物E”)或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0135] 在一些实施方案中，组合物包含式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药，条件是γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸- γ -谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸，γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸和硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸可各自从组合物中排除。

[0136] 在一些实施方案中，提供包含根据式(I)、(II)和/或(III)的一个或多个的一种或多种化合物的组合物，其中以下化合物的每一个从组合物中排除以使硒毒性最小、除去无活性或抑制性化合物、和/或使组合物的治疗指数最大，其中所排除的化合物是γ -谷氨酰基硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ -谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ -谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ -谷氨酰基硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ -谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸、脱羟基5'-甲基硒代腺苷、乙基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸、硒代羟基腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷、硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、腺苷-羟基硒亚砜和硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜。

[0137] 在实施方案中，本文所述的任何化合物可用前药修饰以延长半寿期，保护化合物免于氧化，使化合物靶向组织，和/或允许化合物通过血脑屏障。

[0138] 在实施方案中，前药包含硒代糖苷。糖苷包括单糖、二糖和寡糖。糖可包括核糖、葡萄糖、半乳糖或甘露糖。例如与硒部分缀合的半乳糖可使化合物靶向肝。

[0139] 在其它实施方案中，前药包含selenazolidine。这些化合物提供化合物的缓慢释放。

[0140] 在仍其它的实施方案中，前药包含本文所述的硒有机化合物与维生素例如C或E的缀合。这些前药缀合物具有改进的保护作用。

[0141] 在仍其它的实施方案中，前药是细胞色素P450活化的前药。例如，环状的磷酸酯或膦酸酯。具体而言，核苷被这些分子修饰，和提供分子靶向至肝。示例性的前药包括HepDirect前药。细胞色素P450活化的前药的其它实施方案改进生物利用度和描述于Huttunen等Current Medicinal Chemistry 2008 15:2346。

[0142] 在实施方案中，式(I)、式(II)、式(III)化合物中的任一个可被修饰以减少硒的氧化。在实施方案中，化合物可通过硒原子之间的连键形成二聚体。

[0143] 在实施方案中，式(I)、式(II)、式(III)化合物中的任一个可通过连接组织靶向剂或用于增加化合物的半寿期的其它试剂而被修饰。在实施方案中，组织靶向剂包括特异性结合组织特异性抗原的抗体、转铁蛋白受体或如本文所述的前药。

[0144] 在其它实施方案中，化合物可连接聚合物载体或纳米粒载体或与其组合，以递送组合物至脑和提供其它组织靶向。这样的聚合物载体包括但不限于聚乙二醇、聚丙交酯、聚乙交酯、聚原酸酯、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。微球和脂质体包括聚二乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)微球。其它纳米粒包括磷脂、壳聚糖、乳酸和葡聚糖。

[0145] 脂质前药也可适用于本发明的化合物。通过非限制性实例，某些脂质前药描述于Hostetler等(1997 Biochem. Pharm. 53:1815-1822)和Hostetler等1996 Antiviral Research 31:59-67)，这两者通过引用以其整体结合到本文中。合适的前药技术的其它实例描述于WO 90/00555; WO 96/39831; WO 03/095665A2; 美国专利号5,411,947; 5,463,092; 6,312,662; 6,716,825;和美国专利申请公开号2003/0229225和2003/0225277，其各自通过引用以其整体结合到本文中。这样的前药也可具有使药物化合物靶向患者内的特定组织例如肝的能力，如描述于Erion等(2004 J. Am. Chem. Soc. 126:5154-5163; Erion等Am. Soc. Pharm. & Exper. Ther. DOI:10.1124/jept.104.75903 (2004); WO 01/18013 A1; 美国专利号6,752,981)，其各自通过引用以其整体结合到本文中。通过非限制性实例的方式，适合用于本发明的化合物的其它前药描述于WO 03/090690; 美国专利号6,903,081; 美国专利申请号2005/0171060A1; 美国专利申请号2002/0004594A1;和Harris等(2002 Antiviral Chem & Chemo. 12: 293-300; Knaggs等2000 Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 2075-2078)，其各自通过引用以其整体结合到本文中。

[0146] 在一些实施方案中，提供包含各自根据式(I)的一种或多种化合物的组合物。在一些方面，包含各自根据式(I)的一种或多种化合物的组合物包含5'-甲基硒代腺苷或其药学上可接受的盐、水合物或前药;和5'-硒代腺苷高半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0147] 在一些实施方案中，提供包含各自根据式(I)和式(III)的一种或多种化合物的组合物。在一些方面，包含各自根据式(I)和式(III)的一种或多种化合物的组合物包含5'-甲基硒代腺苷或其药学上可接受的盐、水合物或前药;5'-硒代腺苷高半胱氨酸或其药学上可

接受的盐、水合物或前药；和γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0148] 在一些实施方案中，包含各自根据式(I)和式(III)的一种或多种化合物的组合物包含5'-甲基硒代腺苷或其药学上可接受的盐、水合物或前药；和γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0149] 在一些实施方案中，提供包含各自根据式(II)和式(III)的一种或多种化合物的组合物。在一些方面，包含各自根据式(II)和式(III)的一种或多种化合物的组合物包含5'-硒代腺苷高半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药；和γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0150] 根据另一方面，本发明提供药物组合物，其包含治疗有效量的一种或多种本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯或前药，以及药学上可接受的稀释剂或载体。

[0151] 药学上可接受的载体包括：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素和其衍生物，例如羧基甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4) 西黄蓍胶粉；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石粉；(8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格溶液；(19) 乙醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；和(21) 药物制剂中使用的其它无毒相容物质。

[0152] 组合物可配制用于任何给药途径，具体而言用于口服、直肠、经皮、皮下、静脉内、肌内或鼻内给药。组合物可以任何常规形式配制，例如作为片剂、胶囊剂、锭剂、溶液、混悬剂、分散剂、糖浆剂、喷雾剂、凝胶、栓剂、贴剂和乳剂。

[0153] 如医学领域众所周知的，对任何一个受试者的剂量可取决于许多因素，包括患者的大小、体表面积、年龄、待给予的特定化合物、性别、给药次数和途径、一般健康和与同时给予的其它药物的相互作用。根据通过治疗所寻求的欲改变的靶标，药物组合物可配制和系统或局部给予。用于制剂和给药的技术可见于最新版本的"Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co,Easton Pa.)。合适的途径可例如包括口服或经粘膜给药；以及胃肠外递送，包括肌内、皮下、髓内、鞘内、心室内、静脉内、腹膜内或鼻内给药。

[0154] 适用于本申请的药物组合物包括这样的组合物，其中活性成分(例如5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合)以有效实现预期目的的量包含在内。例如，在优选的实施方案中，有效量的药物组合物包含一定量的选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内，尤其是根据本文提供的公开内容。

[0155] 包含2%或更少无机硒的硒化酵母通常包含许多含硒组分。硒化酵母的典型水提取物的主要的硒组分是硒代蛋白和硒代甲硫氨酸。已经鉴定、分离和纯化了具有小于1000千道尔顿("Kda")的分子量的其它小分子量组分。硒化酵母或其水提取物中存在的一些组分

和化合物当自这样的硒化酵母分离时，具有较不需要的生物活性或甚至对线粒体功能具有抑制性生物活性。化合物例如谷氨酰基硒代半胱氨酸和含硫化合物例如5'-甲基硫代腺苷、S-腺苷-L-高半胱氨酸和γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸是无活性的，或在一些情况下是抑制性的，如本文所述和显示的。

[0156] 一些含硒化合物已经合成制备，纯化和在生物活性测定法中筛选。筛选的浓度范围包括约15-约500 ppb。对于本文所述的组合物甚至可在15 ppb时检出生物活性。在实施方案中，生物活性测定法是线粒体电位测定法。当获自硒化酵母时，并非所述酵母或其水提取物中存在的所有的组分和化合物具有生物活性，并且一些组分和化合物抑制需要的生物活性。

[0157] 在实施方案中，合成产生的含硒化合物以不同于水提取物中存在的比率在组合物中配制。例如，典型的水提取物具有7:1比率的γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸与5'-甲基硒代腺苷或Se-腺苷-L-高半胱氨酸。在实施方案中，含有合成产生的化合物的组合物可包含相等量的各含硒化合物，例如比率至少1:1:1的γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸与5'-甲基硒代腺苷与Se-腺苷-L-高半胱氨酸。在其它实施方案中，组合物可包含比率为5:1至1:1的至少2种组分。

[0158] 包含一种或多种化合物(包括5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合)的组合物，可在药学上可接受的载体例如生理盐水中经静脉内给予受试者(例如患者)。可使用胞内递送化合物的标准方法(例如通过脂质体递送)。这样的方法是本领域普通技术人员众所周知的。

[0159] 包含硒的组合物可用于静脉内给药以及胃肠外给药，例如静脉内、皮下、肌内和腹膜内。对于注射，本申请的包含硒的组合物(例如药物组合物)可在水溶液中配制，优选在生理学相容的缓冲液中例如Hanks溶液、林格溶液或生理缓冲盐水。对于组织或细胞给药，可在制剂中使用适合于待渗透的特定屏障的渗透剂。这样的渗透剂通常是本领域已知的。

[0160] 包含5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的组合物可添加至营养饮料或食物(例如ENSURE、POWERBAR等)、多重维生素、营养产品、食品等中，用于每日消耗。

[0161] 在其它实施方案中，本申请的组合物可使用本领域众所周知的药学上可接受的载体，以适合于口服给药的剂量配制。这样的载体使药物组合物能够配制为片剂、丸剂、胶囊剂、液体、凝胶、糖浆剂、膏剂、混悬剂等，用于由待治疗的患者口服或经鼻摄取。

[0162] 在本申请的一些实施方案中，包含硒的组合物和/或制剂可单独或与其它形式的硒、药物、小分子组合或在其中它与赋形剂或其它药学上可接受的载体混合的药物组合物中给予受试者。在实施方案中，组合物可包括一种或多种氨基酸或硒代氨基酸，例如甲硫氨酸、半胱氨酸或硒代半胱氨酸，以使毒性最小。在本申请的一个实施方案中，药学上可接受的载体是药学上惰性的。在本申请的另一实施方案中，包含硒的组合物可单独给予至易患、有风险发生或患有与线粒体功能障碍有关的疾病或病况的个体。

[0163] 使用化合物和组合物的方法

如本文所述，化合物和其组合可以组织特异性和组织合适性的方式用于增强线粒体功能、治疗线粒体功能障碍、治疗阿尔茨海默病和调节葡萄糖代谢。

[0164] A. 线粒体功能和功能障碍

线粒体是高等生物的细胞中的主要能量产生细胞器。线粒体对各种细胞呼吸、氧化和代谢过程提供直接和间接的生物化学调节。这些包括电子传递链(ETC)活性，其驱动氧化磷酸化以产生腺苷三磷酸(ATP)形式的代谢能量，和其还是胞内钙稳态中重要的线粒体功能的基础..

[0165] 除了它们在成长的细胞的能量产生中的作用以外，线粒体(或者至少线粒体组分)参与程序化细胞死亡(PCD)，亦称为细胞凋亡(参见例如，Newmeyer等Cell 1994，79:353-364; Liu等Cell 1996，86:147-157)。细胞凋亡是神经系统的正常发育和免疫系统正确发挥功能所必需的。此外，一些疾病状态被认为与不足或过度的细胞凋亡水平有关(例如癌症和自身免疫疾病，和在后一情况下分别为中风损害和阿尔茨海默病中的神经变性)。已经证明了线粒体在细胞凋亡中的作用(参见例如，Green和Reed，Science，1998，281:1309-1312; Green，Cell，1998，94:695-698;和Kromer，Nature Medicine，1997，3:614-620)。

[0166] 线粒体相关的疾病(例如由线粒体功能障碍引起)也可与通过并非自由基氧化的机制导致的线粒体膜电化学电位的损失有关，和渗透性转变可由于线粒体基因、基因产物或相关的下游介质分子和/或线粒体外基因、基因产物或相关的下游介质的直接或间接影响，或其它已知或未知的原因导致。因此，线粒体电位的损失可能是在与线粒体功能改变有关的疾病的进展中的重要的事件，所述疾病包括变性疾病以及与衰老有关的疾病/病况(例如癌症、心血管疾病和心力衰竭、2型糖尿病、阿尔茨海默病和帕金森病、脂肪肝病、白内障、骨质疏松、肌肉萎缩、睡眠障碍和炎性疾病例如银屑病、关节炎和结肠炎)。如本文所述的方法可用于增强线粒体功能，无论在受试者中的细胞是否处于应激或疾病情况下。

[0167] 本文公开的化合物和组合物关于它们对线粒体功能的影响，显示组织特异性。

[0168] 实施方案包括在一种或多种肾细胞中增强线粒体功能的方法或用途，包括：给予有效量的组合物至细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式I的化合物和其混合物的化合物，其中与未用组合物处理的细胞相比，所述有效量增强线粒体功能。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0169] 在实施方案中，组合物可排除Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、谷氨酰基硒代半胱氨酸、式III的化合物、5'-甲基硫代腺苷或S-腺苷-L-高半胱氨酸中的一种或多种。

[0170] 在实施方案中，本申请提供包含选自5'-甲基硒代腺苷、式I的化合物和其混合物的化合物的组合物的用途，其中所述有效量在肾细胞中增强线粒体功能。

[0171] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷和/或式I的化合物的化合物。在实施方案中，用于在肾细胞中增强线粒体功能的组合物可不包括Se-腺苷-L-高半胱氨酸、甲基硫代腺苷或S-腺苷-L-高半胱氨酸中的一种或多种。

[0172] 本申请的实施方案包括在一种或多种细胞中增强线粒体功能的方法或用途，所述细胞选自骨骼肌细胞、神经元细胞和其组合，所述方法包括：给予有效量的组合物至细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量增强线粒体功能。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0173] 在实施方案中，本申请提供包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物的组合物的用途，其中所述有效量在一种或多种细胞中增强线粒体功能，所述细胞选自骨骼肌细胞、神经元细胞和其组合。

[0174] 在实施方案中，组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物和其组合的化合物。在实施方案中，用于在肌细胞中增强线粒体功能的组合物可不包括甲基硫代腺苷或S-腺苷-L-高半胱氨酸中的一种或多种。尽管不意欲限制本申请的范围，甲基硫代腺苷或S-腺苷-L-高半胱氨酸显示在骨骼肌细胞中对线粒体功能的毒性作用。

[0175] 在常用的硒补充剂(例如富硒酵母)中某些含硫分子的存在，在一些情况下可抑制线粒体活性和随时间导致前-糖尿病状态。文献中充分证明了成年发作型糖尿病与在数年的时间中线粒体活性的逐渐降低有关。这在骨骼肌的情况下是特别重要的，估计骨骼肌使用75-80%的每日摄取的葡萄糖。甚至肌肉线粒体有效消耗葡萄糖的能力的适度降低(例如，20%抑制)可随时间导致严重的健康问题。例如，在响应化合物Se-腺苷-L-高半胱氨酸时在骨骼肌细胞中注意到的线粒体活性的2倍刺激，可代表在前驱糖尿病或糖尿病受试者的肌肉组织中避免或延迟线粒体减少的方式。

[0176] 在实施方案中，用于在神经元细胞中增强线粒体功能的组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。在实施方案中，用于在神经元细胞中增强线粒体功能的组合物可不包括硒代甲硫氨酸或谷氨酰基硒代半胱氨酸中的一种或多种。

[0177] 在实施方案中，用于在神经元细胞中增强线粒体功能的组合物包含选自Se-腺苷-L-高半胱氨酸和/或式II的化合物的化合物和选自5’-甲基硒代腺苷、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式III的化合物和其组合的至少一种其它硒化合物。

[0178] 在实施方案中，用于在神经元细胞中增强线粒体功能的组合物包含包含选自5’-甲基硫代腺苷、S-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸和其组合的化合物的组合物。在实施方案中，靶向神经元细胞的组合物可包含提高神经元细胞中的线粒体活性的一种或多种硫类似物。

[0179] 其它实施方案包括在一种或多种肝细胞中增强线粒体功能的方法或用途，包括：给予有效量的组合物至细胞，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物和式III的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量增强线粒体功能。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0180] 在实施方案中，本申请提供组合物用于在肝细胞中增强线粒体功能的用途，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物和式III的化合物的至少三种不同的化合物。

[0181] 在实施方案中，用于在一种或多种肝细胞中增强线粒体功能的组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的至少三种化合物，以在肝细胞中增强线粒体

功能。在实施方案中，组合物可排除选自5'-甲基硫代腺苷、S-腺苷-L-高半胱氨酸、谷氨酰基-甲基-半胱氨酸和其组合的一种或多种化合物。

[0182] 在实施方案中，与未用化合物处理的相同类型的细胞相比，提高线粒体功能范围从增加大约50%至增加500%。响应的幅度取决于细胞类型、特定的化合物和与细胞接触的时间。在实施方案中，与用硒化合物的一种或多种硫类似物处理的相同类型的细胞相比，对线粒体功能的影响是约-66%至+200%。在一些细胞类型的情况下，硫类似物对线粒体活性没有可测量的影响，在其它细胞类型的情况下，它们是抑制性的，和在仍其它细胞类型的情况下，它们是刺激性的。

[0183] 在实施方案中，一种或多种化合物对解偶联蛋白的表达具有组织特异性作用。线粒体(MT)中的解偶联蛋白(UCP)对线粒体电位或完整性的维持和热产生是重要的。已经证明UCP2的损失导致寿命缩短和MT中活性氧物质(ROS)的产生提高(参见例如，Andrews等 Am J Physiol Endocrinol Metab,2009. 296(4): p. E621-7;Andrews等Curr Aging Sci, 2010. 3(2): p. 102-12)。然而，因为UCP将线粒体中的电子传递解偶联，它们具有在细胞中降低从葡萄糖产生ATP的净效果。众所周知的，线粒体ATP的产生对通过胰腺β-细胞的葡萄糖-刺激的胰岛素分泌(GSIS)是关键的。事实上，已经表明一种UCP (具体而言是UCP2)的抑制通过正面影响胰岛素分泌和作用两者逆转膳食-诱导的糖尿病(De Souza等FASEB J, 2007,21(4): 1153-1163。

[0184] 在实施方案中，在神经元细胞中下调Ucp2和/或Ucp3基因表达的方法或用途包括：给予有效量的组合物至细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物，其中与未用组合物处理的细胞相比，所述有效量在神经元细胞中下调Ucp2和/或Ucp3的表达。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0185] 在实施方案中，本申请提供组合物用于在神经元细胞中下调Ucp2和/或Ucp3基因表达的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物。

[0186] 在其它实施方案中，在肝细胞中下调Ucp2基因表达的方法或用途包括：给予有效量的组合物至细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的至少三种化合物，其中与未用组合物处理的细胞相比，所述有效量在肝细胞中下调Ucp2表达。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0187] 在实施方案中，本申请提供组合物用于在肝细胞中下调Ucp2和/或Ucp3基因表达的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物和式III的化合物的至少三种不同的化合物。

[0188] 在细胞中测定基因表达的方法是本领域技术人员已知的，和包括与探针杂交(例如在阵列上)，或通过PCR方法。用于测定基因表达的阵列和/或引物是市售可得的。使用对于Ucp1、Ucp2和/或Ucp3的示例性的序列，可容易地设计引物。Ucp1的示例性的序列见于NM_021833/gI194733736，Ucp2见于NM_003355/gI13259540和Ucp3见于NM_003356/gI215273349。

[0189] 在实施方案中，如本文所述的化合物和组合物的有效量是有效增强线粒体功能而

对细胞没有毒性的量。增强线粒体功能可在获自按照本文所述的组合物处理的受试者的样品上使用多种测定法确定。选择的有效量不对任何示例的细胞包括肾细胞、小鼠骨骼细胞、人神经元细胞或小鼠肝细胞显示毒性。

[0190] 如医学领域众所周知的，对任何一个受试者的剂量可取决于许多因素，包括患者的大小、体表面积、年龄、待给予的特定化合物、性别、给药次数和途径、一般健康和与同时给予的其它药物的相互作用。

[0191] 在实施方案中，给予受试者以在一种或多种肾、神经元、肝或骨骼肌细胞中增强线粒体功能的组合物的有效量是每天约至少5 ug或更多，或800 ug或更少的单一需要的生物活性的含硒化合物或多种需要的生物活性的含硒化合物。当多种需要的生物活性的含硒化合物存在时，组合物的有效量是组合物中所有需要的生物活性的含硒化合物的总计。

[0192] 在实施方案中，给予受试者的有效量是约5ug至约800 ug和其中的每个数值，5 ug至约700 ug和其中的每个数值、5 ug至约600 ug和其中的每个数值、5 ug至约500 ug和其中的每个数值、5 ug至约400 ug和其中的每个数值、5 ug至约300 ug和其中的每个数值、5 ug至约200 ug和其中的每个数值、5 ug至约100 ug和其中的每个数值或5 ug至50 ug和其中的每个数值。

[0193] 在包含如本文所述的需要的生物活性的含硒化合物的组合物的实施方案中，给予受试者的有效量优选是200 ug或更少/天或50 ug或更少/天。在实施方案中，剂量可根据功效或是否在受试者中观察到硒中毒的任何明显迹象例如蒜味呼吸、掉发或层甲而调整。

[0194] 在实施方案中，在包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少两种或更多种化合物的组合物中，化合物以相等的比例存在于组合物中。在其它实施方案中，一种需要的生物活性的含硒化合物与另一种的比率可以是约4:1至1:1。

[0195] 在实施方案中，每天至少一次给予剂量，持续一段时间，以在血液中实现元素硒的稳定状态。在实施方案中，每天给予剂量，持续至少60或90天。在实施方案中，在受试者正经历疾病或病症的症状时给予剂量。在实施方案中，受试者处于线粒体相关疾病的风险增加的年龄，例如至少40岁。

[0196] 本申请的方法可用于治疗(例如预防性地或治疗性地)受试者(例如具有与线粒体功能障碍有关的病况的受试者)。尽管不意欲限制本公开内容的范围，已经提供了证据表明三种合成的有机硒化合物单独或以各种组合在不同的细胞类型中具有显著地增加线粒体活性的能力，所述细胞类型即肾细胞、骨骼肌细胞、神经元细胞和肝细胞。在机制上，UCP的调节可为这种增加提供一种解释，并且我们在下文提供了证据表明，对线粒体功能和生物发生是关键的其它蛋白的表达也可受这些化合物有利地影响。然而不管作用机制如何，这些化合物可以跨组织的方式刺激线粒体活性的事实意味着它们可能在改善表面上不同疾病例如阿尔茨海默病(AD)和2型糖尿病(T2DM)的发生和进展中特别有价值。

[0197] 包含一种或多种化合物(包括5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合)的组合物可以如本文所述的任一种方式给予受试者(例如患者)。

[0198] 在递送至骨骼肌的实施方案中，如本文所述的组合物可以凝胶、贴剂或霜剂的形式局部施用。

[0199] 在其它实施方案中，递送至脑可通过使用具有抗体、转铁蛋白受体或前药作为靶向剂的脂质体或PLGA球靶向。

[0200] 在其它实施方案中，递送至肝可通过使用使用如本文所述的靶向前药，包括HepDirect或硒代糖苷靶向。

[0201] 因此，在本申请的一些实施方案中，包含硒的组合物和/或制剂可单独或与其它形式的硒、药物、小分子组合或在其中它与赋形剂或其它药学上可接受的载体混合的药物组合物中给予受试者。

[0202] 在本申请的另一实施方案中，包含本文所述的硒有机化合物的组合物可单独给予至易患、有风险发生或患有与线粒体功能障碍有关的疾病或病况的个体。这样的疾病包括糖尿病肾病、阿尔茨海默病和II型糖尿病。

[0203] A.阿尔茨海默病

阿尔茨海默病(“AD”)是美国(“USA”)的第6大死亡原因，并且是最常见的痴呆形式。目前估计该疾病影响USA的510万年龄在65岁和以上的人。AD在组织病理学上的特征为两种标志性损伤Aβ斑块(见Kumar等2000)和由高-磷酸化形式的微管相关蛋白tau构成的NFT (见Dunckley等，2005年在线公开，2005年10月19日和公开的专利申请201110038889 AI的段落155-163)。文献中存在许多证据表明Aβ和NFT两者在阿尔茨海默病的发病中是重要的伴侣，并且在受影响的个体中它们各自和一致起作用以使认知损害和神经元损失最大化。淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的突变导致具有100%渗透的AD，并且APP、早老素-I (PSEN)和早老素-2 (PSEN-2)的家族性AD (FAD)-相关突变导致淀粉样蛋白β产生的水平增加和Aβ聚集。

[0204] 此外，APP-过表达的小鼠(APP-Tg)显示Aβ沉积和记忆损害，未形成NFT或遭受神经元损失。当淀粉样蛋白前体蛋白(APP)被称为β分泌酶和y-分泌酶的两种酶异常加工，导致形成β淀粉样蛋白的39-42个氨基酸肽时，形成斑块。γ-分泌酶事实上是多酶复合物，其包括早老素-I (PSEN)和早老素-2 (PSEN-2)作为两种关键组分。

[0205] Aβ聚集与AD模型的记忆损失有关，和APP表达降低逆转该损失(见Kumar等Peptides 21:1769 2000)。因此，APP表达降低(在基因或蛋白水平上)被技术人员理解为用来对抗涉及记忆损失的年龄依赖性或神经变性病症例如AD的方法。

[0206] PSEN、PSEN-2、Nicastrin (其控制在γ-分泌酶复合物中的蛋白运输)的调节或抑制是AD治疗研究的重要目标，和已经公布了一些显著的成功。例如，在人神经元中调节PSEN活性的高度特异性的抑制剂不仅影响Aβ产生，而且影响Notch信号转导途径(见Seiffert等J Biol. Chem. 275:34086 2000)。这伴随有神经突形态的变化，和表明γ分泌酶PSEN-1活性的调节对AD的神经突病理学具有临床有益作用(见Figueroa等Neurobiology Dis. 9:49 2002)。此外，PSEN的下调表明降低Aβ蛋白的分泌(见Luo等Acta Pharmacol.Sin.25:1613 2004)，和发现在SAMP8小鼠中PSEN的抑制显著地改善记忆(见Kumar等J.Exp. Biol. 212:494 2009)。

[0207] 因此，Aβ对神经元具有毒性，促进神经元细胞死亡，和在脑中Aβ水平可通过调节其前体APP或加工APP的酶复合物的水平/活性而改变。技术人员容易理解和意识到，能够抑制APP表达和/或APP加成成Aβ (例如B或γ分泌酶)的试剂是AD疗法的治疗靶标。

[0208] 本文公开的含硒化合物和组合物影响参与B淀粉样蛋白加工和tau磷酸化的基因的基因表达。此外，这样的化合物和组合物显示关于涉及转录激活物的基因的基因表达的

组织特异性。

[0209] 在实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚的方法或用途包括：给予有效量的组合物至一种或多种神经元细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物，其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比，所述有效量在神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚。

[0210] 在实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚的方法或用途包括：给予有效量的组合物至一种或多种神经元细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比，所述有效量在神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0211] 在实施方案中，本申请提供组合物用于在神经元细胞中抑制B淀粉样蛋白积聚的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物的化合物或选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物5'-甲基硒代腺苷、式I的化合物和其混合物的至少三种不同的化合物。

[0212] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物以在神经元细胞中抑制早老素1 (PSEN)和Nicastrin的表达。在实施方案中，神经元细胞是IMR 32细胞。IMR 32细胞是作为阿尔茨海默病的模型的人神经元细胞。(Neill等J. Neuroscience Res. 1994 39:482)。在实施方案中，用于在神经元细胞中抑制基因表达的组合物可不包括Se-腺苷-L-高半胱氨酸或甲基硫代腺苷中的一种或多种。

[0213] 在实施方案中，本申请提供组合物用于在神经元细胞中抑制早老素1和nicastrin的表达的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物的化合物或选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸，γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物5'-甲基硒代腺苷、式I的化合物和其混合物的至少三种不同的化合物。

[0214] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物，以在神经元细胞中抑制nicastrin和早老素1的基因表达。在实施方案中，用于在神经元细胞中抑制基因表达的组合物可不包括硒代甲硫氨酸或谷氨酰基硒代半胱氨酸的一种或多种。

[0215] 在实施方案中，组合物包括5'-甲基硒代腺苷和/或式(I)的化合物和选自Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少一种其它硒化合物。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0216] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少三种化合物，以抑制神经元细胞中的基因表达。

[0217] 在实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制tau磷酸化的方法或用途包括：给予有效量的组合物至一种或多种神经元细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其混合物的化合物，其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比，

所述有效量在神经元细胞中抑制tau磷酸化。

[0218] 在实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制tau磷酸化的方法或用途包括：给予有效量的组合物至一种或多种神经元细胞，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的神经元细胞相比，所述有效量在神经元细胞中抑制tau磷酸化。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0219] 在实施方案中，本申请提供组合物用于在神经元细胞中抑制tau磷酸化的用途，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物的化合物或选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸，γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、和式(III)的化合物5’-甲基硒代腺苷、式I的化合物和其混合物的至少三种不同的化合物。

[0220] 在实施方案中，组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷和/或式I的化合物的化合物以在神经元细胞中抑制Gsk3B的表达。在实施方案中，用于在神经元细胞中抑制Gsk3B基因表达的组合物可不包括Se-腺苷-L-高半胱氨酸或甲基硫代腺苷的一种或多种。

[0221] 在实施方案中，组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物以在神经元细胞中抑制tau磷酸化。在实施方案中，用于在神经元细胞中抑制tau磷酸化的组合物可不包括甲硫氨酸或其它含硫化合物的一种或多种。

[0222] 在实施方案中，组合物包括5’-甲基硒代腺苷和/或式(I)的化合物和选自Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少一种其它硒化合物。

[0223] 在实施方案中，组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式III的化合物和其组合的至少两种化合物以在神经元细胞中抑制tau磷酸化。

[0224] 在实施方案中，组合物包含选自γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸和/或式(III)的化合物的化合物以在神经元细胞中抑制全部tau。在实施方案中，用于在神经元细胞中抑制全部tau的组合物可不包括Se-腺苷-L-高半胱氨酸或甲基硫代腺苷的一种或多种。

[0225] 在实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制FOXO磷酸化的方法或用途包括：给予有效量的组合物至一种或多种神经元细胞，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物，其中与未用组合物处理的细胞相比，所述有效量抑制FOXO磷酸化。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0226] 在实施方案中，本申请提供组合物用于在神经元细胞中抑制FOXO磷酸化的用途，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物。

[0227] 在实施方案中，用于在一种或多种神经元细胞中抑制FOXO磷酸化同时在一种或多种肝细胞中提高FOXO磷酸化的方法或用途包括：给予有效量的组合物至肝和神经元细胞，所述组合物包含选自5’-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少三种化合物，其中与未用组合物

处理的细胞相比，所述有效量在神经元细胞中降低FOXO磷酸化和在肝细胞中增加FOXO磷酸化。

[0228] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物以在神经元细胞中抑制FOXO3和/或FOXO 4的磷酸化。在实施方案中，用于在神经元细胞中抑制FOXO 3和/或FOXO4磷酸化的组合物可不包括甲硫氨酸或硒代甲硫氨酸。在实施方案中，组合物包括5'-甲基硒代腺苷和/或式(I)的化合物和选自Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少一种其它硒化合物。

[0229] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少三种化合物以在神经元细胞中抑制FOXO 3和FOXO 4的磷酸化。

[0230] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物以提高PGC1a在神经元细胞中的表达。在实施方案中，用于提高PGC 1a在神经元细胞中的表达的组合物可不包括甲硫氨酸或硒代甲硫氨酸。

[0231] 在实施方案中，本申请提供组合物用于提高PGC1a在神经元细胞中的表达的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物。

[0232] 在实施方案中，增加PGC1a在一种或多种神经元细胞中的表达的方法或用途包括：给予有效量的组合物至一种或多种神经元细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量增加PGC1a表达。

[0233] 在实施方案中，用于增加PGC1a在一种或多种神经元细胞中的表达和不影响PGC1a在一种或多种肝细胞中的表达的方法或用途包括：给予有效量的组合物至肝和神经元细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少三种化合物，其中与未用组合物处理的细胞相比，所述有效量增加PGC1a在一种或多种神经元细胞中的表达和不影响PGC1a在一种或多种肝细胞中的表达。

[0234] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷和/或式I的化合物的化合物和选自Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式II的化合物、式III的化合物和其组合的至少一种其它硒化合物。

[0235] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少三种化合物以提高PGC1 a在神经元细胞中的表达。

[0236] 在实施方案中，与未用化合物处理的相同类型的细胞相比，PGC1a表达提高、FOXO磷酸化降低、PSEN1降低、nicastrin降低、Gsk3b降低的范围分别为大约增加或降低50%至增加或降低500%。响应的幅度取决于细胞类型、特定的化合物和与细胞接触的时间。

[0237] 本申请的化合物和组合物对FOXO 3和FOXO 4的磷酸化和对PGC1a的表达的作用显示组织特异性。尽管不意图限制本申请，但在神经元细胞中FOXO3和FOXO4的磷酸化的抑制允许FOXO进入细胞核和活化转录。PGC1a也是调节细胞中能量代谢(包括糖原异生)的转录激活物。FOXO和PGC1a促进基因例如葡萄糖-6-磷酸酶(G6pc)的转录活化。糖原异生的提高使神经元细胞具有产生葡萄糖和保持能量贮存的能力。

[0238] 如上文所述，Aβ和磷酸化tau的产生显著地促进阿尔茨海默病的病状。本文提供的结果提供了证据表明，本文所述的化合物和组合物影响早老素1和nicastrin的基因表达。这两种酶已经表明参与Aβ的产生。此外，tau和/或全部tau的磷酸化的抑制证明了如本文所述的化合物和组合物还影响NFT的产生。此外，化合物对增强线粒体功能、提高FOXO活化和增加PGC1a基因表达的作用使神经元细胞具有提高的线粒体功能，这还可通过使氧化应激最小用于治疗阿尔茨海默病。之前的研究表明，饲喂富硒酵母而非正常膳食或缺硒膳食的App转基因小鼠减少B淀粉样蛋白斑块的产生(Lovell等Free Rad. Biol. Med.46:1527 2009)。

[0239] 在细胞中测定基因表达的方法是本领域技术人员已知的，和包括与探针杂交(例如在阵列上)或通过PCR方法。用于检测基因表达的阵列和/或引物是市售可得的。使用对PSEN 1、PSEN2、Nicastrin和 Gsk3b的示例性的序列，可容易地设计引物。PSEN 1的示例性的序列见于NM_000021/ NM_007318，PSEN2见于NM_000447/NM_012486，Nicastrin见于NM_015331，和Ucp3见于NM_002093。

[0240] 在实施方案中，治疗阿尔茨海默病的方法或用途包括：给予受试者有效量的组合物，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、式(I)的化合物和其组合的化合物。在实施方案中，用于治疗阿尔茨海默病的组合物可不包括甲基硫代腺苷或S-腺苷-L-高半胱氨酸的一种或多种。

[0241] 在实施方案中，治疗阿尔茨海默病的方法或用途包括：给予选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的化合物。在实施方案中，用于治疗阿尔茨海默病的组合物可不包括甲硫氨酸或硒代甲硫氨酸。

[0242] 在实施方案中，本申请提供组合物治疗阿尔茨海默病的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的化合物。

[0243] 在实施方案中，组合物包括5'-甲基硒代腺苷和/或式(I)的化合物和选自Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少一种其它硒化合物。在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种化合物。

[0244] 在实施方案中，治疗阿尔茨海默病的方法或用途还包括选择治疗阿尔茨海默病的症状而不对肝中的葡萄糖代谢产生副作用的组合物。在实施方案中，组合物包含5'-甲基硒代腺苷和/或式(I)的化合物。在实施方案中，组合物可排除Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(II)的化合物或式(III)的化合物的一种或多种。在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少三种化合

物。在实施方案中，组合物排除H(5'-甲基硫代腺苷)、I(S-腺苷-L-高半胱氨酸)或J（γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)的一种或多种。

[0245] 在实施方案中，组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的至少三种化合物，其用于治疗阿尔茨海默病。

[0246] 在实施方案中，如本文所述的化合物和组合物的有效量是有效治疗阿尔茨海默病而对细胞无毒性的量。选择的有效量不对任何示例的细胞包括肾细胞、小鼠骨骼细胞、人神经元细胞或小鼠肝细胞显示毒性。

[0247] 在实施方案中，如本文所述的化合物和组合物的有效量是有效改善阿尔茨海默病的症状和/或调节如本文所述的基因表达而对细胞无毒性的量。在神经元细胞中调节基因表达可如本文所述的使用多种测定法在获自按照本文所述的组合物治疗的受试者的样品上确定。

[0248] 如医学领域众所周知的，对任何一个受试者的剂量可取决于许多因素，包括患者的大小、体表面积、年龄、待给予的特定化合物、性别、给药次数和途径、一般健康和与同时给予的其它药物的相互作用。

[0249] 在实施方案中，用于治疗阿尔茨海默病、抑制B淀粉样蛋白加工和/或神经元细胞中的tau磷酸化的组合物的有效量是每天约5 ug或更多或800 ug或更少的单一需要的生物活性的含硒化合物或多种需要的生物活性的含硒化合物。当多种需要的生物活性的含硒化合物存在时，组合物的有效量是给予受试者的组合物中所有化合物的总计。

[0250] 在实施方案中，一天内给予受试者的有效量是约5ug至约800 ug和其中的每个数值、5 ug至约700 ug和其中的每个数值、5 ug至约600 ug和其中的每个数值 、5 ug至约500 ug和其中的每个数值、5 ug至约400 ug和其中的每个数值、5 ug至约300 ug和其中的每个数值、5 ug至约200 ug和其中的每个数值、5 ug至约100 ug和其中的每个数值和5 ug至50 ug和其中的每个数值。

[0251] 在实施方案中，给予受试者的包含如本文所述的需要的生物活性的含硒化合物的组合物的有效量优选是200 ug或更少/天或50 ug或更少/天。在实施方案中，剂量可根据功效或是否在受试者中观察到任何明显的硒中毒迹象例如蒜味呼吸、掉发或层甲调整。

[0252] 在实施方案中，在包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的两种或更多种化合物的组合物中，化合物以相同的比例存在于组合物中。在其它实施方案中，一种化合物与另一种的比率可以是约4:1至1:1。

[0253] 在实施方案中，至少一天一次给予剂量，持续一段时间以在血液中实现元素硒的稳定状态。在实施方案中，每日给予剂量持续至少60或90天。在实施方案中，在受试者正经历疾病或病症的症状时给予剂量。在实施方案中，受试者处于其中线粒体相关疾病的风险增加的年龄，例如，至少40岁。

[0254] 本申请的方法可用于治疗(例如预防性地或治疗性地)受试者(例如具有与阿尔茨海默病、B淀粉样蛋白加工、tau磷酸化和早老素1基因表达、nicastrin、PGC1a和tau和FOXO3和FOXO 4磷酸化相关的病况的受试者)。包含一种或多种化合物(包括5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合

物、式(III)的化合物和其组合)的组合物可在药学上可接受的载体例如生理盐水中经静脉内给予受试者(例如患者)。可使用用于胞内递送化合物的标准方法(例如通过脂质体递送)。这样的方法是本领域普通技术人员众所周知的。包含硒的组合物可用于静脉内给药以及胃肠外给药,例如静脉内、皮下、肌内和腹膜内。

[0255] 在实施方案中,本发明的组合物经配制以跨过血脑屏障。本发明的组合物可与适合于递送至脑的植入材料组合,例如聚合的生物可降解的植入物,例如乙烯乙酸乙烯酯。其它类型的靶向可包括受体介导的运输,例如胰岛素受体和转铁蛋白受体。这些受体可整合至还包括如本文所述的组合物的脂质体或微球。在其它实施方案中,递送至脑可通过使用具有抗体、转铁蛋白受体或前药作为靶向剂的脂质体或PLGA球来靶向。

[0256] 因此,在本申请的一些实施方案中,包含硒的组合物和/或制剂可单独或与其它形式的硒、药物、小分子组合或在其中它与赋形剂或其它药学上可接受的载体混合的药物组合物中给予受试者。在本申请的一个实施方案中,药学上可接受的载体是药学上惰性的。在本申请的另一实施方案,包含硒的组合物可单独给予至易患、有风险发生或患有与B淀粉样蛋白加工或tau磷酸化有关的疾病或病况的个体。包含5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的组合物可添加至营养饮料或食物(例如ENSURE、POWERBAR等)、多种维生素、营养产品、食品等,用于每日消耗。

[0257] 葡萄糖代谢

非胰岛素依赖性(II型)糖尿病(DM)是特征为在骨骼肌、肝和脂肪中胰岛素抵抗以及由于胰腺β-细胞功能导致的胰岛素分泌缺乏的疾病。胰岛素抵抗是II型糖尿病的重要特征。例如,已知极大多数II型糖尿病是胰岛素抵抗的。同样,在II型糖尿病的后代中的胰岛素抵抗是后期发生该疾病的最好的预测物(参见例如,Warram等Ann Intern Med. 113:909 1990)。减少胰岛素抵抗的干预也防止糖尿病发生。最佳线粒体功能是自胰腺β细胞分泌正常葡萄糖-刺激的胰岛素所需要的。

[0258] 在维持葡萄糖稳态中,骨骼肌和肝是两个重要的胰岛素-响应器官。这些器官转变为胰岛素-抵抗状态解释了在II型糖尿病患者中见到的大多数葡萄糖代谢变化(参见例如,Lowell和Shulman,Science 21:307 2005)。在这两个器官中,在自胰岛素抵抗发生获得的后果方面,骨骼肌是更重要的。这是因为已经发现骨骼肌处理或代谢80-90%的每日摄取葡萄糖(参见例如,DeFronzo等1985)。

[0259] 通过基因组范围内的表达分析已经证明,线粒体氧化磷酸化(OXPHOS)基因显示与健康对照相比,在前驱糖尿病和糖尿病个体中表达降低,和在许多情况下这些基因是转录共活化剂增殖子-活化受体γ共活化剂1-α的靶标(PGC1-α,参见例如,Mootha等2003)。在这些研究中,典型的OXPHOS基因表达降低是适度的(大约20%),但非常一致,其中相对于具有正常葡萄糖耐量的个体,在具有葡萄糖耐量受损或II型糖尿病的个体中,研究的基因的89%显示较低的表达。

[0260] 本领域中通常应理解和意识到,在肌肉中增加OXPHOS活性的药物或试剂作为2型糖尿病的有价值的疗法存在。为支持该假设,很久就知道有氧运动是用于治疗糖尿病的最佳非-药理学干预,因为其增加线粒体活性和数量以及促进OXPHOS基因表达。

[0261] 在肝中,呈活化或非磷酸化状态的FOXO位于细胞核中,在细胞核中它结合葡萄糖

6-磷酸酶的启动子区以及其它因子例如PGC-1a，增加葡萄糖-6-磷酸酶的转录，从而增加葡萄糖产生速率。葡萄糖6-磷酸酶催化糖原异生和糖原分解的最后一步，导致从肝释放葡萄糖。因此，在控制葡萄糖稳态中，特别是在糖尿病受试者中，其是重要的。

[0262] 正常地，FOXO磷酸化的加工受到称为AKT (蛋白激酶B)的另一种激酶直接控制。AKT将FOXO磷酸化和驱动其离开细胞核，从而通过降低葡萄糖6-磷酸酶的转录速率，减少葡萄糖产生。AKT本身在通过小分子级联反应的下游控制下，所述级联反应以在细胞表面上胰岛素与其受体结合开始。这起始一系列事件，包括两种其它激酶，磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和磷酸肌醇-依赖性蛋白激酶1 (PDK1)。全部途径称为胰岛素/PI3K/PDK1/Akt途径，其具有通过胰岛素信号转导控制葡萄糖稳态的作用。在FOXO控制的情况下，PDK1使Akt磷酸化和活化，其进而使FOXO磷酸化和失活。

[0263] 在实施方案中，提供用于在一种或多种肝细胞中增加FOXO 3和FOXO 4磷酸化的方法或用途，包括给予包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的至少三种化合物的组合物。

[0264] 在实施方案中，在选自肝细胞、骨骼肌细胞和其组合的一种或多种细胞中调节葡萄糖代谢的方法包括：给予有效量的组合物至所述一种或多种细胞，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量在肝细胞或肌细胞中改变葡萄糖代谢。在实施方案中，组合物可排除H(5'-甲基硫代腺苷)、I(S-腺苷-L-高半胱氨酸)和/或J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)中的一种或多种。

[0265] 在本申请的实施方案中，提供组合物用于在肝细胞或肌细胞中调节葡萄糖代谢的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物。

[0266] 在实施方案中，治疗II型糖尿病的方法包括：给予受试者有效量的组合物，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物，其中与未用所述组合物处理的细胞相比，所述有效量在肝细胞或肌细胞中改变葡萄糖代谢。在实施方案中，组合物可排除H(5'-甲基硫代腺苷)、I(S-腺苷-L-高半胱氨酸)和/或J (γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)的一种或多种。

[0267] 在本申请的实施方案中，提供组合物用于在受试者中治疗糖尿病的用途，所述组合物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物。

[0268] 在实施方案中，提供用于在一种或多种肝细胞中抑制G6pc的表达的方法或用途，包括：给予包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式I的化合物、式II的化合物、式III的化合物和其组合的至少三种化合物的组合物。在实施方案中，组合物可排除H(5'-甲基硫代腺苷)、I(S-腺苷-L-高半胱氨酸)和/或J(γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)中的一种或多种。

[0269] 在本申请的实施方案中，提供组合物用于抑制葡萄糖-6-磷酸酶的用途，所述组合

物包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物和式(III)的化合物的至少三种不同的化合物。

[0270] 在实施方案中，与未用化合物处理的相同类型的细胞相比，FOXO磷酸化增加或G6pc降低的范围分别为增加或降低大约50%至增加或降低500%。响应的幅度取决于细胞类型、特定的化合物和与细胞接触的时间。

[0271] 含硒化合物在肝细胞中不同地影响基因表达。与化合物和组合物对如本文所述的肝细胞具有的影响相反，相同或类似的组合物可以相反的方式影响神经元细胞。例如，如本文所述组合物在神经元细胞中降低FOXO3和/或FOXO4的磷酸化。PGC1a的表达增加，导致神经元细胞中糖原异生增加。相比之下，相同的化合物或组合物在肝细胞中增加FOXO3和/或FOXO4的磷酸化，和PGC1a的表达未改变。

[0272] 如在神经元IMR-32细胞的情况下所述的，PGC1a是MT生物发生和糖代谢的关键基因。在肝细胞中，与FOXO一致，其也用于驱动参与糖原异生的基因转录，但不能在FOXO的核缺乏的情况下进行该驱动。我们检查了PGC1a蛋白表达和在CDE组合处理后通过定量分析未观察到肝细胞中PGC蛋白水平的显著改变。然而，由于响应CDE时对FOXO磷酸化观察到的稳健作用，几乎肯定的是，其从细胞核中排出，因此PGC1a的水平变得较不重要，因为它需要FOXO以起始糖原异生过程。总之，这些结果表明，CDE的组合不影响PI3k/PDK1/AKT信号转导和几种其它AKT直接或间接下游信号转导分子，除了上述重要的FOXO之外。换句话说，CDE的组合在肝细胞中选择性失活FOXO和该作用显得不依赖于PI3K/PDK1/AKT信号转导。

[0273] 在实施方案中，如本文所述的化合物和组合物的有效量是在肝细胞中有效抑制G6pc的表达、调节葡萄糖代谢或增加FOXO磷酸化而对细胞无毒性的量。肝细胞中的基因表达可使用许多测定法在获自按照本文所述的组合物处理的受试者的样品上测定。选择的有效量不对任何示例的细胞包括肾细胞、小鼠骨骼细胞、人神经元细胞或小鼠肝细胞显示毒性。

[0274] 如医学领域众所周知的，对于任何一个受试者的剂量可取决于许多因素，包括患者的大小、体表面积、年龄、待给予的特定化合物、性别、给药次数和途径、一般健康和与同时给予的其它药物的相互作用。

[0275] 在实施方案中，给予受试者以抑制G6pc表达、调节葡萄糖代谢、治疗II型糖尿病或在肝或骨骼肌细胞中增加FOXO磷酸化的本发明的含硒组合物的有效量是每天约5 ug或更大或800 ug或更少的单一需要的本发明的生物活性含硒化合物或多种需要的本发明的生物活性含硒化合物。当多种需要的生物活性含硒化合物存在时，给予受试者的组合物的有效量是组合物中所有需要的生物活性含硒化合物的总量。

[0276] 在实施方案中，给予受试者的需要的本发明的生物活性含硒化合物的有效量是约5ug至约800 ug和其中的每个数值、5 ug至约700 ug和其中的每个数值、5 ug至约600 ug和其中的每个数值、5 ug至约500 ug和其中的每个数值、5 ug至约400 ug和其中的每个数值、5 ug至约300 ug和其中的每个数值、5 ug至约200 ug和其中的每个数值、5 ug至约100 ug和其中的每个数值和5 ug至50 ug。

[0277] 在本发明的实施方案中，包含本文所述的化合物的组合物优选以200ug或更少/天或50 ug或更少/天给予。在本发明的实施方案中，剂量可根据功效或是否在受试者中观察到任何明显的硒中毒迹象例如蒜味呼吸、掉发或层甲调整。

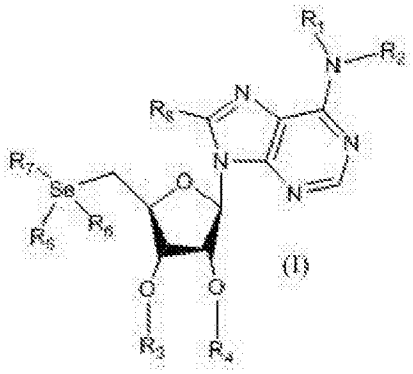
[0278] 在实施方案中，在包含选自5'-甲基硒代腺苷、Se-腺苷-L-高半胱氨酸、γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸、式(I)的化合物、式(II)的化合物、式(III)的化合物和其组合的两种或更多种化合物的组合物中，化合物以相等的比例存在于组合物中。在其它实施方案中一种化合物与另一种的比率可以是约4:1至1:1。

[0279] 在实施方案中，至少每日一次给予剂量，持续一段时间以在血液中实现元素硒的稳定状态。在实施方案中，每日给予剂量，持续至少60或90天。在实施方案中，在受试者正经历疾病或病症的症状时给予剂量。在实施方案中，受试者处于其中线粒体相关疾病的风险增加的年龄，例如至少40岁。

[0280] 在其它实施方案中，递送至肝可通过使用具有抗体的脂质体或PLGA球，通过制备硒代糖苷或靶向肝的前药而靶向。

[0281] 本申请的其它实施方案

在一些实施方案中，提供基本上由式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物：



(I)

其中R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_4是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_7是H、烷基、烯基、炔基、酮、氨基醇、氨基酸、OR'、Se-R'、S-R'，其中R'选自H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；和

R_8是氢、叠氮基、烷基、烯基、炔基。

[0282] 在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种这些式(I)化合物。

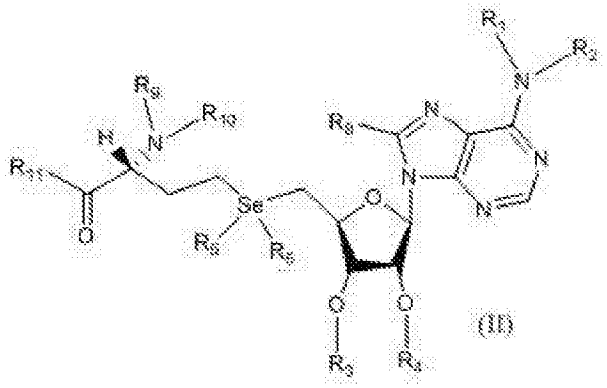
[0283] 在一些实施方案中，提供基本上由式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，其中R_1、R_3、R_4和R_8各自为H；R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'或C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；R_5和R_6各自不存在；和R_7是烷基或氨基酸。

[0284] 在一些实施方案中，提供基本上由式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，其中R_1、R_3、R_4和R_8各自为H；R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；R_5和R_6各自不存在；和R_7是烷基或氨基酸；条件是5'-硒代腺苷甲硫氨酸、脱羟基5'-甲基硒代腺苷、乙基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸、硒代羟基腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷、硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、腺苷-羟基硒亚砜和硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜可各自从组合物中排除。

[0285] 在特定的方面，提供基本上由式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，所述化合物是5'-甲基硒代腺苷("化合物C")。

[0286] 在一些实施方案中，组合物基本上由式(I)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成，条件是5'-硒代腺苷甲硫氨酸、脱羟基5'-甲基硒代腺苷、乙基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸、硒代羟基腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷、硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、腺苷-羟基硒亚砜和硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜可各自从组合物中排除。

[0287] 在一些实施方案中，提供基本上由式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物：



(II)

其中R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_4是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、环烷基、羧基或C-酰胺基；或R_3与R_4和它们所连

接的原子一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_8是氢、叠氮基、烷基、烯基、炔基；

R_9是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_9与R_{10}一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_{10}是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_9与R_{10}一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；和

R_{11}是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐。

[0288] 在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种这些式(II)化合物。

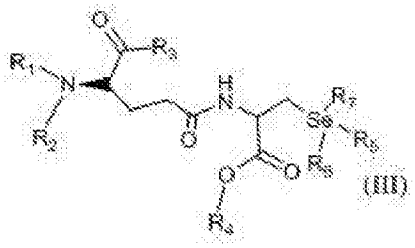
[0289] 在一些实施方案中，提供基本上由式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，其中R_1、R_3、R_4、R_8和R_9各自是H；R_2是H、酰基、烷基、羧基、C(O)R'或C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；R_5和R_6不存在；R_{10}是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；和R_{11}是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐。

[0290] 在一些实施方案中，提供基本上由式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，其中R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、R_{10}如上文所定义和其中R_{11}是OH或OR，其中R选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基。

[0291] 在特定的方面，提供基本上由式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，所述化合物是5'-硒代腺苷高半胱氨酸(化合物"D")或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0292] 在一些实施方案中，组合物基本上由式(II)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成；条件是5'-硒代腺苷甲硫氨酸、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸和硒代羟基腺苷高半胱氨酸可各自从组合物中排除。

[0293] 在一些实施方案中，提供基本上由式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物：



(III)

其中

R_1是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'是烷基、

烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_2是H、酰基、烷基、烯基、炔基、芳烷基、羧基、环烷基、C(O)R'、C(O)OR'，其中R'选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基；或R_1与R_2一起形成具有4-8个环成员以及选自氧或氮的至少一个杂原子的杂环；

R_3是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐；

R_4是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐；

R_5是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；

R_6是氧代、羟基、烷基、烯基、炔基、OR'或不存在；其中R'选自烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或芳烷基；和

R_7是H、烷基、烯基、炔基、酮、OR'、Se-R'、S-R'，其中R'选自H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基或杂环基。

[0294] 在一些实施方案中，提供基本上由式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，其中

R_1和R_2各自是H；

R_3是OH、OR、烷氧基、芳烷氧基或氨基，其中R选自烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或药学上可接受的盐或内盐；

R_4是H或药学上可接受的盐或内盐；

R_5和R_6不存在；和

R_7是烷基、烯基或炔基。

[0295] 在进一步的实施方案中，可分离和/或纯化一种或多种这些式(III)化合物。

[0296] 在一些实施方案中，提供基本上由式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，其中R_1和R_2各自是H；R_3是OH或OR，其中R选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基；R_4是H；R_5和R_6不存在；和R_7是烷基，其是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基。

[0297] 在一些实施方案中，提供基本上由式III化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，其中R_1和R_2各自是H；R_3是OH或OR，其中R选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基或叔丁基；R_4是H；R_5和R_6不存在；和R_7是甲基。

[0298] 在特定的方面，提供基本上由式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成的组合物，所述化合物是γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸(“化合物E”)或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0299] 在一些实施方案中，组合物基本上由式(III)化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药组成或由其组成，条件是γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸-γ -谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸和硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸可各自从组合物中排除。

[0300] 在一些实施方案中，提供基本上由根据式(I)、(II)和/或(III)的一个或多个的一种或多种化合物组成或由其组成的组合物，其中以下化合物各自从组合物中排除以使硒毒性最小、除去无活性或抑制性化合物、和/或使组合物的治疗指数最大，其中所排除的化合物是γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、γ-谷氨酰基半胱氨酸-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、二-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基半胱氨酸、脱羟基5'-甲基硒代腺苷、乙基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、烯丙基硒代腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷高半胱氨酸、硒代羟基腺苷高半胱氨酸、硒代腺苷、硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒代苯基-(3'-脱氧基-腺苷)、腺苷-羟基硒亚砜和硒代腺苷-Se(甲基)-硒亚砜。

[0301] 在实施方案中，本文所述的任何化合物可经修饰以延长半寿期、保护化合物免于氧化、使化合物靶向组织、允许化合物通过血脑屏障，如本文所述的。

[0302] 在一些实施方案中，提供基本上由各自按照式(I)的一种或多种化合物组成或由其组成的组合物。在一些方面，包含各自按照式(I)的一种或多种化合物的组合物包含5'-甲基硒代腺苷或其药学上可接受的盐、水合物或前药；和5'-硒代腺苷高半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0303] 在一些实施方案中，提供基本上由各自按照式(I)和式(III)的一种或多种化合物组成或由其组成的组合物。在一些方面，包含各自按照式(I)和式(III)的一种或多种化合物的组合物包含5'-甲基硒代腺苷或其药学上可接受的盐、水合物或前药；5'-硒代腺苷高半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药；和γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0304] 在一些实施方案中，基本上由各自按照式(I)和式(III)的一种或多种化合物组成或由其组成的组合物包含5'-甲基硒代腺苷或其药学上可接受的盐、水合物或前药；和γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

[0305] 在一些实施方案中，提供基本上由各自按照式(II)和式(III)的一种或多种化合物组成或由其组成的组合物。在一些方面，包含各自按照式(II)和式(III)的一种或多种化合物的组合物包含5'-硒代腺苷高半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药；和γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或其药学上可接受的盐、水合物或前药。

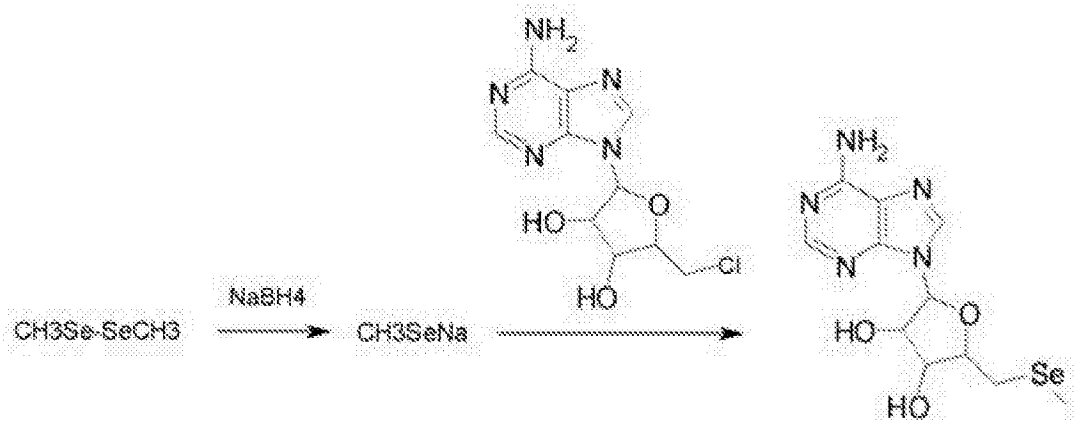
[0306] 根据另一方面，本发明提供药物组合物，其基本上由治疗有效量的本发明的一种或多种化合物或其药学上可接受的盐、酯或前药以及药学上可接受的稀释剂或载体组成或由其组成。药学上可接受的载体包括：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素和其衍生物，例如羧基甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4) 西黄蓍胶粉；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石粉；(8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格溶液；(19) 乙醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；和(21) 药物制剂中使用的其它无毒相容物质。

[0307] 组合物可经配制用于本文所述的任何给药途径。

[0308] 实施例I

5'-甲基硒代腺苷("C")的合成和表征

合成方案和方法如下：

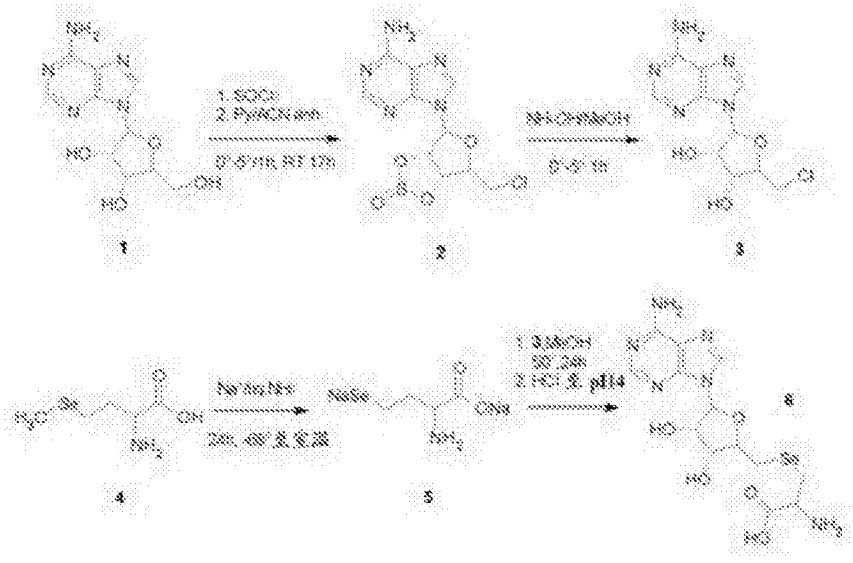


将硼氢化钠(227mg,6.0mM,在Ar°下)置于装配在磁力搅拌器上和位于冰冷却浴中的含有20mL的无水乙醇的200mL圆底烧瓶中。在冷却、搅拌和在Ar流下,从注射器添加二甲基二硒化物(190uL,376mg,2.0mM)。在浅黄色溶液变色后,加入固体5'-氯-5'-脱氧基腺苷(1,143g、4.0mM)。5-Cl-Ade极难溶于乙醇。再加入100mL乙醇以溶解沉淀物。在室温下继续搅拌混合物,持续之后四天。MS用于监测转化率。在5天后达到~75%转化率。蒸发溶剂和收集产物3.22g (含~ 20%的SM)和通过反相(C-8)制备型色谱纯化,得到1.1g的纯产物,其分子量通过质谱证实。

[0309] 实施例2

Se-腺苷-L-高半胱氨酸("D")的合成和表征

合成方案和方法如下：



5'-氯-5'-脱氧基腺苷(639-62)

将89G (0.366摩尔,1eq.)腺苷、59.3ML (58G,1.833摩尔,2eq.)无水吡啶和1L无水乙腈置于烤箱干燥的2L 4颈烧瓶中,其配备有滴液漏斗、搅拌器、气体入口/出口和温度计。将反应装置置于冰/盐浴中。开始搅拌,和当溶液温度下降低于3°C时,开始极缓慢加入亚硫酰

氯(强放热!)。在亚硫酰氯加入期间反应混合物温度需要保持在低于5°C和持续超过4h (此时溶液是黄色,在底部具有白-黄色沉淀)。然后反应在环境温度下放置过夜。第二天早上,大部分沉淀使用烧结玻璃滤器滤出,和在滤器上用3次100ML体积的无水乙腈洗涤,期间沉淀颜色变成白色。然后将湿的沉淀转移回含有800ML甲醇和160ML水的混合物的2L反应烧瓶,向其中逐滴添加80ML的浓氢氧化铵溶液,同时机械搅拌和用水浴冷却。混合物在环境温度下搅拌45min和通过真空过滤将形成的白色沉淀与液体分离。使用真空旋转蒸发器将滤液浓缩至干,同时沉淀从~560ML热水结晶,在冰水浴中冷却和滤出第一批晶体,并经冷冻干燥。然后该滤液在自第一滤液的旋转蒸发产生的固体结晶中用作溶剂,得到第二批产物,其也经冷冻干燥(2天)。两批晶体最终经五氧化磷在真空干燥器中干燥2天。获得84G的白色晶体,80.5%收率。MS (286-M+H),mp. 187°C。

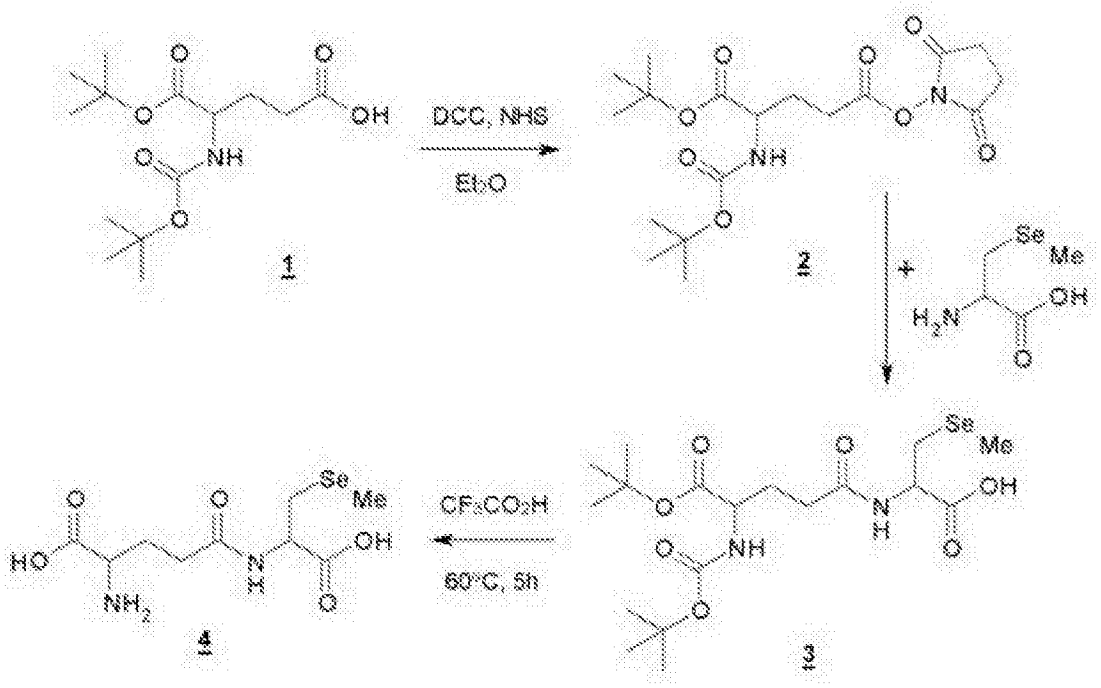
[0310] 硒代腺苷高半胱氨酸(655-40)

将9.806G (50mM,1eq.)的L-硒代甲硫氨酸加入配备有温度计、大的冷却指针(在出口具有气泡检查仪)、氨气入口(到达烧瓶底部)和磁力搅拌棒的2L三颈烧瓶和置于含有CO_2-丙酮冷却浴的2.5L双层容器中。Ar°通过烧瓶,然后加入固体CO_2至丙酮浴和冷却指针。当烧瓶内部的温度下降低于-35°C时,开始无水氨(气体)流和当液氨水平达到800ML体积时,气流停止。此时加入小块的金属钠至充分搅拌的溶液中,直到溶液的蓝紫色保持约30秒。在45min内总共加入2.645G (115mM,2.3 eq.)的钠。保持搅拌和冷却另外30min。此时所有组分在溶液中。单次加入14.856G (52mM,1.04 eq.)的无水5'-氯-5'-脱氧基腺苷和放置反应混合物过夜,伴随搅拌和极慢Ar°流。第二天早上(如果所有氨消失)加入350ML的无水甲醇至烧瓶中存在的白色固体。将烧瓶置于油浴中,安装回流冷凝器,保持Ar°气流和将油浴加热至50°C持续随后24h。此时用几滴0.1N HCl将1ML的溶液酸化至pH 3.5和使用质谱法分析样品中底物的存在。如果它们低于5%,则可用1N HCl将混合物酸化至pH 3.5,从盐过滤,使用真空旋转蒸发器浓缩至干和可通过自水-乙醇混合物结晶将粗产物纯化。15.98G (74%收率)的第一批硒代腺苷高半胱氨酸晶体是~95%纯净的,可用于生物学研究无需进一步纯化。

[0311] 实施例3

γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸的合成和表征

合成方案和方法如下:



N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu(655-90)的合成

将N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OH (303mg,1.0Mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(121mg,1.05Mmol)和二环己基碳二亚胺(227mg,1.1Mmol)悬浮/溶于15mL的无水乙醚中,和自注射器加入10uL的二甲基乙基苄基胺至反应混合物。在环境温度下(22°C)保持搅拌48h。将混合物过滤,和沉淀用10mL乙醚洗涤10次。滤液在高真空下浓缩和干燥,得到白色结晶产物(570mg,~90%收率)。MS (M+Na^+) = 423.17。

[0312] N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-MeSe-Cys-OH (655-90)的合成

将N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu(570mg,0.9Mmol)、甲基硒代半胱氨酸(175mg,0.8Mmol)、三乙基胺(152mg,209μL,1.5Mmol)加入6mL的1,4-二噁烷和2mL水的混合物。磁力搅拌反应混合物,保持100h。之后加入1.21N HCl (1.65mL),反应后混合物用3x 20mL乙醚萃取,使用真空旋转蒸发器将萃取物浓缩至干,得到649mg的蜡状产物,对其进行制备型HPLC。收集283mg的产物(75.6%收率)。质谱证实产物的分子量和其中存在单个Se原子。理论Ms $C_{18}H_{32}N_2O_7Se$ =468.42;实测469.24 m/e (M+H^+)和491.24 m/e (M+Na^+)。

[0313] γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸 (655-92)的合成

将283mg (0.6Mmol)的N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-MeSe-Cys-OH、2mL硫代苯甲醚和5mL三氟乙酸的混合物用磁力搅拌在油浴中在63°C加热6h和在环境温度下(22°C)放置过夜。之后将反应混合物加入(逐滴)至剧烈搅拌的乙醚(20mL)。形成的沉淀用2x 20mL的乙醚洗涤,得到138.3mg的膏状沉淀,其然后通过制备型HPLC纯化。

[0314] 实施例4

在细胞培养中单独或组合测试三种合成的硒有机化合物对线粒体功能、细胞存活和基因表达的作用。测试的细胞包括肝细胞、肾细胞、神经元细胞和骨骼肌。

[0315] 材料和方法

细胞系和AT化合物

人胚肾HEK293T细胞由Qiutang Li博士(University of Louisville)慷慨提供。小鼠

骨骼肌成肌细胞C2C12细胞系由Xiao博士(University of Kentucky)馈赠。人成神经细胞IMR-32细胞和小鼠肝细胞系AML-12购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,Manassas,Virginia)。所有这些细胞在ATCC建议的培养基中扩增。

[0316] 化合物C(5'-甲基硒代腺苷)、D(Se-腺苷-L-高半胱氨酸)和E(γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸)和它们的硫类似物H(5'-甲基硫代腺苷)、I(S-腺苷-L-高半胱氨酸)和J(γ-谷氨酰基-甲基-半胱氨酸)鉴定为具有低于2%无机硒的硒化酵母的单独化合物,并且经合成或自商业来源获得(在合适时)。所有测试的化合物的纯度经验证为≥ 99%,如通过质谱法所测定的。

[0317] 在HEK293T细胞中线粒体电位的荧光分析

HEK293T细胞在8-室玻璃载玻片上培养(1X10^{4}细胞/室) 24小时,然后用各种浓度的化合物或其相应的硫类似物处理(溶于无菌水) 4.5 hr。根据制造商的方案,这些化合物处理的细胞用PBS漂洗两次,和用Mitotracker橙色荧光染料(Invitrogen)在37°C孵育30 min,然后替换为新鲜的PBS。然后使用Zeiss Axio Vert.A1荧光显微镜(Thornwood,NY)记录这些活细胞的荧光信号(线粒体电位)。在荧光显微镜下分析至少三个样品/处理组。

[0318] 在C2C12、IMR-32和AML-12细胞中线粒体电位的定量分析

对于C2C12细胞,将相等数量的细胞(1X10^4)接种于Corning 96-孔透明底和黑壁细胞培养板(VWR),在10%FBS DMEM培养基中培养24 hr,然后用溶媒(无菌水)、化合物C和D和它们的硫类似物处理24和48 hr。这些溶媒-或化合物-处理的细胞用PBS漂洗两次,用Mitotracker橙色荧光染料在37°C孵育30 min,然后替换为PBS。这些活细胞中的Mitotracker橙色荧光强度(线粒体电位)通过Bio-TeK Synergy HT Multi-Mode荧光微板阅读器(Winooski,VT)测定。对于上述分析检查8个样品/各处理,和数据表示为8个样品的平均值 ± SEM。

[0319] 对于AML-12肝细胞,细胞在补充1X胰岛素/转铁蛋白/硒(ITS,Sigma)的10% FBS Dulbecco改良的Eagle培养基和Ham's F12培养基(1:1) (DMEM/F12)培养基中扩增。然后将相同数量的细胞(1X10^{4}细胞/孔)接种于Corning 96-孔透明底和黑壁细胞培养板(VWR,Radnor,PA),在无ITS 10% FBS DMEM/F12培养基中培养24 hr,然后进行各种化合物或化合物的组合处理6、24和48 hr。活细胞中的线粒体电位使用上述的Mitotracker橙色染料通过荧光强度的定量分析测定。此外,根据制造商的方案,上述处理的细胞还用Hoechst 33342染料(Invitrogen,Grand Island,NY)孵育以对细胞核染色。通过Hoechst 33342染料染色的细胞核的荧光强度也通过荧光微板阅读器测定。在活细胞中的线粒体电位/细胞通过在各孔中标准化Mitotracker橙色染料的荧光强度至Hoechst 33342染料的荧光强度获得。对于上述分析检查8个样品/各处理,和数据表示为8个样品的平均值 ± SEM。

[0320] 类似于对AML-12细胞的上述研究,在活的IMR-32细胞中的线粒体电位/细胞使用Bio-TeK Synergy HT Multi-Mode荧光微板阅读器测定,具有以下修改。为改进IMR-32细胞附着至培养皿,细胞培养板用0.1%明胶(Sigma,St. Louis,MO)预包被。将2X10^{4}细胞/96-孔接种于明胶化的96-孔板用于上述研究。为减少细胞移动,在溶媒-或化合物-处理后将Mitotracker橙色和Hoechst 33342荧光染料(稀释于培养基)直接添加至各孔。在染料孵育后,将细胞培养基小心置换为1X PBS用于在微板阅读器上定量分析荧光。对于上述分析检查8个样品/各处理,和实验重复至少5次。数据表示为8个样品的平均值 ± SEM。

[0321] 细胞成活力测定法

培养细胞的细胞成活力使用Promega的CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay试剂盒，根据制造商的方案测定。简言之，将相等量的C2C12 (1X10^{4}细胞/孔)、AML-12 (1X10^{4}细胞/孔)和IMR-32 (2X10^{4}细胞/孔)接种于96-孔澄清的板(VWR)和用溶媒或化合物处理24、28和/或72 hr。然后，培养细胞用AQueous One solution (100 ul/孔)在37°C孵育1 hr，和各样品中OD490 nm的吸光度通过Bio-Tek微板阅读器测定。培养细胞的细胞成活力通过培养细胞的OD490 nm减去单纯培养基(未接种细胞)的OD490 nm来确定。对于上述分析检查8个样品/各处理。数据表示为8个样品的平均值 ± SEM。

[0322] RNA分离和实时PCR分析

将人IMR-32细胞接种于明胶化的6-孔(6.5 X 10^{5}细胞/孔)或24-孔(1.3 X 10^{5}细胞/孔)板，而小鼠肝AML-12细胞在未包被的6-孔(3.33 X 10^{5}细胞/孔)或24-孔(6.7 X10^{4}细胞/孔)板上培养。细胞用溶媒(对照)或各种化合物处理6、24或48 hr。使用Trizol (Invitrogen)，根据制造商的方案自这些细胞分离总RNA，然后用DNase I孵育以除去任何可能污染的基因组DNA。然后使用Applied-Bioscience的RT试剂盒和预设计的Taqman探针(Invitrogen)，将RNA样品进行实时PCR分析，如之前所述(Lan等EMBO J 2003)。在各处理组中分析3-6个样品。数据通过各样品中的肌动蛋白B (Actb)或甘油醛磷酸脱氢酶(Gapdh)水平标准化，和表示为3-6个样品的平均值 ± SEM。

[0323] 蛋白制备和蛋白质印迹分析

将IMR-32和AML12细胞接种于6-孔板，然后用溶媒和各种化合物处理6和24 hr，如上文所述。在处理后，细胞用冰冷的PBS漂洗和在含有完全蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Themo-Fisher Scientific,Waltham,MA)的冰冷的RIPA缓冲液中在冰上裂解30 min。使用细胞刮刀和移液管收集细胞裂解物，然后以12000 *g*在4°C离心30 min以除去DNA沉淀，和得到蛋白提取物。这些细胞裂解物的上清液中的蛋白水平使用Pierce Micro-BCA蛋白测定试剂盒(Themo Scientific-Piece Biotechnology,Rockford,IL)，根据制造商的方案测定。

[0324] 对于蛋白质印迹分析，将来自溶媒-和化合物-处理的细胞的5微克总蛋白进行SDS-PAGE凝胶分离，然后转移至PVDF膜，如之前所述(Reddy,Liu等 2008 Science)。将膜在含有5% (w/v)的牛血清白蛋白(Sigma,St. Louis,MO)的磷酸盐-缓冲盐水(PBS)中封闭和用特异性第一抗体孵育，接着用HRP-缀合的抗-小鼠或抗-兔第二抗体(1:5000稀释，Cell Signaling Inc.)孵育。除了G6PC (Santa Cruz)、Actb (Li-COR,Lincoln,Nebraska)、Elf2bε和pElf2bε (Abcam,Cambridge,MA)之外，所有第一抗体购自Cell Signaling Inc。膜印迹上的阳性信号使用Amersham的增强型化学发光蛋白质印迹最佳检测试剂(Prime Detection reagents)(GE healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)检测。在膜印迹上的这些发光信号的图像使用LI-COR Odyssey Fc Image系统(Lincoln,Nebraska)捕获。将相同的膜印迹切成条状和按GE WB ECL-最佳检测方案所述(GE healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)，用另一抗体再次印迹。蛋白质印迹上的蛋白条带密度使用Li-COR Image studio软件或NIH ImageJ软件测定，然后通过各样品中的Actb水平标准化。数据表示为3个样品/各组的平均值 ± SEM。

[0325] 统计学分析

如适用，进行Student's t-检验以确定两组之间的统计学差异。低于0.05的P值被认为

是显著的。

[0326] 结果和讨论:线粒体功能

为测试在培养的人肾细胞中化合物C或D是否可提高线粒体("MT")电位,将HEK293T细胞用37.5和75 ppb的化合物C或D处理。这些量基于用SeaHorse测定法的研究,其中发现有效剂量为100-150ppb。化合物C以及其硫类似物H用HEK293T细胞孵育4.5小时和在显微镜下进行荧光分析。如图1所示,较低剂量(37.5 ppb)的化合物C提高MT电位,而在用较高剂量(75ppb)的化合物C处理4.5 hr的肾细胞中对MT电位具有较少影响。相比之下,所有测试剂量的化合物D不影响MT电位(图1)。

[0327] 我们的结果清楚地证实,化合物C提高肾细胞中的MT电位,而化合物D没有效果。考虑到硒存在于化合物C和D两者中,和它们各自的硫类似物H和J证明不能刺激线粒体活性,得出结论,在肾细胞中化合物C的刺激作用归因于硒和在该有机硒化合物中围绕硒的分子结构的组合作用。刺激活性不归因于单独的硒作用。

[0328] 能够增加肾细胞中的线粒体活性的重要性可具有非常显著的健康益处,尤其是在糖尿病受试者中。最近的研究(Sharma等J AM Soc Nephrol,2013: 1901-12)从来自糖尿病群体的尿液的代谢分析得出结论,糖尿病肾病明显与线粒体功能降低有关。糖尿病肾病(DKD)是末期肾病的主要原因,作者得出结论,恢复或增加线粒体功能的治疗性方法能够改善或甚至阻止DKD。额外的兴趣在于作者将在这些病例中的线粒体功能障碍与称为PGC1a的转录辅激活因子联系起来的事实。如后面所讨论的,PGC1a是本申请中所述的合成的硒化合物的靶标。

[0329] 在小鼠C2C12细胞中化合物C和D提高线粒体电位

为了测试化合物C和D是否在骨骼肌细胞中影响MT电位,将C2C12细胞用溶媒(水,对照)或各种浓度的硒和硫化合物处理,然后进行MT电位的定量分析。如图2所示,在C2C12细胞中在用硫类似物处理24 hr后MT电位降低(与对照相比),表明硫化合物在骨骼肌细胞中显示一定的MT毒性。相比之下,硒化合物C和D显著地提高MT电位(图2)。

[0330] 该结果的两个方面是特别出人意料和不可预期的。首先,化合物D,尽管在肾细胞中失活,但在肌细胞中在刺激线粒体活性时高度有效(在其最有效剂量下是对照水平的大约2倍)。此外,在较低剂量(37.5和75 ppb,图2)下,其证明了比化合物C更有效,化合物C(如上文所示)是在肾细胞中唯一有效的测试化合物。

[0331] 第二,C和D的硫类似物,并非仅相对于溶媒-处理的对照细胞没有作用,而是对线粒体活性具有抑制性(在一些情况下降低了2/3)。该作用在过去并未报道,但可有助于解释使用富硒酵母制备物的一些研究已经报道了在接受这些补剂的受试者中的前-糖尿病作用的原因。尽管在硒富集过程中硒替换在酵母的正常的含硫分子中的硫,但在最终制备物中总是存在一定优势的含硫分子(硫是大量元素,不可能从任何生长或发酵过程中完全除去)。因此,在一些情况下富硒酵母中某些含硫分子的存在可抑制线粒体活性和随时间导致前-糖尿病状态。文献中充分证明了成人发作型糖尿病与在数年的时间内线粒体活性逐渐降低有关。在骨骼肌的情况下这特别重要,估计骨骼肌利用每日摄取的葡萄糖的75-80%。甚至肌肉线粒体有效利用葡萄糖的能力的适度降低可随时间导致严重健康问题。例如,响应化合物D时在C2C12肌细胞中注意到线粒体活性的2倍刺激,可代表在前驱-糖尿病或糖尿病受试者的肌肉组织中避免或延迟线粒体降低的一种方式。

[0332] 为研究观察到的化合物C和D导致的MT电位增加是否仅归因于活细胞数的增加，我们进行了细胞成活力测定法。发现在用相同剂量的这些化合物处理24 hr和48 hr后，化合物C和D不影响C2C12细胞的细胞成活力(数据未显示)。总之，我们的结果表明，化合物C和D对细胞存活不具有负面影响，但是可在C2C12细胞中短暂提高MT电位。

[0333] 在IMR-32细胞中化合物C、D和E短暂提高MT电位

为研究在神经元细胞中硒化合物是否可调节MT功能，将人IMR32细胞用各种化合物处理6、24和48 hr，然后进行线粒体电位测定法。如图3所示(上图)，与对照正常细胞(用水溶媒处理)相比，化合物D或E或两者的组合处理6 hr显著地提高MT电位，而在化合物C处理的IMR-32细胞中也观察到MT电位升高的趋势。在用化合物H或I和J处理的细胞中也观察到MT电位增加(与对照相比，图3上图)。然而，在用化合物D或E或DE组合处理的细胞中比它们相应的硫类似物，MT电位提高更加显著(图3上图)。

[0334] 在化合物处理后24小时，在所有硒化合物-处理的细胞中观察到MT电位显著增加(与对照相比)。一般而言，在用硒化合物C、D、E或CDE的组合处理的细胞中与它们的硫类似物H、I、J或HIJ的组合相比，MT电位提高更加显著。应注意，在一种情况下，在24 hr时间点，I和J的组合产生最高的线粒体反应。然而在48 hr，在所有测试组中MT电位没有显著变化。总之，这些结果表明，硒化合物C、D、E或这些化合物的组合可在IMR-32细胞中短暂提高MT电位和这些硒化合物的作用比它们的硫类似物更明显。

[0335] 再次，在本实验中明显存在显著的细胞特异性和化合物特异性反应，这强调了细胞类型对这些特异性硒化合物和它们的组合的不同反应。此外，不是如肌细胞的情况下对线粒体活性具有抑制性，硫化合物在IMR-32细胞中刺激线粒体活性 - 虽然通常程度低于硒化合物。在该情况下观察到的瞬时或暂时作用表明这些化合物或它们的组合必须重复给予所治疗的受试者，以保持对线粒体活性的作用；基本上可能需要每日剂量。

[0336] 在IMR-32细胞中通过重复D或E处理总共48小时提高MT电位

上文观察到的化合物C、D和E对MT电位的短暂作用提示我们测试重复处理是否可提高MT电位。因此，IMR-32细胞首先用化合物C、D或E处理24 hr，然后用新制备的化合物C、D或E再次处理另外24 hr。作为阴性对照，IMR-32细胞用化合物C、D或E仅处理一次48 hr。然后，对这些细胞进行MT电位测定。如所预期的，化合物C、D或E延长单次处理48 hr (继续48 hr单次处理)在IMR-32中不影响MT电位(图4上图)。然而，化合物D (15和150 ppb两者)或E(剂量150 ppb)的重复处理显著地提高MT电位(与对照或硫类似物I或J相比)。

[0337] 化合物C、D、E对IMR-32细胞的细胞存活无毒性作用

为测试硒化合物对IMR-32细胞的存活是否存在任何毒性作用，在用各种化合物处理24、48和72小时后对细胞进行细胞成活力测定。如图5所示，对于测试的时间点，所有化合物的处理在IMR-32中不导致活细胞显著降低。事实上，在硒化合物处理48和72小时后在细胞中存在少但明显的细胞成活力增加(图5中图和下图)。这些数据表明，硒化合物对IMR-32细胞的存活不具有毒性作用，而是对神经元细胞的存活具有小但显著的有益作用。然而应注意，在本实验中任何观察到的细胞成活力增加太微小，而不能解释在响应某些硒化合物或它们的类似物时在IMR-32细胞系中观察到的MT电位的增加。

[0338] 实验数据证实选择的合成硒化合物在自大鼠脑分离的线粒体中增加或降低线粒体活性的能力

水溶性提取物获自硒化酵母。水溶性提取物占制备物中存在的总硒的至多25%。我们推论这些硒物质在硒化酵母通过肠道时首次自硒化酵母释放/消化。在通过质谱法鉴定提取物中的含硒化合物后，我们合成了许多含硒化合物和肽。因此，该轮合成和纯化产生一组9种含硒物质，用于进一步测试。鉴于由此产生的物质的量很少(低毫克量)，认为在活动物中进行饲喂研究是不实际的。因为我们主要关注这些硒物质对线粒体生物能量的可能作用，所以决定直接使用线粒体测试这些硒分子。

[0339] 开始测试浓度范围低(50ppb)、中(500 ppb)和高(1ppm)的硒作为化合物的可能范围。根据在中-范围内未观察到对线粒体的毒性，我们选择500ppb (5uM)浓度用于进行我们的化合物筛选，使用线粒体生物能量作为主要的结果度量。成年大鼠脑ficoll纯化的线粒体用9种化合物在37°C孵育30分钟，然后一式三份加载至Seahorse Biosciences流量分析仪。我们测量了在三个呼吸阶段下的OCR (氧消耗速率)参数，所述阶段包括ATP合成(阶段III)、复合物I依赖性(NADH-驱动的)最大呼吸能力(阶段V $_{FCCP}$)和复合物II (FADH-驱动的)依赖性最大呼吸能力(阶段V_{succ})。

[0340] 结果表明源自水提取物的不同的硒化合物在能够增加线粒体电位方面具有不同的活性。

[0341] 化合物5:缬氨酸-硒代甲硫氨酸-精氨酸

化合物6:亮氨酸-缬氨酸-硒代甲硫氨酸-精氨酸

化合物7:亮氨酸-苏氨酸-甘氨酸-硒代甲硫氨酸-丙氨酸-苯丙氨酸-精氨酸

化合物8:硒代谷胱甘肽二聚体

化合物9:甲基硒代腺苷

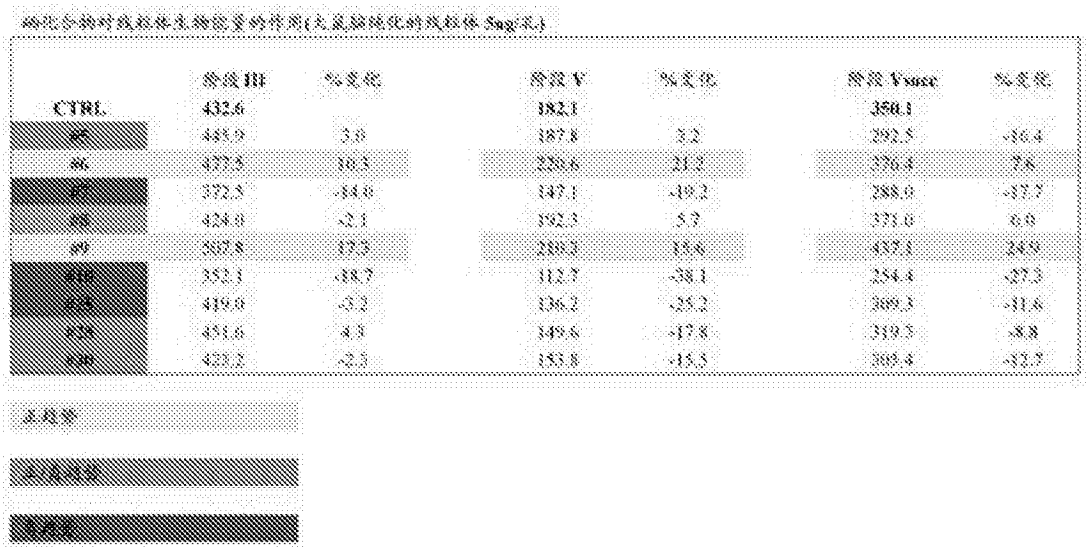
化合物10:谷氨酰基硒代半胱氨酸

化合物25:酵母的总水提取物，pH 6.0

化合物28:氧化的谷胱甘肽

化合物30:谷氨酰基半胱氨酸

表1



	阶段III	%变化	阶段V	%变化	阶段Vsucc	%变化
CTRL	432.6		182.1		350.1	
[illegible]	445.9	3.0	187.8	3.2	292.5	-16.4
[illegible]	477.5	10.3	220.6	21.2	376.8	7.6
[illegible]	372.5	-13.9	147.1	-19.2	288.0	-17.7
[illegible]	424.0	-2.1	192.3	5.7	371.0	6.0
[illegible]	507.8	17.3	210.3	15.6	437.1	24.9
[illegible]	352.1	-18.7	112.7	-38.1	254.4	-27.3
[illegible]	419.0	-3.2	136.2	-25.2	309.3	-11.6
[illegible]	451.6	4.3	149.6	-17.8	319.3	-8.8
[illegible]	423.2	-2.3	153.8	-15.5	309.4	-11.7

[illegible]

[illegible]

[illegible]

具体而言，化合物6和9增加线粒体电位，而化合物7、10和25抑制线粒体电位。这些结果表明源自硒化酵母的水提取物的化合物对线粒体电位具有非常不同的作用，这使我们分

离、筛选和合成候选化合物，目的在于仅选择对生物过程产生阳性反应的那些化合物。

[0342] 实验数据证实合成的硒化合物在自大鼠脑分离的线粒体中恢复应激的线粒体至正常活性的能力

以下实施例描述了在SeaHorse外部流量分析仪上进行的实验；所述分析仪为用于测量表示为氧消耗速率或OCR的线粒体呼吸速率的仪器。所述实验使用来自用正常实验饲料维持的正常大鼠的脑皮层的线粒体，所述饲料未用任何额外的硒来源强化。图6显示正常线粒体的呼吸图（上线），其中最终的OCR为在图线末端与X-轴之间的测量的距离。

[0343] 相同线粒体制备物的相同样品以与对照样品完全相同的方式处理，除了加入钙（10微摩尔终浓度）以通过使它们除极化而应激或损害线粒体。如所示的（下线），OCR从值1,677下降至1,066皮摩尔/min O_2。

[0344] 再次，相同的大鼠脑皮层线粒体样品按上所述孵育，除了它们包含钙（10μM）和分别150 ppb的化合物D和E之外。C未测试。明显的是，在化合物D的情况下，化合物处理的钙应激的线粒体的OCR恢复至接近对照水平，即1,564皮摩尔/min O2，和在化合物E的情况下为1,531皮摩尔/min O2。

[0345] 根据该结果和使用大鼠脑线粒体重复实验的那些结果，我们得出结论，合成的硒化合物不仅具有增加正常线粒体的线粒体活性的能力（参见使用各种类型的未应激细胞的实施例），而且可恢复应激或损害的线粒体的呼吸能力。

[0346] 在小鼠肝AML-12细胞中通过C、D和E的组合而非通过单独的化合物提高MT电位

为了研究硒化合物是否可在肝细胞中调节MT功能，小鼠AML-12细胞用各种化合物处理6和24 hr，然后进行线粒体电位测定。如图7所示，与对照正常细胞（用水溶媒处理）相比，用150 ppb的化合物C、D或E或相同浓度的其相应硫类似物单独处理不显著地影响MT电位。然而，与溶媒-或HIJ-处理组两者相比，C、D和E的组合导致MT电位高度显著增加（图7）。因此，在肝细胞中，化合物C、D和E的特定组合是引起MT电位增加所需要的，而单独的化合物和它们的硫类似物没有影响。该作用完全不同于在神经元细胞中观察到的，并且之前从未在文献中证明。

[0347] 在AML-12细胞中通过化合物C、D和E的组合，UCP2表达下调

具有增加或降低线粒体活性的能力的一个候选的基因家族是所谓的解偶联蛋白基因或UCP。在响应用CDE组合处理时观察到的MT电位升高使我们测试这些基因在溶媒-、HIJ-和CDE-处理的AML-12细胞中是否存在不同调节。在正常的AML-12细胞中，Ucp2 mRNA表达水平是Ucp1的416倍，而Ucp3 mRNA通过实时RT-PCR未检出（图8A，Ucp3数据未显示）。用CDE化合物处理AML-12细胞不影响Ucp1表达（图8B）。然而，用CDE而非HIJ处理后在AML-12细胞中存在Ucp2 mRNA表达显著降低（图8C）。因为Ucp2可抑制MT电位，Ucp2表达降低可至少是在AML-12细胞中通过CDE化合物引起的MT电位提高的一部分原因。因为肥胖患者通常在肝中具有高水平的Ucp2，通过CDE降低Ucp2表达表明CDE化合物可能对于治疗肥胖是有益的。

[0348] CDE化合物对AML-12细胞的存活无毒性作用

为了测试硒化合物对AML-12细胞的存活是否存在任何毒性作用，在用各种化合物处理48 hr后对细胞进行细胞成活力测定。我们发现无处理（单一化合物和它们的组合两者）导致在AML-12细胞中细胞成活力显著降低（图9），这证实了硒化合物对AML-12细胞的存活不具有毒性作用。

[0349] 在IMR-32细胞中化合物C、D和E的组合下调UCP2/3

如先前所述，UCP例如Ucp1、2和3是调节MT电位的关键基因。响应CDE时在IMR-32细胞中观察到的MT电位升高(图3，上两个图)提示我们测试在响应组合处理时这三个基因是否存在差异表达。发现在正常IMR-32细胞中通过实时RT-PCR分析，Ucp1 mRNA不可检出(数据未显示)。用CDE化合物而非HIJ处理IMR-32细胞6小时，导致Ucp2和Ucp3两者的表达显著降低(图10A-B)。在24小时处理时，在HIJ-和CDE-处理组两者中Ucp2表达显著降低(图10A)，而在CDE-处理的IMR-32细胞中还观察到Ucp3表达的显著降低(图10B)。这些结果表明，Ucp2/3下调可能是在响应CDE化合物时在IMR-32细胞中观察到的MT电位提高的至少一个原因。

[0350] 讨论

因此，我们已经提供了证据表明，三种合成的有机硒化合物单独或以各种组合具有在不同细胞类型中显著地增加线粒体活性的能力；所述细胞即肾细胞、骨骼肌细胞、神经元细胞和肝细胞。在机制上，我们注意到UCP的调节可对该增加提供一种解释，并且在下文提供证据表明，对线粒体功能和生物发生是重要的其它蛋白的表达也可受这些化合物有利地影响。然而无论作用机制如何，这些化合物可以跨组织的方式刺激线粒体活性的事实意味着它们在改善表面不同的疾病的发生和进展中可能特别有价值，所述疾病例如阿尔茨海默病(AD)和2型糖尿病(T2DM)。

[0351] 在阿尔茨海默病的情况下，快速增加的文献支持AD起源于在脑中的葡萄糖输入受损、能量代谢缺乏、线粒体功能障碍、慢性氧化应激和DNA损伤的观点(综述于de la Monte和Wands，2008)。例如，许多研究已得出结论，胰岛素缺乏和胰岛素抵抗可介导在AD-变性中观察到的许多影响。此外，已经发现T2DM导致脑胰岛素抵抗、氧化应激和认知损害。脑胰岛素和胰岛素-样生长因子(IGF)-信号转导机制的广泛紊乱可解释AD中见到的许多分子、生物化学和组织病理学影响。

[0352] 美国阿尔茨海默病学会公布的众所周知的统计数值说明，大约80%的AD患者同时具有T2DM。这些和其它原因使许多研究者使用术语“3型糖尿病”来反映AD代表选择性累及脑和具有与1型和2型糖尿病两者重叠的分子和生物化学特征的一种糖尿病形式的事实。

[0353] AD和2型糖尿病之间的联系在科学文献中正变得非常可靠，但是什么才是这些疾病和线粒体功能障碍之间的联系?正是T2DM，其兼有通过胰腺的胰岛素分泌缺乏和在外周组织，特别是肝和骨骼肌中的胰岛素抵抗，这由在长期时间内线粒体呼吸功能的适度和逐渐损失引起(Lowell和Shulman，2005)。因此，可在不同组织中增加线粒体功能的任何试剂作为追踪来源至线粒体降低的病况的干预，可能是非常有价值的。

[0354] 阿尔茨海默病发病的结果和讨论

在IMR-32细胞中化合物C、D和E的组合下调PSEN

已经报道IMR-32细胞是用于研究阿尔茨海默病(AD)发病的合适的体外模型系统(Neill等J. Neuroscience Res. 1994 39:482)。AD的重要病理学特征之一是淀粉样蛋白斑块，其在神经元之间出现，并且其促进脑萎缩和细胞死亡。涉及淀粉样蛋白斑块产生的机制是复杂的，但主要依赖于称为β-分泌酶(BACE)的酶的作用，其与称为γ-分泌酶的多酶复合物一致起作用。总之，在AD中这些酶起作用以异常加工称为淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的脑蛋白。得到的产物是异常的淀粉样蛋白β肽，其凝集在一起形成斑块。

[0355] 如所述的，γ-分泌酶实际上是由四个已知成员构成的多元复合物：早老素-1

(PSEN1或PSEN)、Nicastrin、APH-1(Anterior Pharynx Defective 1)和PEN2 (早老素增强剂2)。PSEN的其它横向同源物是早老素2或PSEN2。尽管所有四个组分对γ-分泌酶正确发挥功能是重要的,但特别的是,两个组分已经成为pipeline治疗药物的焦点。这些组分是早老素1和Nicastrin。这是因为早老素1是γ-分泌酶的实际催化组分 - 该组分在物理上切割淀粉样蛋白前体蛋白。此外,早老素1的基因是在家族性AD中最频繁突变的基因。相对于PSEN2,PSEN1更加丰富,在功能上更好确定。对Nicastrin具有兴趣,不是因为它是催化性的,而是因为它结合和定向APP以致早老素可将其切割。因此,对于聚焦于γ-分泌酶的AD干预,PSEN 1和Nicastrin是具有最大兴趣的靶标。

[0356] 还应注意,数个研究组认为AD源于随人变老而线粒体功能逐渐下降。在这一点上,还有兴趣的是注意到,在AD疾病过程中可测量的优先生理学变化之一是脑细胞摄取和利用葡萄糖不足;明显的是,这两种现象可能是有关联的。因此,我们检查了在用化合物C、D和E的组合(CDE)以及它们的硫类似物的组合(HIJ)处理的IMR32细胞中编码PSEN的基因的表达。

[0357] 我们发现在正常的IMR32细胞中PSEN的表达几乎是PSEN2的8倍(图10C)。更重要的是,与对照或HIJ组相比在CDE-处理的细胞中PSEN1表达显著地降低(图10D)。相比之下,在对照、HIJ和CDE组之间PSEN2表达没有明显变化(图10E)。这些结果表明,硒化合物可在IMR-32细胞中选择性地下调PSEN而不是PSEN2表达,和在CDE化合物中可存在针对淀粉样蛋白斑块形成的前导物。

[0358] 化合物C,一种在IMR-32细胞中通过靶向γ-分泌酶复合物基因PSEN和Nicastrin用于在AD中防止切割用于形成斑块的APP的前导化合物

如上文所述(图10D),化合物CDE混合物抑制PSEN表达,表明在这三种化合物中存在针对用于产生淀粉样蛋白β肽的γ-分泌酶组分的生物前导物。该研究限于PSEN表达,但因为γ分泌酶是多酶复合物,另一重要的组分蛋白Nicastrin包括在该特定实施例中。为了鉴定前导化合物,IMR-32细胞用单独的化合物处理和进行蛋白质印迹和RT-PCR分析。

[0359] 如图11A所示,在通过化合物C处理24 hr后,PSEN和Nicastrin而非PEN2和β-分泌酶BACE蛋白在IMR-32细胞中削弱。定量分析表明,仅C导致PSEN和Nicastrin蛋白水平两者的显著降低,而D和E化合物也引起Nicastrin蛋白表达降低的趋势(图11B-C)。与PSEN表达削弱一致,不仅在处理6 hr而且在24 hr时,化合物C显著地降低PSEN mRNA表达(图11D-E)。类似地,在IMR-32细胞中在处理6 hr后,化合物C处理还导致Nicastrin mRNA表达降低的趋势(图11F),和更重要的是,在24 hr处理后在IMR-32细胞中Nicastrin mRNA表达显著降低(图11G)。相比之下,在IMR-32细胞中化合物D和E处理不抑制,而是刺激PSEN和Nicastrin mRNA表达(图11E和11G)。

[0360] 总之,我们的数据表明化合物C可在mRNA和蛋白水平两个水平上抑制PSEN和Nicastrin两者的表达。这些结果表明化合物C是三种候选物中的抗-AD化合物,并且通过靶向已知在AD中导致斑块形成的γ-分泌酶复合物组分,更特别是PSEN和Nicastrin而实现。

[0361] 化合物C,一种在IMR-32细胞中针对Tau蛋白高磷酸化的细胞特异性GSK3b下调剂

除了淀粉样蛋白斑块之外,AD中第二主要的病理学被称为神经原纤维缠结、NFT或简称缠结。已经充分表征了AD中缠结形成由称为Tau蛋白的高磷酸化引起和该磷酸化由激酶例如DYRK1A (双特异性酪氨酸-磷酸化-调节激酶1A)和主要是Gsk3b (糖原合酶激酶3β)引

起。为了研究硒化合物C、D或E是否有可能促进AD中缠结形成减少，我们首先研究了两种AD标志物pTau S396和pTauS400/T403/S404的磷酸化状态，以及在IMR32细胞中的总Tau蛋白浓度。在指定的位点上Tau的磷酸化与Tau蛋白的失稳和最终形成缠结有关。为此目的，细胞用化合物C、D和E处理6和24 hr，然后进行蛋白质印迹分析。

[0362] 如图12A所示，所有测试的Tau蛋白物质的蛋白水平在6 hr处理时不受影响。然而在24 hr处理后，IMR-32细胞中的pTauS396、pTauS400/T403/S404和/或总Tau的蛋白水平被化合物C和/或E显著地下调。定量分析表明化合物C不影响总Tau蛋白水平，但显著地抑制在S400/T403/S404上而非在S396上的Tau的磷酸化(图12B-C)。化合物D对在所有测试的丝氨酸/苏氨酸残基上的Tau磷酸化或对总Tau蛋白水平没有影响，而在S396和S400/T403/S404上的Tau磷酸化和总Tau蛋白被E化合物显著地下调(图12B-C)。

[0363] 总pTauS396和pTauS400/T403/S404与总Tau蛋白的比率的分析表明，仅化合物C而非D或E在IMR-32中显著地削弱Tau蛋白的总磷酸化，即使存在化合物E导致的在所有测试的丝氨酸/苏氨酸残基上Tau磷酸化降低的趋势(图12E)。

[0364] 总之，我们的数据显示，在IMR32细胞中化合物C可显著抑制Tau磷酸化，但不影响总Tau蛋白，而化合物D在该过程中不具有任何作用。化合物E也可具有调节Tau磷酸化的作用，但该化合物的作用可能通过下调IMR-32细胞中总Tau蛋白进行。鉴于Tau的高磷酸化是AD中缠结形成的原因，我们的数据表明C抑制了促进Ad中缠结形成的Tau高磷酸化。

[0365] 为了研究化合物C下调Tau磷酸化是否归因于Gsk3和DYRK1A (对于AD中的Tau磷酸化的两种关键激酶)，进行蛋白质印迹分析以检查它们的蛋白水平。如图12A所示，在IMR-32细胞中，Gsk3b的磷酸化、总Gsk3a和DYRK1A蛋白不受三种化合物的任一种的影响。然而，在IMR-32细胞中在用化合物C而非D或E处理24 hr而非6 hr后，Gsk3b蛋白水平显著降低(图12A)。定量分析表明，在化合物C而非D或E处理的IMR-32细胞中，Gsk3b蛋白水平统计学显著降低(与对照细胞相比) (图12F)。

[0366] 为了进一步证实Gsk3b表达被化合物C抑制，进行定量RT-PCR以检查其mRNA水平。如图12G中所示，在IMR32细胞中在用化合物C处理6 hr后Gsk3b mRNA水平显著地降低。在用化合物C处理24 hr后还在IMR-32细胞中观察到Gsk3b mRNA表达降低的趋势(图12H)。相比之下，在IMR-32细胞中化合物D和E处理6 hr不显著地抑制Gsk3b mRNA表达(图12G)。而是，在IMR-32细胞中在用化合物D或E处理24 hr后存在Gsk3b mRNA表达显著增加(图12H)。总之，这些数据表明化合物C可在mRNA和蛋白两个水平上抑制Gsk3b表达，化合物C下调GSK3b可能是上文所述的Tau磷酸化降低的原因。

[0367] 为了研究化合物C对Gsk3b表达的抑制作用是否是神经元细胞-特异性的，我们在小鼠肝细胞中检查了其蛋白水平。蛋白提取物自肝细胞与上述IMR-32细胞同时和在相同的实验条件下制备。发现肝细胞中的Gsk3b蛋白水平不受化合物C影响(图16)。因此，Gsk3b表达的下调是神经元细胞-特异性的。从治疗前景来看，肝细胞中GSK3b对化合物C的反应的缺少可能具有重要的价值。这意味着化合物C可在神经元组织中用作治疗剂而不需要冒严重干扰肝糖代谢的风险。

[0368] 总之，我们的结果表明，化合物C是神经元细胞-特异性的Gsk3b下调剂，并且可在神经元细胞中抑制Tau磷酸化，这针对AD中的缠结形成将是有益的。这些数据进一步提供体外证据表明，化合物C可能是在AD领域中有价值的治疗剂。

[0369] 在IMR32细胞中CDE致使FOXO磷酸化的神经元特异性下调和PGC1a蛋白上调

鉴于在IMR-32细胞中观察到的CDE化合物对线粒体活性的作用，我们希望检查这些化合物是否可调节负责细胞生长和代谢、线粒体功能和能量的重要因子。FOXO (Forkhead box)蛋白是重要的核转录因子家族，在细胞增殖、分化和存活中具有不同的作用。它们部分地控制细胞的关键功能，例如糖原异生(自非-糖底物产生葡萄糖)。它们进入细胞核受磷酸化控制，磷酸化的FOXO从核排除，而去磷酸化的FOXO可进入。

[0370] PGC1a (过氧化物酶体增殖子-活化受体γ共激活剂1-α)是调节参与能量代谢的基因的有效的转录激活物，并且还是线粒体生物发生和生长的主要调节剂。它提供外部刺激(例如运动)和线粒体生物发生调节之间的直接关联。通过与不同的转录因子联合以共活化基因，它执行不同的功能。在神经元特异性线粒体活性和AD进展的情况下，有兴趣地注意到，在阿尔茨海默病的脑中PGC1a表达随痴呆进展而降低(Qin等2009. Arch Neurol; 66: 352-361)。

[0371] 因此，我们感兴趣研究CDE化合物的任一种是否可影响这些有效信号转导因子的表达。如图13所示，在IMR-32细胞中在CDE处理6和24 hr后FOXO4和FOXO3的磷酸化下调，而在IMR-32细胞中在24 hr处理后PGC1a蛋白增加。对其它测试的信号转导分子的蛋白表达存在很少或没有作用。PGC1a蛋白提高可促进MT生物发生，其可提供在IMR-32细胞中MT电位被CDE组合提高的原因的另一种解释(图3，上图和中图)。充分表征了FOXO例如FOXO 4在T28和S193去磷酸化导致FOXO蛋白的核定位。该结果强烈表明，CDE化合物的组合很可能提高核FOXO作用。总之，我们的数据表明，在神经元细胞中CDE包含一种或多种FOXO激活剂和正PGC1a调节剂。

[0372] 从在神经元细胞例如脑中的治疗前景上，该结果可能是非常有意义的。充分确立了某些FOXO蛋白和PGC1a在核中共定位可导致糖原异生(葡萄糖产生)的有效活化。尽管这样的情况在糖尿病受试者的肝中可能是不需要的，但在早期AD受试者(其中葡萄糖输入至神经元受损，因此脑细胞缺乏其主要能量来源)的情况下可认为是非常有利的。在这样的情况下，从其它分子的碳骨架产生葡萄糖的能力提高将是非常有利的。

[0373] 为了测试观察到的FOXO和PGC1a活化(上述)是否是神经元细胞-特异性的，我们还检查了在小鼠肝AML-12细胞中它们的蛋白水平。蛋白提取物从肝细胞与IMR-32细胞同时和在相同的实验条件下制备。然而，在后面部分中描述的在肝细胞中观察到的作用(图15)与对IMR-32细胞所获得的作用完全相反，确定地表明CDE导致的FOXO去磷酸化和PGC1a上调不是组织范围内的现象，可能限于神经元细胞。

[0374] 化合物C，一种神经元特异性FOXO激活剂和PGC1a上调剂

如上文所述，CDE化合物一起导致FOXO去磷酸化和刺激PGC1a蛋白表达(图13)。为鉴定CDE混合物中的哪一种化合物具有这些作用，我们检查了在C-、D-和E-处理的IMR32细胞中前述蛋白的表达。如图14A所示，在IMR32细胞中在所有三种化合物6 hr处理后pFOXO4水平显著降低。在24 hr处理后，在C-和E-而非D-处理的IMR-32细胞中还观察到pFOXO4 T28水平降低。定量分析表明C、D和E处理6 hr以及C和E处理24 hr导致的IMR-32细胞中pFOXO4水平降低是统计学显著的(图14B-C)。

[0375] 重要的是注意到，CDE组合和单独的C、D或E处理都不导致总FOXO水平的任何变化(图13和14)，而是通过将其去磷酸化仅改变FOXO作用的控制。FOXO磷酸化降低不大可能归

因于AKT磷酸化的下调，因为pAKT蛋白水平在C-、D-或E-处理的细胞中未明显降低(图14A)。此外，pEIf2beS539蛋白水平也未受C、D或E的影响，表明这些化合物很可能在神经元细胞中不影响蛋白翻译(图14A)。相比之下，PGC1a蛋白水平在所有三种化合物24 hr处理后显著提高(图14A、14D)，这可解释在IMR-32细胞中MT电位被这些化合物上调的原因(图3，上图和中图)。总之，我们的数据表明，化合物C和E是FOXO激活剂和PGC1a上调剂，而化合物D是PGC1a上调剂并且在FOXO磷酸化调节中具有混合作用。

[0376] 讨论

当总体考虑时，我们在神经元细胞中的结果将化合物C作为用于在这些细胞中引发有益作用的有利试剂。尽管上文直接描述的结果表明所有三种化合物都能够导致FOXO去磷酸化和PGC1a上调 -从神经元细胞的能量观点来看非常需要的作用，但应记得，化合物C是引发这些FOXO/PGC1作用和同时显著地降低PSEN和Nicastrin水平(图11)的唯一候选物。此外，在降低IMR-32细胞中的磷酸-Tau水平和GSK3b水平方面(图12)，正是该化合物显示出有利的反应。

[0377] 因此，化合物C似乎是用于在神经元细胞中引发如下三联有益作用的精选化合物：1) 通过刺激总体线粒体电位、增加PGC1水平和降低FOXO磷酸化- 从而允许其核进入，导致对线粒体活性和功能的有益影响；2) 通过降低PSEN1和Nicastrin的表达，在降低淀粉样蛋白积聚中的隐含作用；和3) 通过降低磷酸化Tau和被认为负责Tau磷酸化的酶(GSK3b)的水平，降低Tau缠结形成的隐含作用。

[0378] 再次，为了测试这些作用的细胞特异性，来自CDE组合处理的肝AML-12细胞的蛋白提取物用相同的抗体探查，以检测FOXO磷酸化和PGC1a水平的差异。如图15和16所示，和在后面部分中更详细论述的，用这三种相应的化合物所见到的作用证实了IMR-32细胞作用确定在肝中未观察到。事实上，可以认为观察到直接相反作用，即FOXO磷酸化(核排出)增加、PGC1a水平未改变和GSK3b水平未改变。然而，显然，这些是希望见到的发生在肝中的作用类型，特别是在糖尿病受试者的情况下，其中肝葡萄糖输出需要受到控制。最重要的是，发现完全不同于神经元细胞，肝AML-12细胞对用单独化合物处理无响应，而是，仅对CDE混合物有响应。再次，关于这些化合物的作用模式，这指向非常明确的细胞特异性和不可预期的细胞响应。

[0379] 结果和讨论：肝细胞

通过化合物CDE组合而非通过单独的化合物或它们的硫类似物导致的FOXO磷酸化的肝细胞-特异性和PDK1/AKT-非依赖性上调

正如IMR-32神经元细胞的情况，硒化合物(在该情况下为CDE组合)提高MT活性和调节在细胞能量中控制的关键基因的表达(UCP2)的观察结果提示我们研究该硒化合物的组合对参与肝能量代谢、胰岛素信号转导和细胞增殖的其它关键基因可能具有的作用。因此，对CDE-处理的AML-12细胞进行蛋白质印迹分析。

[0380] 如之前所述，FOXO是在肝中糖原异生和胰岛素敏感性的主要信号转导分子。已经论述了FOXO蛋白的功能受它们的磷酸化状态支配。FOXO磷酸化将它们从核中排除，从而基本上失活它们。去磷酸化允许FOXO蛋白进入细胞核，从而它们可参与涉及能量代谢的几种关键基因的转录调节。如图15A所示，发现在AML-12细胞中在CDE而非HIJ处理6hr后，FOXO3和4 (pFOXO3和pFOXO4蛋白水平)的磷酸化形式显著地升高。定量分析表明在CDE-处理的

AML-12细胞中，pFOXO3增加约2.5倍和pFOXO4增加约3.2倍(图15B-C)。因为FOXO磷酸化导致核排除，以在细胞核中失活FOXO，我们的结果表明CDE将在肝细胞中起到FOXO失活剂的作用。因为在同时和相同实验条件下进行的分析中FOXO磷酸化增加未在CDE-处理的IMR-32神经元细胞中观察到(见上图13)，我们可得出结论，CDE使FOXO失活是肝细胞特异性的。

[0381] 总之，我们的结果表明，CDE组合将起到新的肝细胞特异性FOXO失活剂的作用。事实上，在IMR-32神经元细胞中，FOXO蛋白的显著和高度显著的活化(去磷酸化)在响应单一硒化合物C、D和E或其组合时发生。因此，在这些特定化合物的情况下我们能够在神经元细胞中选择性活化FOXO蛋白和在肝细胞中将它们失活。当在2型糖尿病和阿尔茨海默病的葡萄糖处理的情况下考虑它时，这一发现的总体重要性和新颖性变得显而易见。

[0382] 作为简单的背景，在其活化或非磷酸化状态时，FOXO位于细胞核中，其中它结合葡萄糖6-磷酸酶的启动子区，FOXO连同其它因子例如PGC-1a，增加葡萄糖-6-磷酸酶的转录，从而增加葡萄糖产生速率。葡萄糖6-磷酸酶催化糖原异生和糖原分解中的最后一步，导致从肝释放葡萄糖。因此，在控制葡萄糖稳态中，特别是在糖尿病受试者中，这是至关重要的。正常地，FOXO磷酸化的过程受称为AKT (蛋白激酶B)的另一种激酶直接控制。AKT将FOXO磷酸化和驱动它离开细胞核，从而通过降低葡萄糖6-磷酸酶转录速率来降低葡萄糖产生。AKT本身在通过小分子级联反应的下游控制下，其始于胰岛素结合其在细胞表面的受体。这起始一系列事件，包括两种其它激酶，磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和磷酸肌醇-依赖性蛋白激酶1 (PDK1)。整个途径被称为胰岛素/PI3K/PDK1/Akt途径，其具有通过胰岛素信号转导控制葡萄糖稳态的作用。在FOXO控制的情况下，PDK1使Akt磷酸化和活化，其进而使FOXO磷酸化和失活。

[0383] 因为对于肝中胰岛素介导的葡萄糖产生控制，PI3K/PDK1/AKT是FOXO上游的主要的信号转导途径，我们质疑通过CDE提高的FOXO磷酸化是否归因于肝细胞中PI3K/Pdk/Akt信号转导途径的活化。为测试这一点，我们检查了在CDE-处理的肝细胞中pPDK1、pAKT T308和S473和总AKT的蛋白水平。令人惊讶的是，CDE不影响PDK1、AKT的磷酸化或总AKT水平(图15A)。我们还检查了两种其它下游信号转导分子pGSk3a和pGSK3b的水平，它们直接受AKT控制，并且未观察到它们蛋白水平的任何变化(图15A)，这与在CDE-处理的细胞中pAKT未变化一致。对于胰岛素驱动的蛋白合成或翻译是关键的p4Ebp (AKT/mTor信号转导的下游分子靶标)和pElf2be S539 (Gsk3的下游分子靶标)的水平也未受到影响(图15A)。这提供了另外的直接分子证据，即CDE在影响肝细胞增殖/存活方面不具有毒性作用，如先前所述。

[0384] 如在神经元IMR-32细胞的情况下所述的，PGC1a是MT生物发生和糖代谢的重要基因。在肝细胞中，其还与FOXO一致起作用以驱动参与糖原异生的基因的转录，但在细胞核缺少FOXO时不能如此。在CDE组合处理后通过定量分析，我们检查了PGC1a蛋白表达和未观察到肝细胞中PGC蛋白水平的显著变化(图15A和D)。然而，由于在响应CDE时对FOXO磷酸化观察到的稳健作用，几乎确定的是，它将从细胞核中排除，因此PGC1a的水平变得不太重要，这是因为需要FOXO以起始糖原异生过程。总之，这些结果表明，CDE不影响PI3k/PDK1/AKT信号转导和几种其它AKT直接或间接下游信号转导分子，除了上述关键FOXO之外。换句话说，在肝细胞中CDE可选择性失活FOXO，并且该作用显示不依赖于PI3K/PDK1/AKT信号转导。

[0385] 因此，在本质上，CDE在肝细胞中的作用模式可完全不依赖于胰岛素-驱动的PI3k/PDK1/AKT信号转导途径，即它可以是胰岛素-非依赖性的。其重要性对代谢信号转导途径的

领域的技术人员直接变得显而易见，因为在控制肝葡萄糖输出的情况下它减少了肝细胞变成具有胰岛素-抵抗的生理学后果。通过FOXO调节，绕过胰岛素信号转导同时仍能够控制葡萄糖稳态，大体上开启了对于治疗糖尿病的许多治疗可能性；使得其较不依赖于外源胰岛素的给予。

[0386] 此外，从更宽泛的健康前景来看，找到在肝中潜在的AKT-非依赖性FOXO抑制剂的重要性不应被低估。充分确定了PI3k/PDK1/AKT途径是促进细胞生长的原型途径和在许多癌症中具有组成型活性。AKT当活化时，通过FOXO失活，在不同的细胞过程中 - 不仅是葡萄糖稳态，发挥关键作用。在这些其它途径中癌症进展是主要的。在这方面，有兴趣的是注意到，在转化逆转录病毒AKT8中AKT初始被鉴定为癌基因。因此，可发挥AKT关键作用但以AKT-非依赖性方式如此的任何化合物，是非常新颖和有价值的。

[0387] 再次，为了完成我们对化合物特异性的研究，我们希望确定CDE中的单一化合物是否具有在肝细胞中失活FOXO的能力，AML-12细胞用单独的化合物在相同的实验条件下处理。蛋白质印迹分析表明，在单独的化合物-处理的肝细胞中在6或24 hr处理后未观察到FOXO的失活(通过pFOXO增加指示)(图16)。我们还检查了许多其它信号转导分子，未发现在肝细胞中在用C、D或E处理6或24 hr后AKT、Gsk3a/b和Elf2be的磷酸化增加(图16)。观察到的唯一作用涉及到化合物E，其显示在AML-12细胞中在6 hr处理后略微降低pAKT和pEIf2bε S539的水平(图16)。然而，化合物E对AKT的作用必定是不重要的，因为这并未通过化合物E-介导的FOXO(AKT的直接下游靶标)磷酸化降低反映。因此，这未表明E-处理的细胞中潜在的糖原异生的显著改变。EIF2bε的去磷酸化可指示mRNA/蛋白翻译水平增加，但这尚未充分研究。然而，清楚的是，通过这三种硒化合物的任一种，这些蛋白质印迹中测试的种类的蛋白表达未改变(图16)。无论如何，我们的结果表明，单独的硒化合物C、D或E不增加肝细胞中的FOXO磷酸化。因此，在C、D和E化合物之间存在协同作用以在肝细胞中失活FOXO。

[0388] 总之，我们的结果表明CDE而非单独的化合物将起肝细胞特异性和PI3K/PDK/AKT-非依赖性FOXO失活剂的作用。

[0389] 在AML-12细胞中在用化合物CDE硒化合物处理后下调G6pc (一种葡萄糖产生的FOXO下游靶标)的表达

如上述的，葡萄糖6-磷酸酶催化亚基(G6PC)是FOXO的直接下游靶标，其提高葡萄糖产生，特别是在肝中。在CDE-处理的肝细胞中pFOXO (失活)水平提高表明CDE可在肝细胞中起控制葡萄糖产生和提高胰岛素敏感性的作用。硒化合物组合CDE可通过FOXO磷酸化调节糖原异生或糖原分解的真实证据，是观察到在肝环境中G6PC表达降低。为测试该假设，我们通过定量RT-PCR分析，检查了肝细胞中的G6pc表达。

[0390] 如图17所示，用CDE组合而非HIJ硫类似物组合处理AML-12肝细胞，导致肝细胞中G6pc表达的非常显著的45%降低。此外，我们还检查了在用所有单独的化合物处理后AML-12细胞中的G6pc表达和未观察到G6pc表达的任何显著改变(增加或降低) (图17)；该发现与在化合物C-、D-或E-处理的肝细胞中观察到的未改变的FOXO磷酸化水平一致，如通过蛋白质印迹分析测定的(图16)。在使用不同批次的细胞的三个重复实验中观察到在响应CDE组合时G6pc表达降低的作用(数据未显示)。

[0391] 总之，我们的结果证实CDE而非单独的化合物可显著地削弱G6pc表达，从而代表了一种降低肝葡萄糖输出的新方式。我们的总体发现进一步指向这些化合物通过FOXO磷酸化

的AKT-非依赖性增加介导的作用方式。这些数据提供强的体外证据，即在肥胖和2型糖尿病受试者中在控制肝葡萄糖输出的治疗能力上CDE具有显著潜力。

[0392] 总体概述和讨论

我们已经确定了化合物C而非D提高肾细胞中的MT电位，并且化合物C和D两者提高小鼠骨骼肌成肌细胞C2C12细胞中的MT电位。这些结果表明化合物C可用于对抗进行性肾衰竭，和C和D可用于对抗在肾或骨骼肌中MT功能的进行性丧失导致的肌肉减少症(sarcopenia)。在骨骼肌的情况下，鉴于骨骼肌利用每日摄取的葡萄糖的75-80%和骨骼肌中的线粒体功能障碍被认为是T2DM的关键引发剂，我们还预期C和D可能用于T2DM研究和控制领域。

[0393] 此外，我们使用人神经元IMR-32细胞的实验表明，这些化合物之一(特别是化合物C)可独特地对抗AD发病。该结论基于以下重要发现：

(1) C短暂提高MT电位(图3)

(2) 化合物C提高神经元细胞存活(图5)

(3) 神经元细胞-特异性下调FOXO磷酸化(对细胞代谢重要)和上调PGC1a (对MT生物发生重要) (图14与图16的肝细胞数据)；

(4) 对于APP切割，选择性靶向γ-分泌酶复合物基因PSEN和Nicastrin以抑制它们的表达(图11)；

(5) 抑制Tau磷酸化可能对抗AD中的缠结形成(图12)；和

(6) 神经元细胞-特异性GSK3b下调，其再次表明在AD情况下降低Tau磷酸化可能性和减少缠结形成(图12与图16的肝细胞数据)。

[0394] 我们已经鉴定了新的肝细胞特异性和PI3K/PDK1/AKT-非依赖性FOXO失活化合物组合(CDE) (即，CDE的组合，而非单独的化合物)。该化合物组合在肝细胞中通过核排除FOXO蛋白而显著下调G6pc表达。我们预期该组合可特别用于研究和改善自代谢综合征、肥胖和T2DM产生的症状和病理。我们的理由基于以下发现：

(1) 在肝细胞中通过仅CDE组合，而非任何其它化合物或它们的组合显著地提高MT电位(图7)；

(2) 对肝细胞或神经元细胞的存活没有毒性作用(图5、图9)

(3) 通过CDE特异性地和显著地下调解偶联蛋白2 (Ucp2)基因(图8)；在这一点上特别注意的是从最新研究中的发现，即UCP2表达的抑制通过影响胰岛素分泌和作用两者逆转膳食-诱导的糖尿病。

[0395] (4) 通过CDE导致肝细胞特异性FOXO被失活(磷酸化) (图15与图13的神经元细胞数据)；

(5) 注意到通过单独的化合物对FOXO失活没有作用(图16)

(6) 注意到通过CDE对PI3K/PDK/Akt信号转导的磷酸化没有作用(图15)。这表明CDE代表了新的AKT-非依赖性FOXO失活剂。

[0396] (7) 通过CDE(图17)而非通过任何单独的化合物(图17)显著下调关键的FOXO靶基因G6pc。之前论述了肝葡萄糖输出受FOXO-介导的G6pc转录活化的控制。

[0397] 基于以上实验数据，我们认为CDE组合可特异性用作在肝细胞中的有效的FOXO失活剂以降低G6pc表达和降低肝葡萄糖输出。此外，我们证明该作用不依赖于PI3K/PDK/Akt信号转导。该过程可如何起作用的描述显示在图18中。尽管，正常地，FOXO磷酸化和其随后

进入细胞核或从细胞核排除受胰岛素/PI3K/PDK1/AKT途径控制，我们证明了化合物C、D和E的特定组合通过仍未鉴定的激酶导致FOXO磷酸化。从细胞核排除的磷酸化FOXO不能在转录上活化G6PC，其进而导致从肝的葡萄糖输出降低。肝葡萄糖输出降低和血糖浓度相关降低将导致胰岛素-节约作用，即在响应高血糖时对胰腺分泌胰岛素的需求减少。

[0398] 还非常合理的预期，较低水平的血糖可导致外周组织中胰岛素敏感性提高和更受控制的通过胰腺β-细胞的胰岛素释放两者。这就是说，通过胰腺的胰岛素输出将不大可能被过载，这是由于总体上较低的循环葡萄糖水平。从本申请进行和提供的实验，我们不能鉴定对测试的所有细胞类型的生长或途径活化(可发信号启动不受控制的增殖和生长，即导致癌症)的任何负面作用。事实上，从毒性潜力降低的观点来看，这些化合物绕过AKT-信号转导途径(至少在肝中)的能力使得它们特别引人关注。

[0399] 基于上文提供的发现，我们还认为，我们可假设对于特别是化合物C对改善AD病理(淀粉样蛋白斑块和Tau缠结)的影响的作用的可信模型。如图19A-C所示，在IMR-32细胞中表达降低或改变的关键AD相关基因，在它们的基因启动子区具有FOXO 1、3或4的结合基序(位点)。对于Gsk3b (图19A)、Psen1(图19B)和Nicastrin (图19C)，这是真实的。这意味着核定位的FOXO蛋白可结合这些基因启动子和负调节它们的转录。认识到这一点后，因此非常容易地想象这样的情况(图19D)，其中化合物C使FOXO蛋白去磷酸化和允许它们进入细胞核。此处，有活性的FOXO蛋白结合上述基因的启动子区和抑制它们的转录。IMR细胞中较低水平的GSK3b (图12)将导致Tau磷酸化降低，接着作为直接结果，降低微管稳定性和降低缠结形成。

[0400] 同样，FOXO蛋白结合PSEN和Nicastrin的启动子区抑制从这些基因的转录，这导致在神经元细胞中产生较低量的这些关键的γ-分泌酶组分。这自然暗指较低水平的异常APP加工、较低的淀粉样蛋白-β肽浓度和降低的淀粉样蛋白斑块负荷，作为结果。

[0401] 本申请中提及的所有出版物和专利通过引用结合到本文中。在没有脱离本申请的范围和精神的情况下，本申请的所述方法和组合物的各种修改和变化对本领域技术人员而言是显而易见的。尽管已经结合特定的优选实施方案描述了本申请，但应理解，要求保护的本申请不应过度限于这样的特定实施方案。事实上，对相关领域的技术人员而言是显而易见的所述实施本申请的方式的各种修改意欲包括在随附权利要求的范围内。

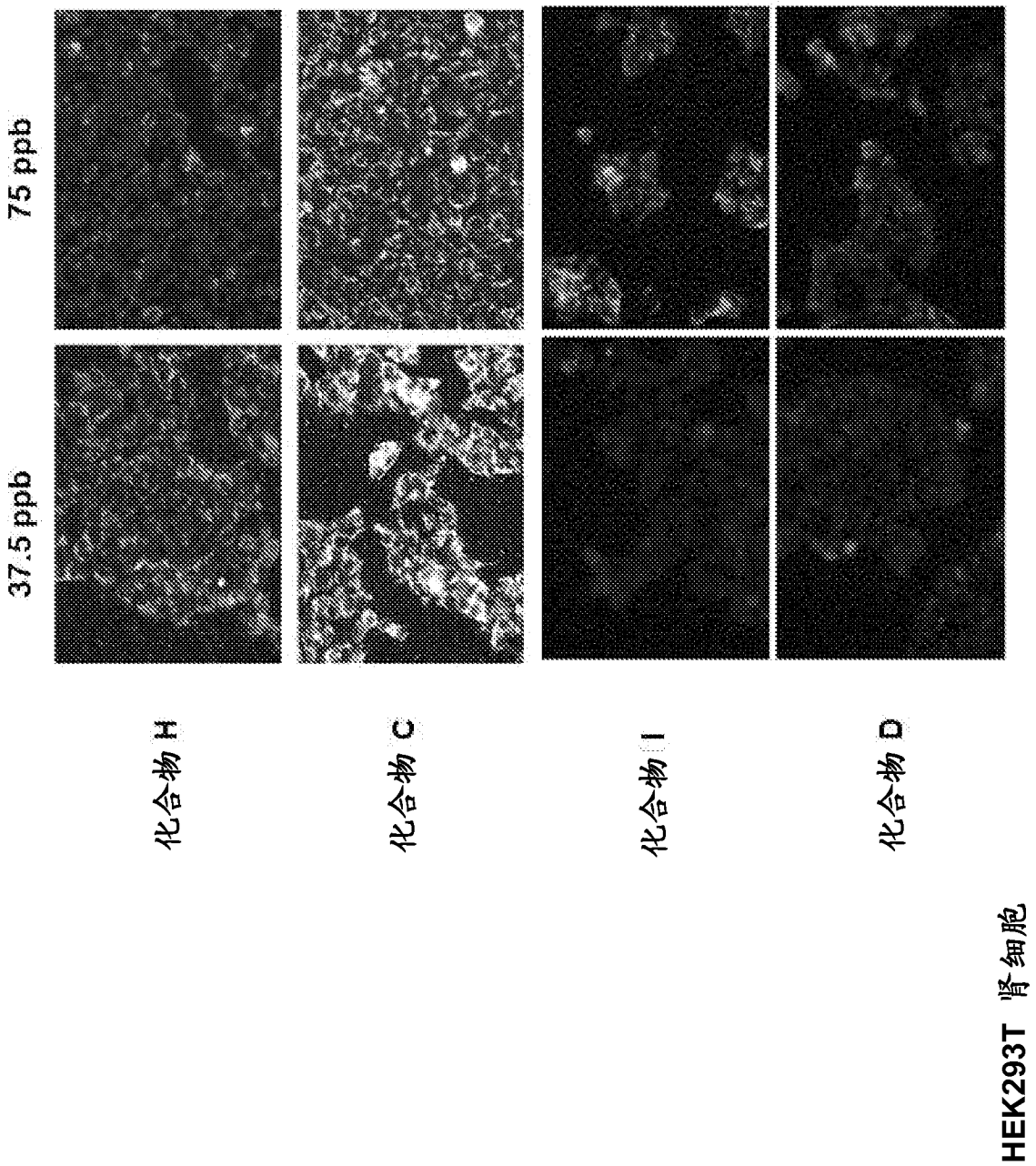


图 1

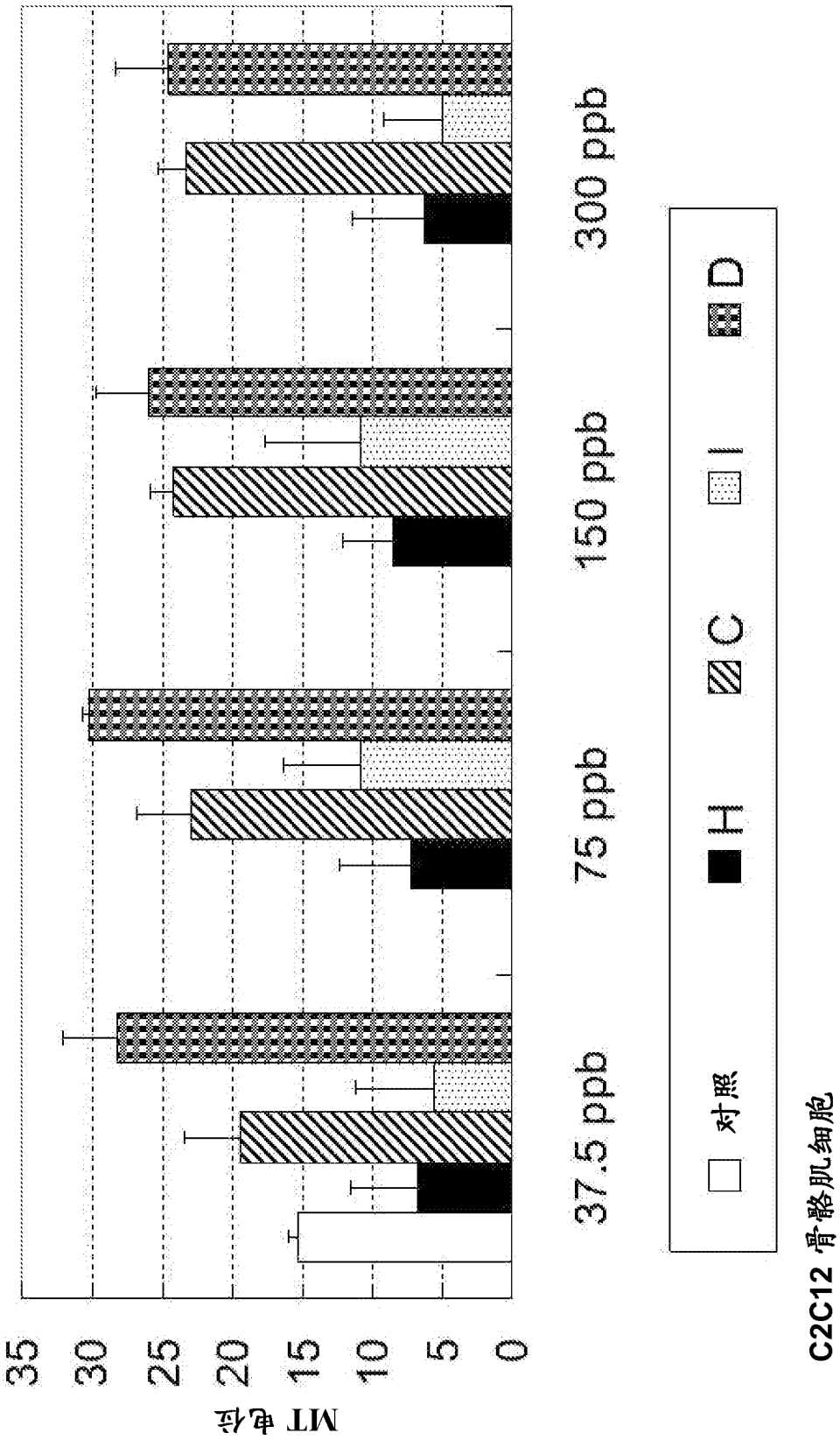

MT 电位
0
5
10
15
20
25
30
35
37.5 ppb
75 ppb
150 ppb
300 ppb
对照
H
C
I
D
C2C12 骨骼肌细胞

图 2

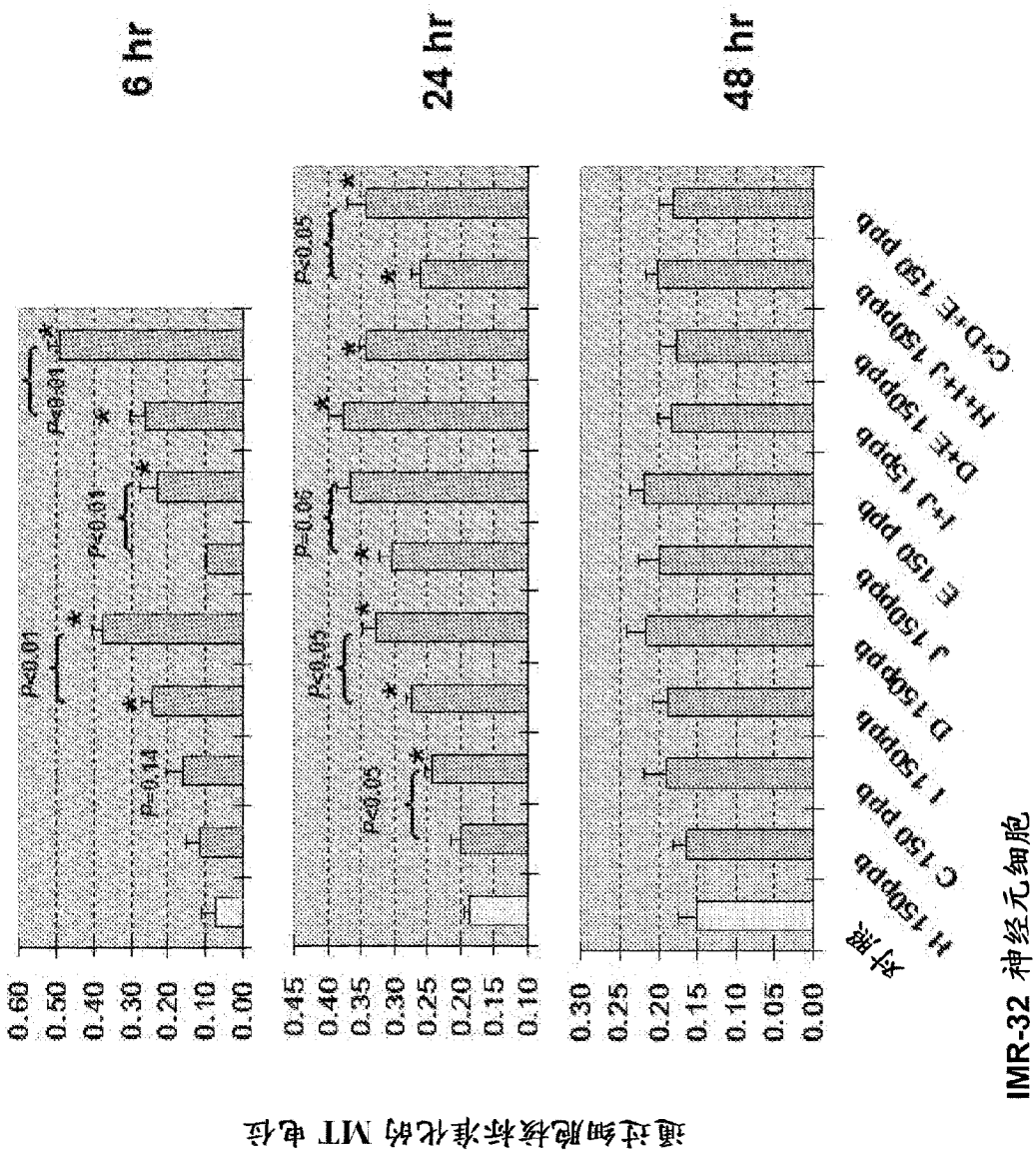

6 hr
24 hr
48 hr
P<0.01
P<0.01
P<0.01
P=0.14
P<0.05
P=0.05
P<0.05
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
对照
H 150ppb
C 150 ppb
I 150ppb
D 150ppb
J 150ppb
E 150 ppb
I+J 150ppb
D+E 150ppb
H+I+J 150ppb
C+D+E 150 ppb
IMR-32 神经元细胞
通过细胞核标准化的 MIT 电位

图 3

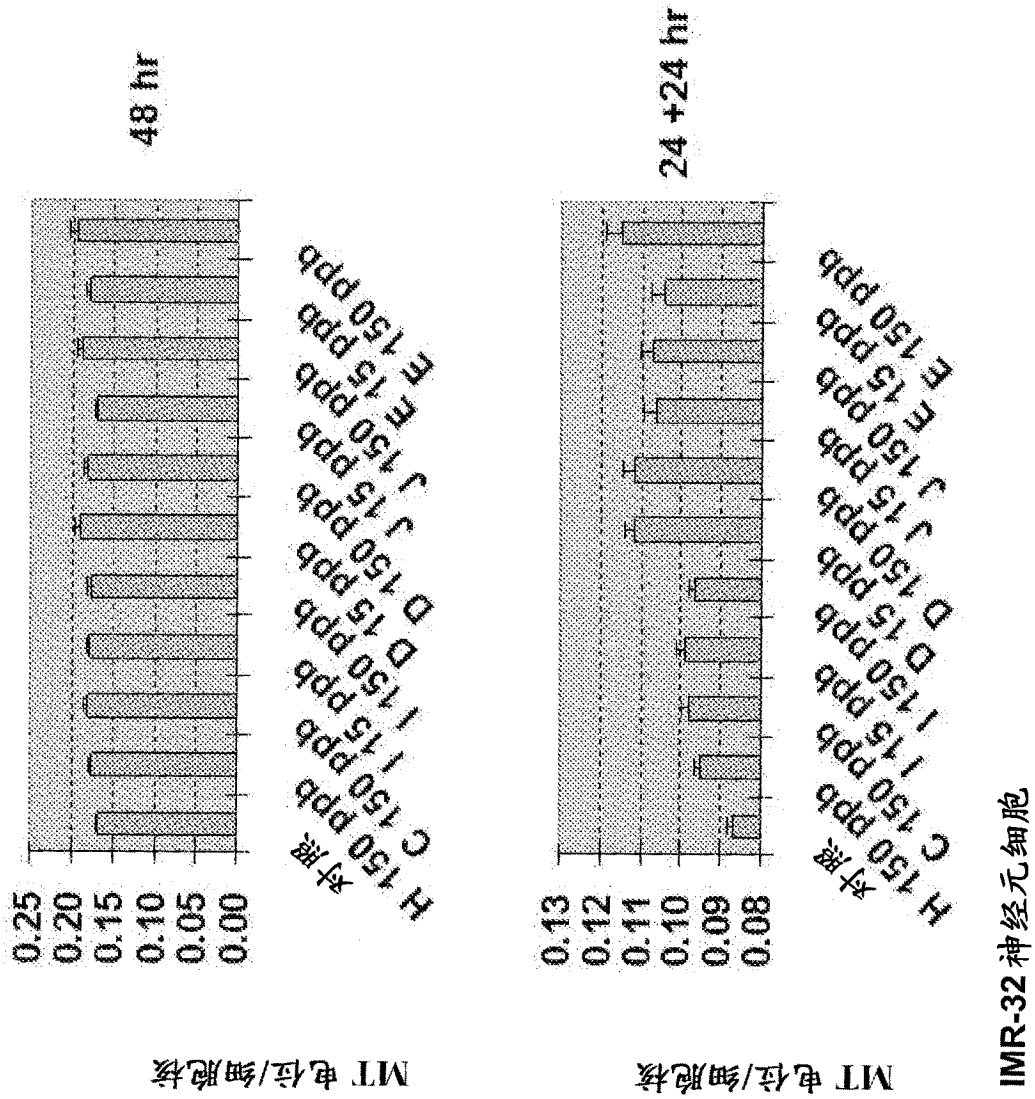

24 +24 hr
MT 电位/细胞核
0.13
0.12
0.11
0.10
0.09
0.08
大鼠
H 150 ppb
C 150 ppb
I 15 ppb
D 150 ppb
J 15 ppb
E 150 ppb
48 hr
MT 电位/细胞核
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
大鼠
H 150 ppb
C 150 ppb
I 15 ppb
D 150 ppb
J 15 ppb
E 150 ppb
IMR-32 神经元细胞

图 4

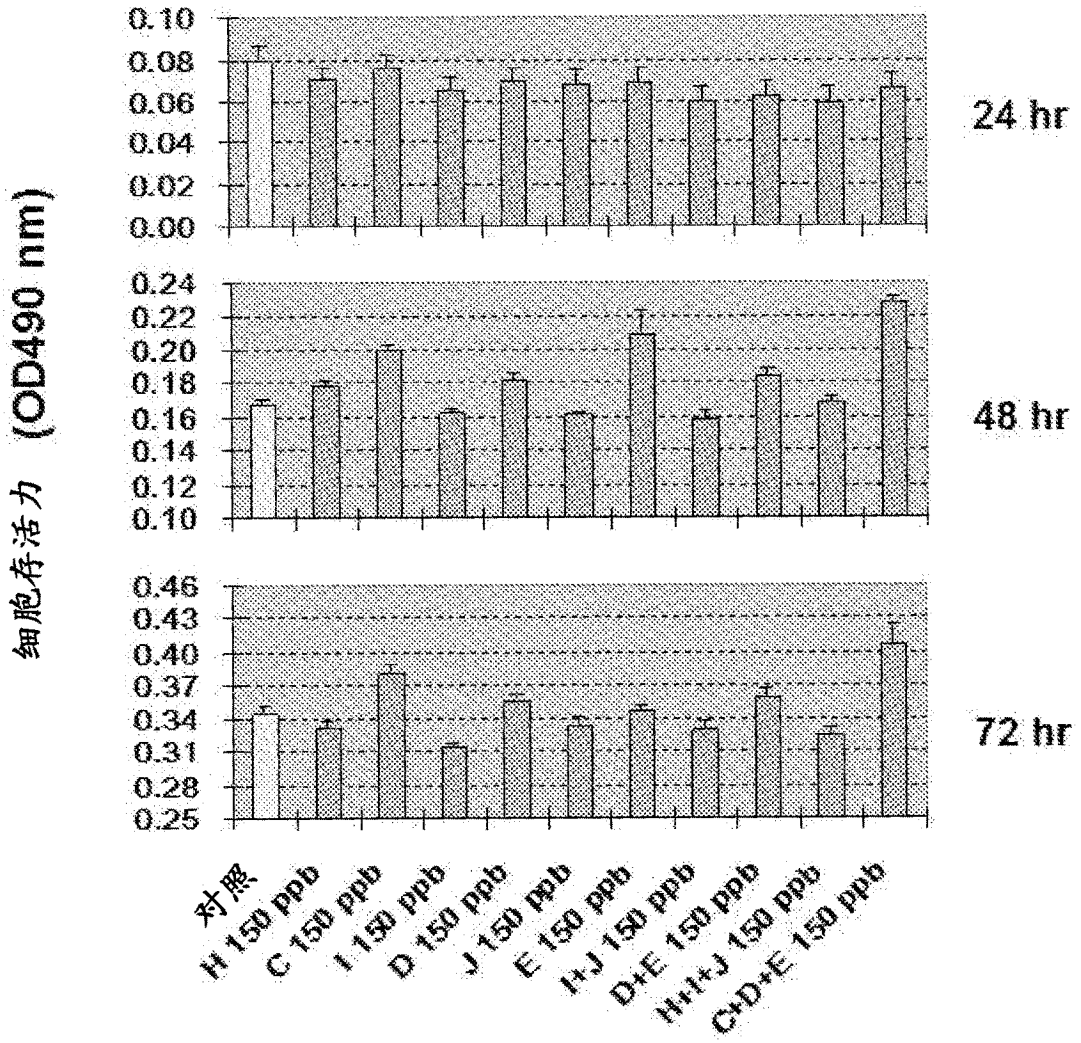
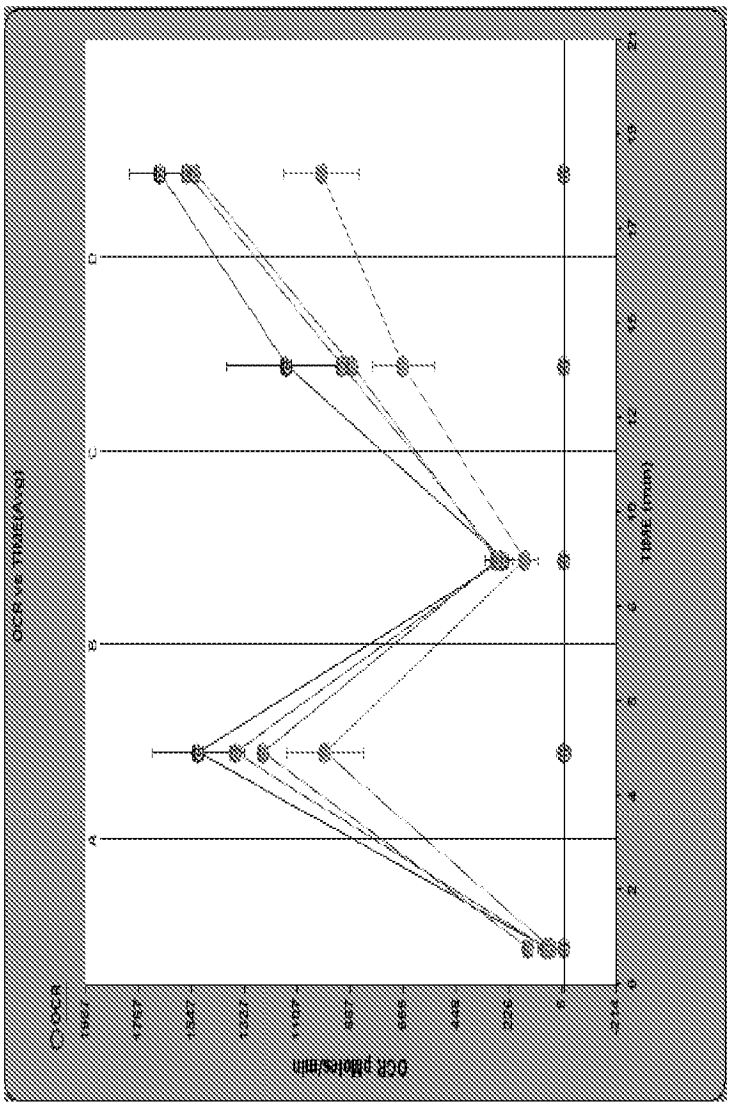

细胞存活力 (OD490 nm)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
24 hr
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
48 hr
0.46
0.43
0.40
0.37
0.34
0.31
0.28
0.25
72 hr
对照
H 150 ppb
C 150 ppb
I 150 ppb
D 150 ppb
J 150 ppb
E 150 ppb
I+J 150 ppb
D+E 150 ppb
H+I+J 150 ppb
C+D+E 150 ppb
IMR-32 神经元细胞

图 5



应激的大鼠脑中的 MT 功能

图 6

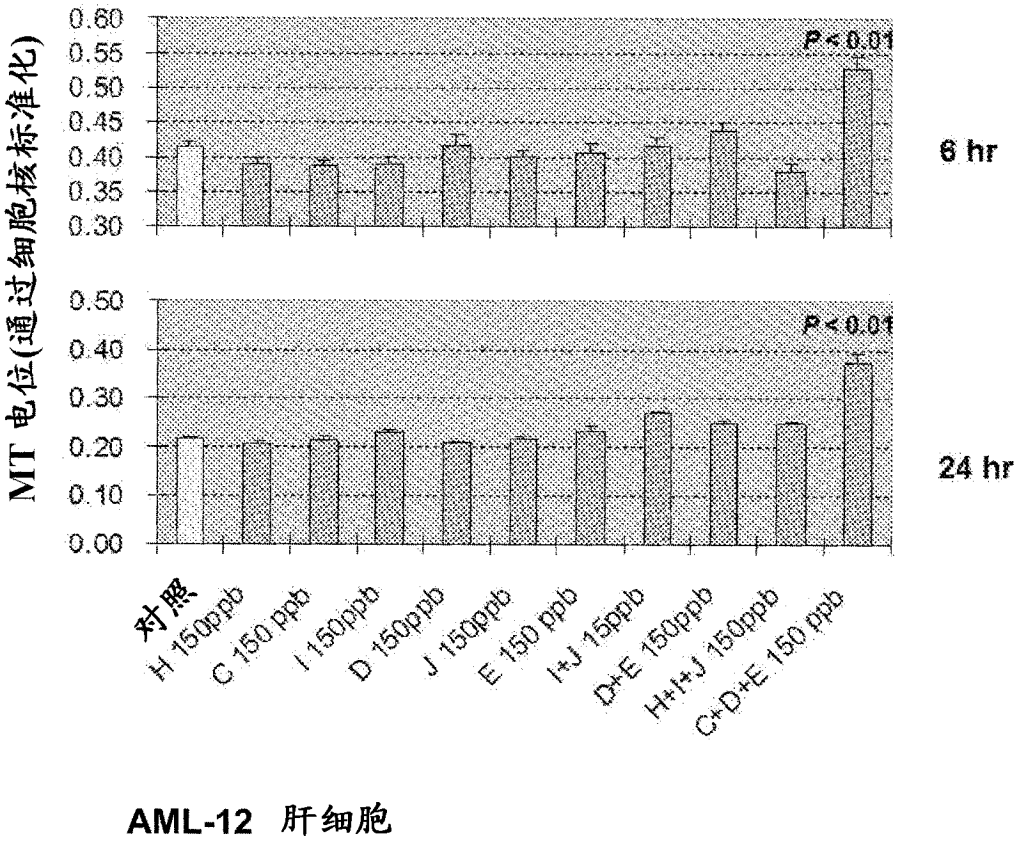
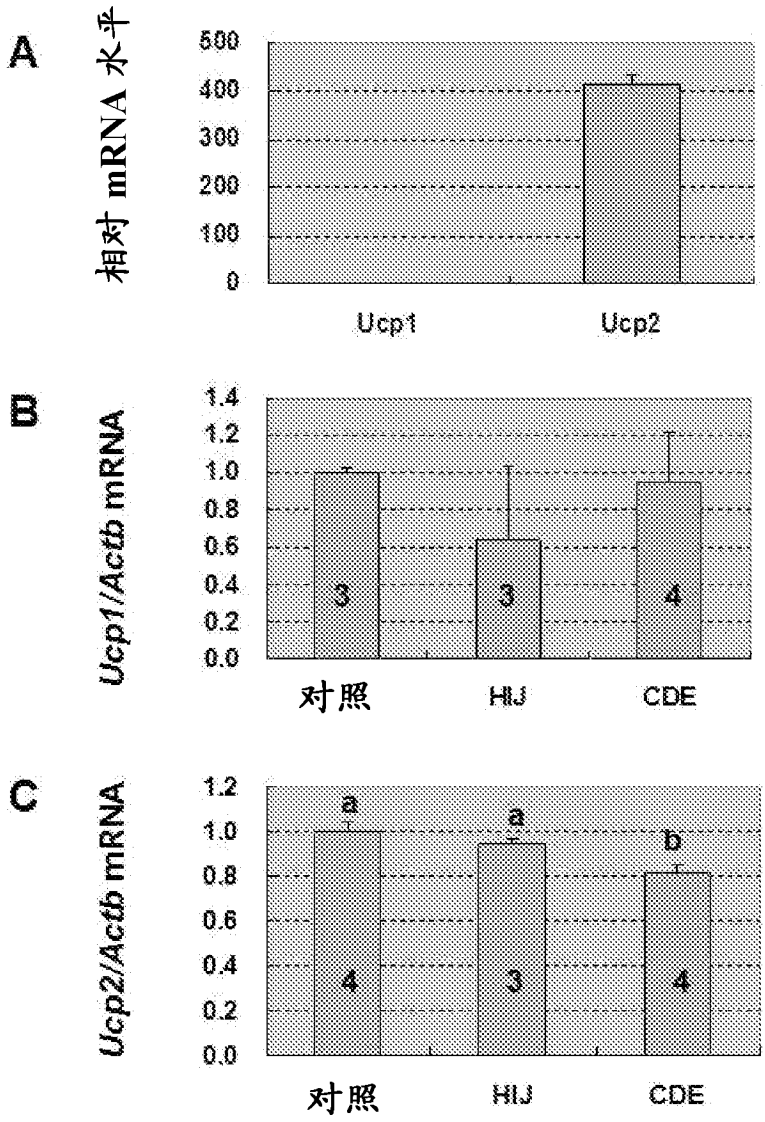

MT 电位(通过细胞核标准化)
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
P < 0.01
6 hr
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
P < 0.01
24 hr
对照
H 150ppb
C 150 ppb
I 150ppb
D 150ppb
J 150ppb
E 150 ppb
I+J 15ppb
D+E 150ppb
H+I+J 150ppb
C+D+E 150 ppb
AML-12 肝细胞

图 7


A
相对 mRNA 水平
500
400
300
200
100
0
Ucp1
Ucp2
B
Ucp1/Actb mRNA
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
3
3
4
对照
HIJ
CDE
C
Ucp2/Actb mRNA
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
a
b
4
3
4
对照
HIJ
CDE

AML-12 肝细胞

图 8

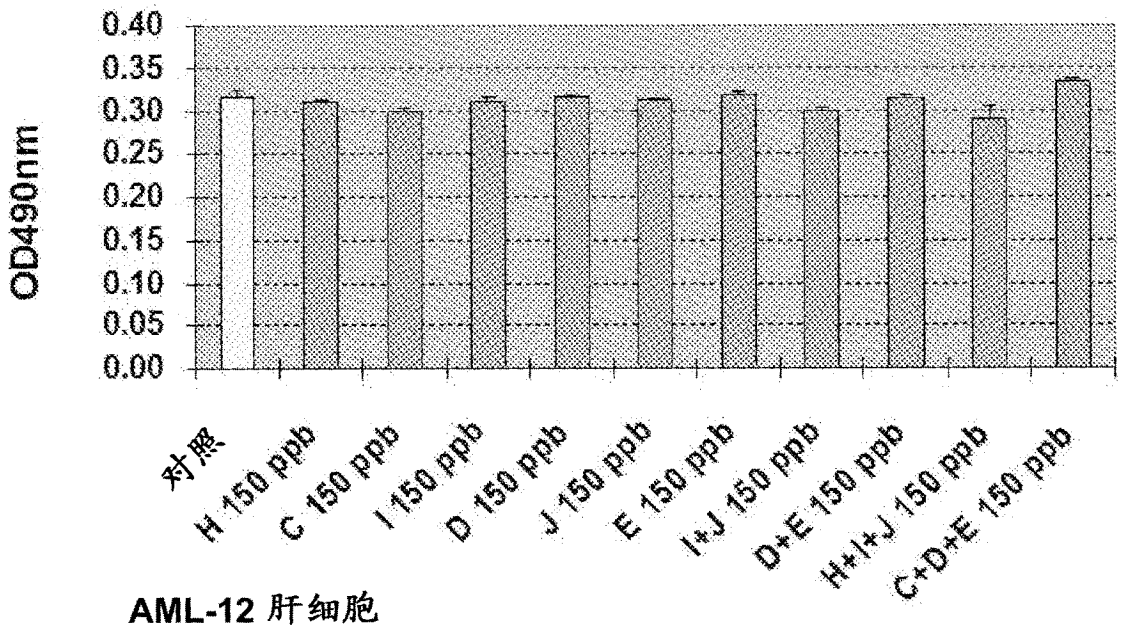

OD490nm
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
对照
H 150 ppb
C 150 ppb
I 150 ppb
D 150 ppb
J 150 ppb
E 150 ppb
I+J 150 ppb
D+E 150 ppb
H+I+J 150 ppb
C+D+E 150 ppb
AML-12 肝细胞

图 9

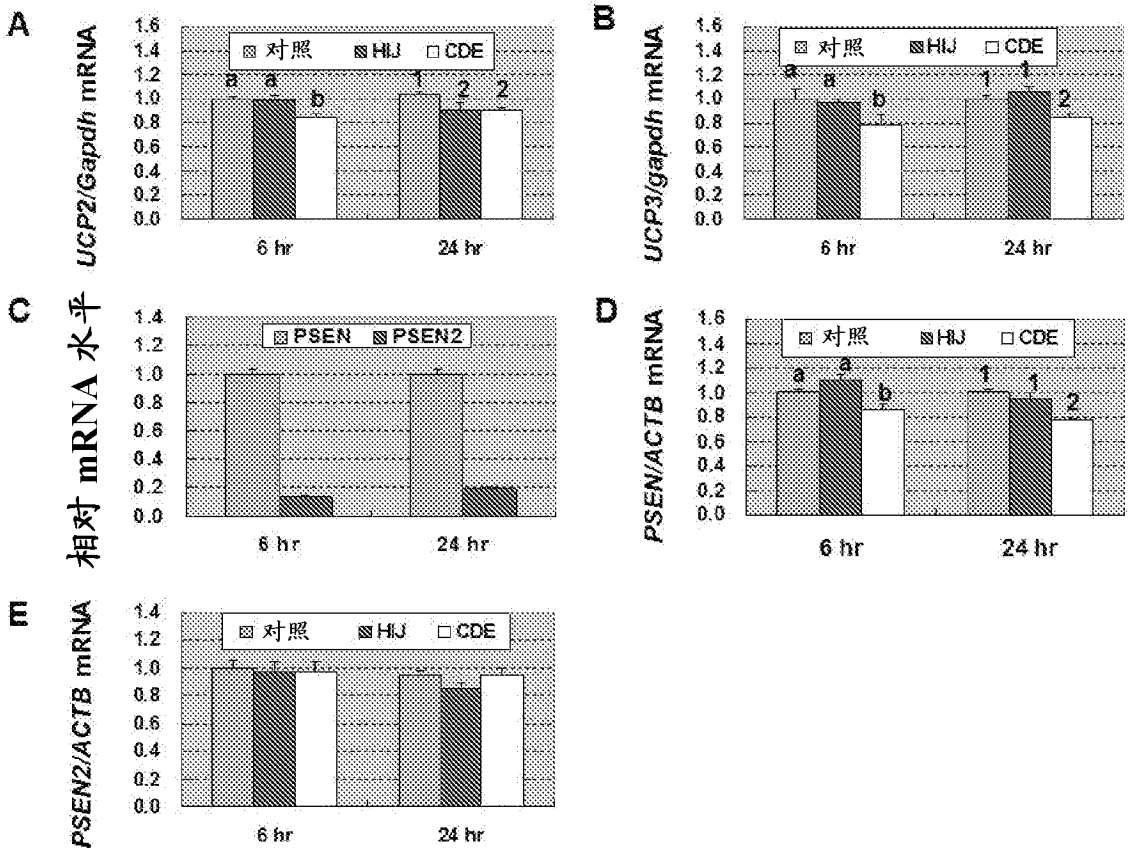

A
UCP2/Gapdh mRNA
B
UCP3/gapdh mRNA
C
相对 mRNA 水平
PSEN
PSEN2
D
PSEN/ACTB mRNA
E
PSEN2/ACTB mRNA
对照
HIJ
CDE
6 hr
24 hr
IMR-32 神经元细胞

图 10

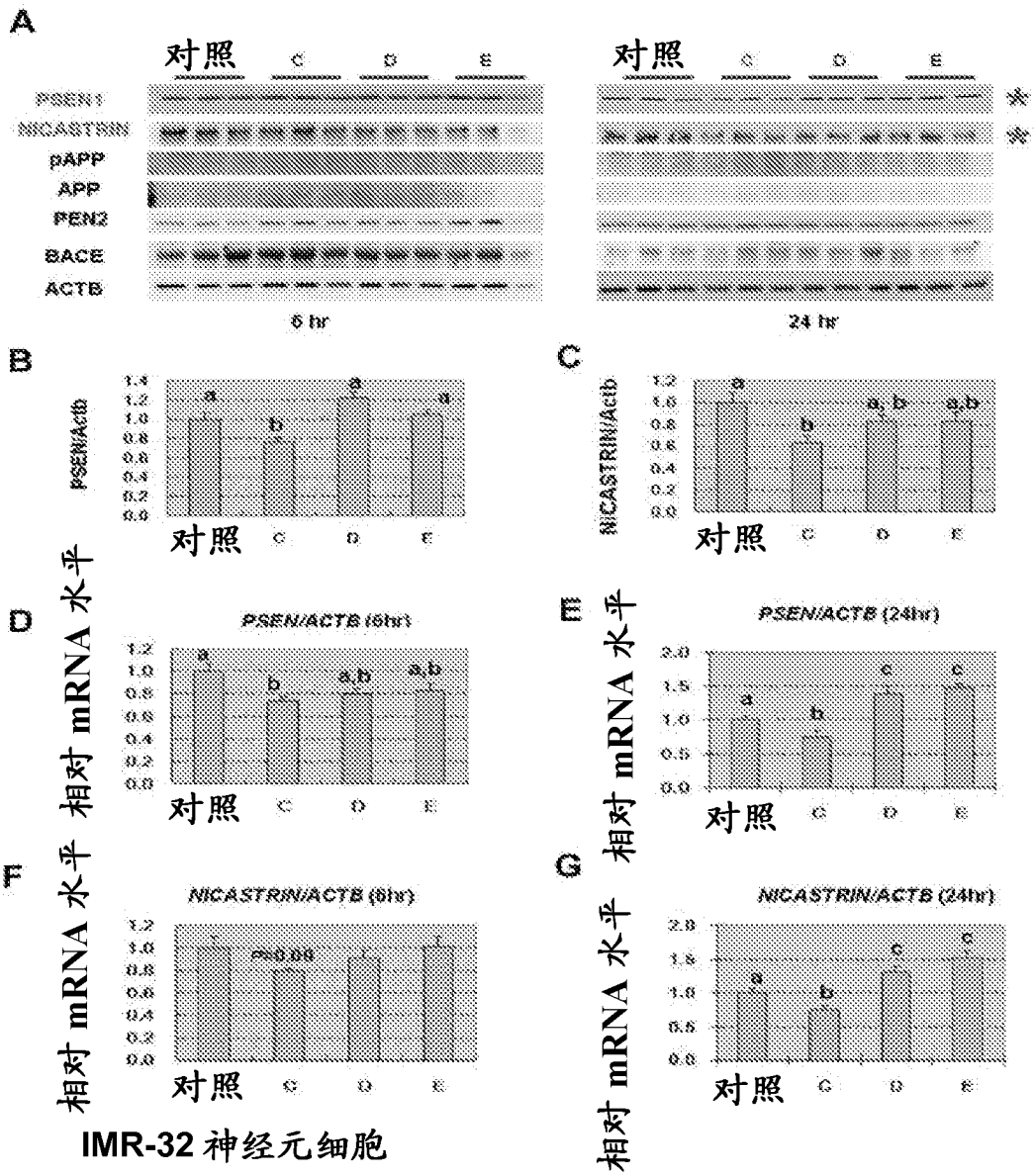

A
对照
PSEN1
NICASTRIN
pAPP
APP
PEN2
BACE
ACTB
6 hr
24 hr
B
PSEN/Actb
C
NICASTRIN/Actb
D
PSEN/ACTB (6hr)
E
PSEN/ACTB (24hr)
F
NICASTRIN/ACTB (6hr)
G
NICASTRIN/ACTB (24hr)
相对 mRNA 水平
IMR-32 神经元细胞

图 11

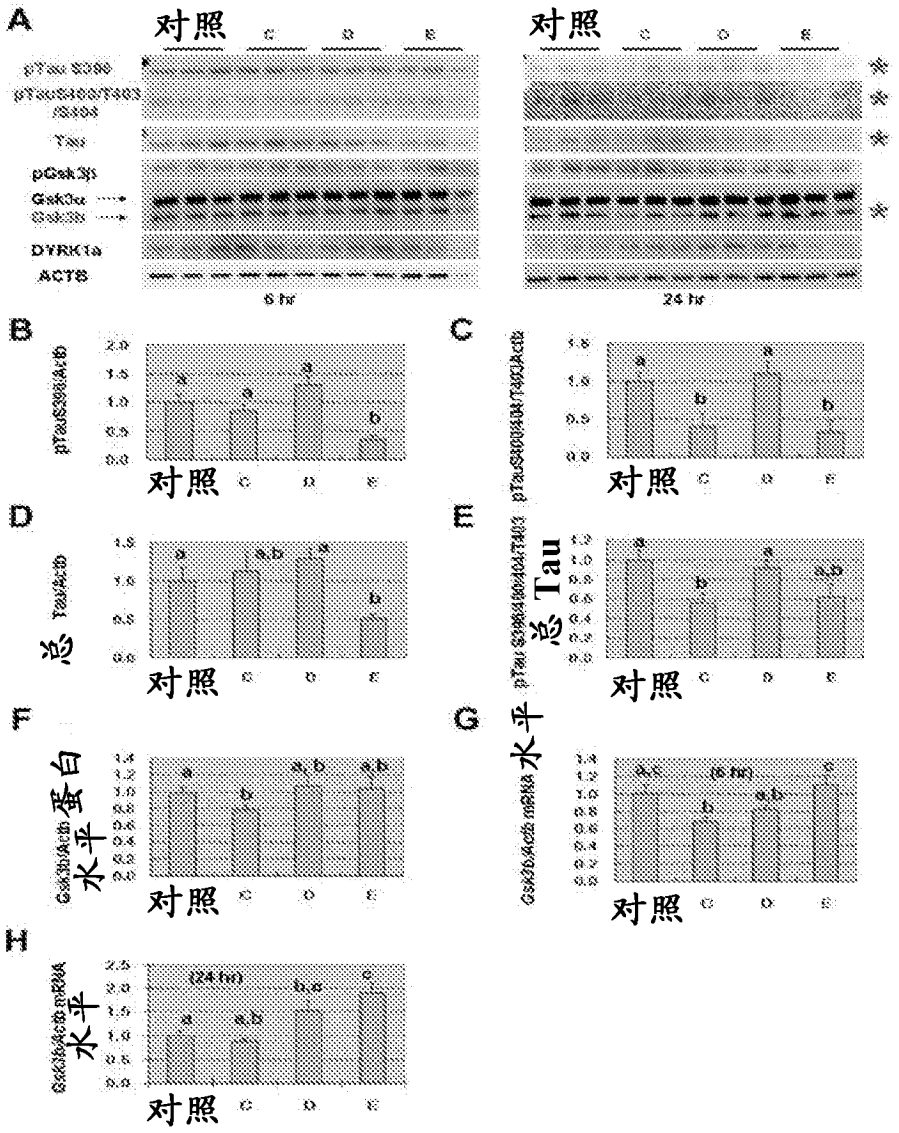

A
对照
pTau S396
pTau S404/T403
Tau
pGsk3β
Gsk3α
Gsk3β
DYRK1a
ACTB
6 hr
24 hr
B
C
D
E
总 Tau
对照
F
蛋白水平
G
mRNA水平
H
(24 hr)
IMR-32 神经元细胞

图 12

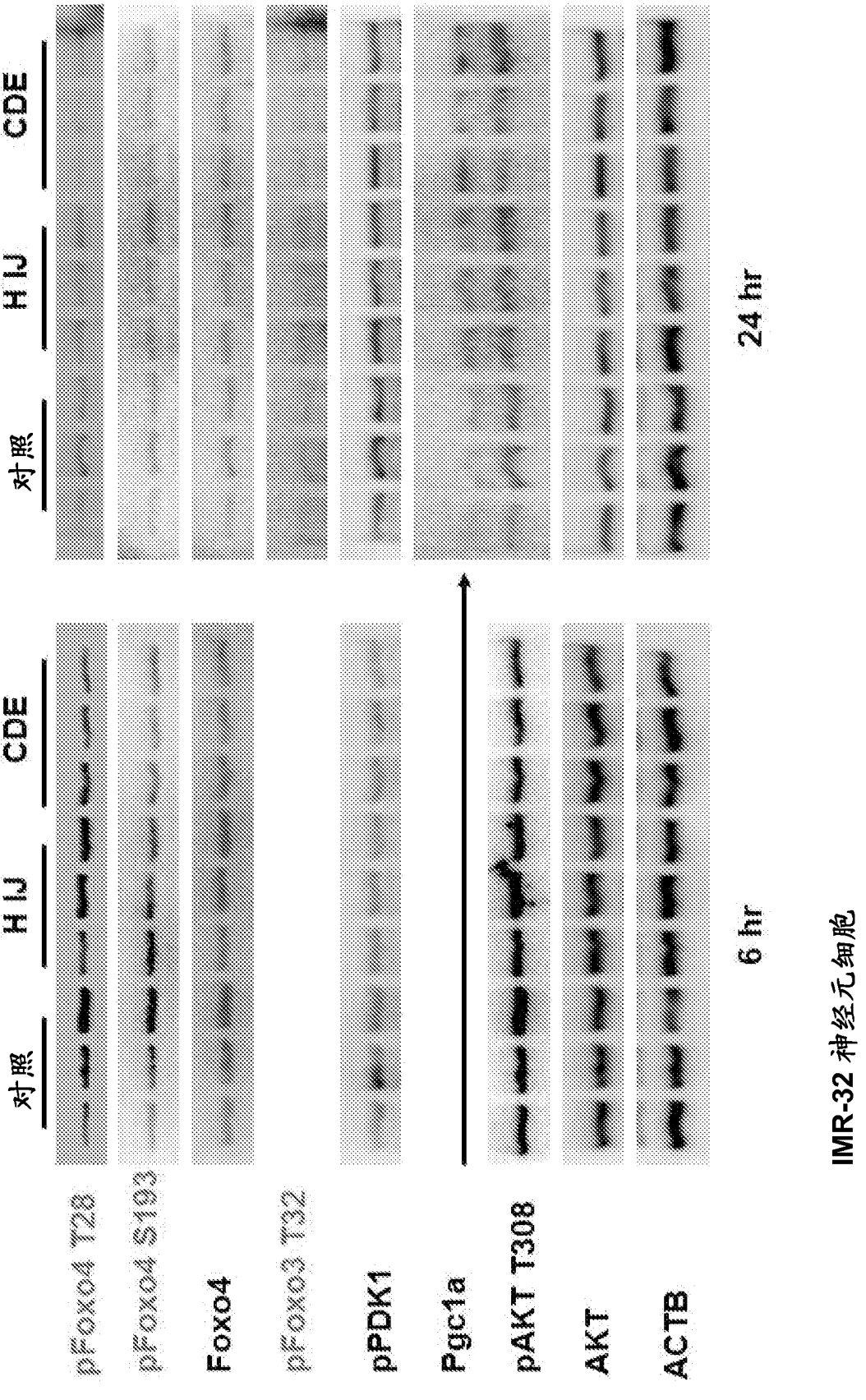

对照
H IJ
CDE
6 hr
24 hr
IMR-32 神经元细胞
pFoxo4 T28
pFoxo4 S193
Foxo4
pFoxo3 T32
pPDK1
Pgc1a
pAKT T308
AKT
ACTB

图 13

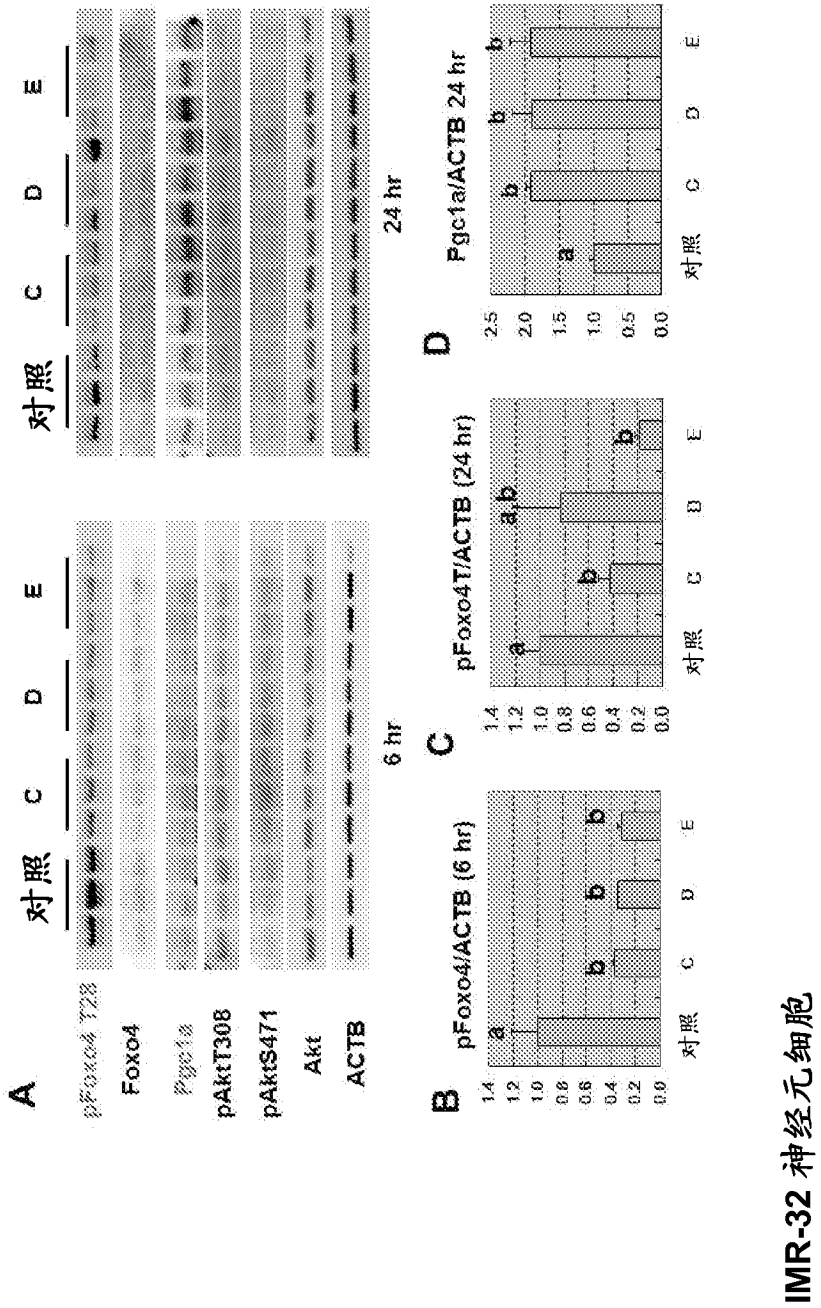

A
对照
C
D
E
对照
C
D
E
pFoxo4 T28
Foxo4
Pgc1a
pAktT308
pAktS471
Akt
ACTB
6 hr
24 hr
B
pFoxo4/ACTB (6 hr)
C
pFoxo4T/ACTB (24 hr)
D
Pgc1a/ACTB 24 hr
对照
C
D
E
IMR-32 神经元细胞

图 14

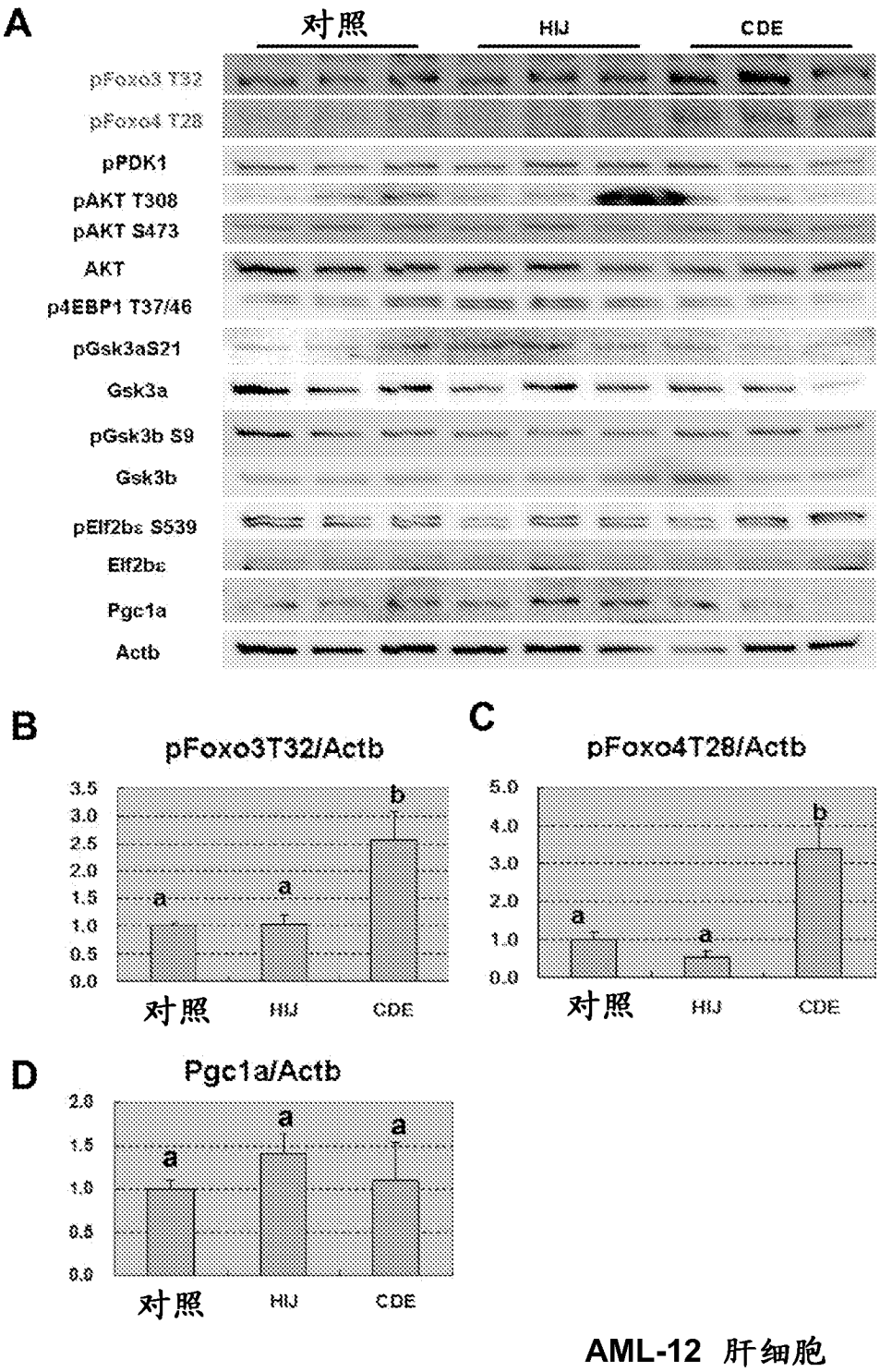

A
对照
HIJ
CDE
pFoxo3 T32
pFoxo4 T28
pPDK1
pAKT T308
pAKT S473
AKT
p4EBP1 T37/46
pGsk3aS21
Gsk3a
pGsk3b S9
Gsk3b
pEif2bε S539
Eif2bε
Pgc1a
Actb
B
pFoxo3T32/Actb
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
a
b
对照
HIJ
CDE
C
pFoxo4T28/Actb
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
a
a
b
对照
HIJ
CDE
D
Pgc1a/Actb
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
a
a
对照
HIJ
CDE
AML-12 肝细胞

图 15

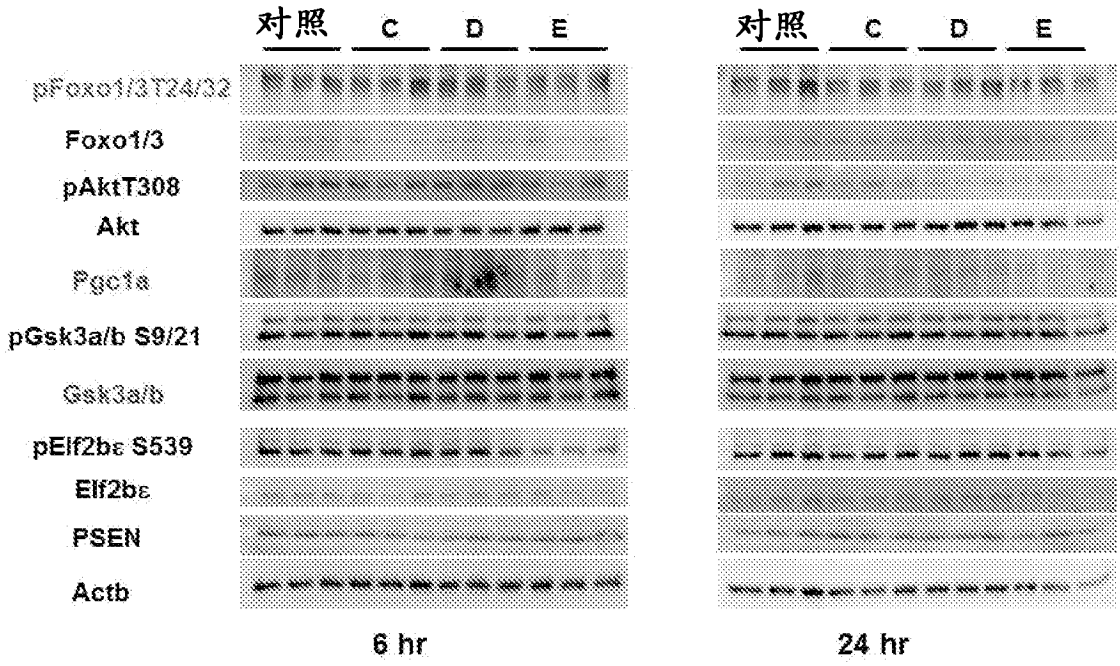

对照
C
D
E
对照
C
D
E
pFoxo1/3T24/32
Foxo1/3
pAktT308
Akt
Pgc1a
pGsk3a/b S9/21
Gsk3a/b
pElf2bε S539
Elf2bε
PSEN
Actb
6 hr
24 hr
AML-12 肝细胞

图 16

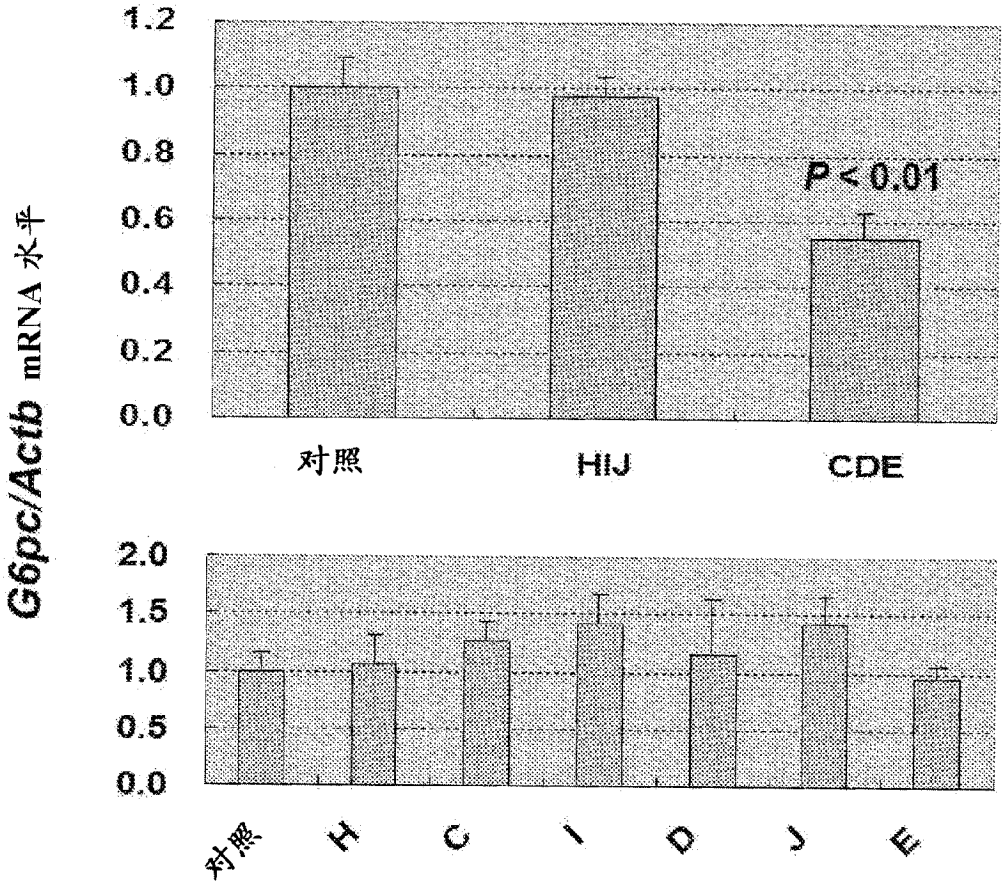

G6pc/Actb mRNA 水平
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
P < 0.01
对照
HIJ
CDE
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
对照
H
C
I
D
J
E

图 17

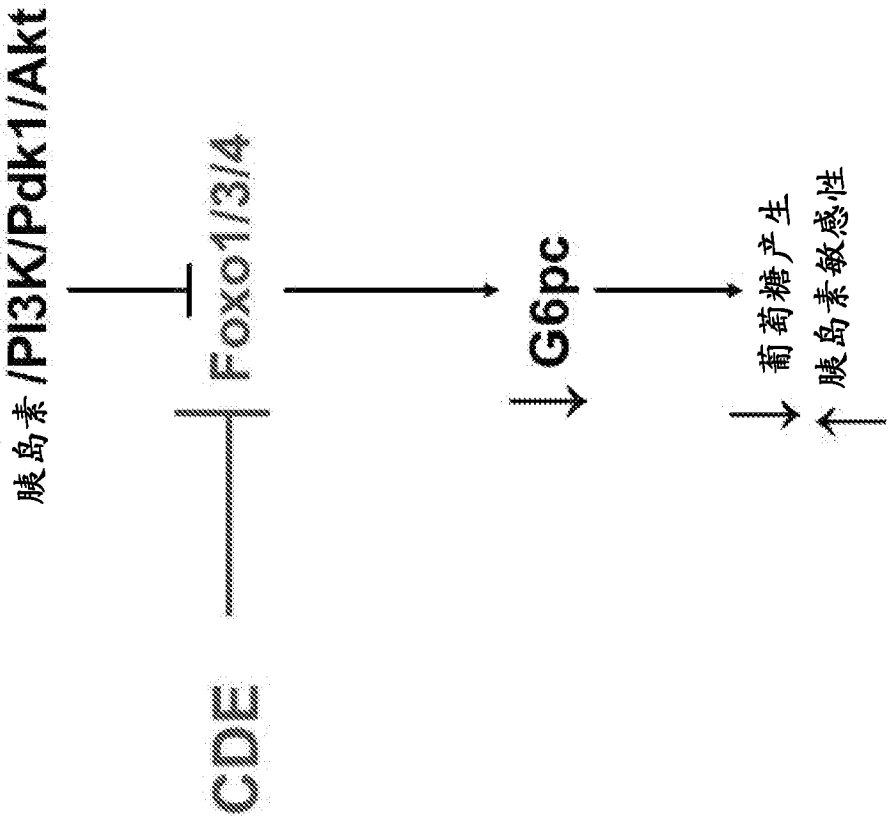


图 18

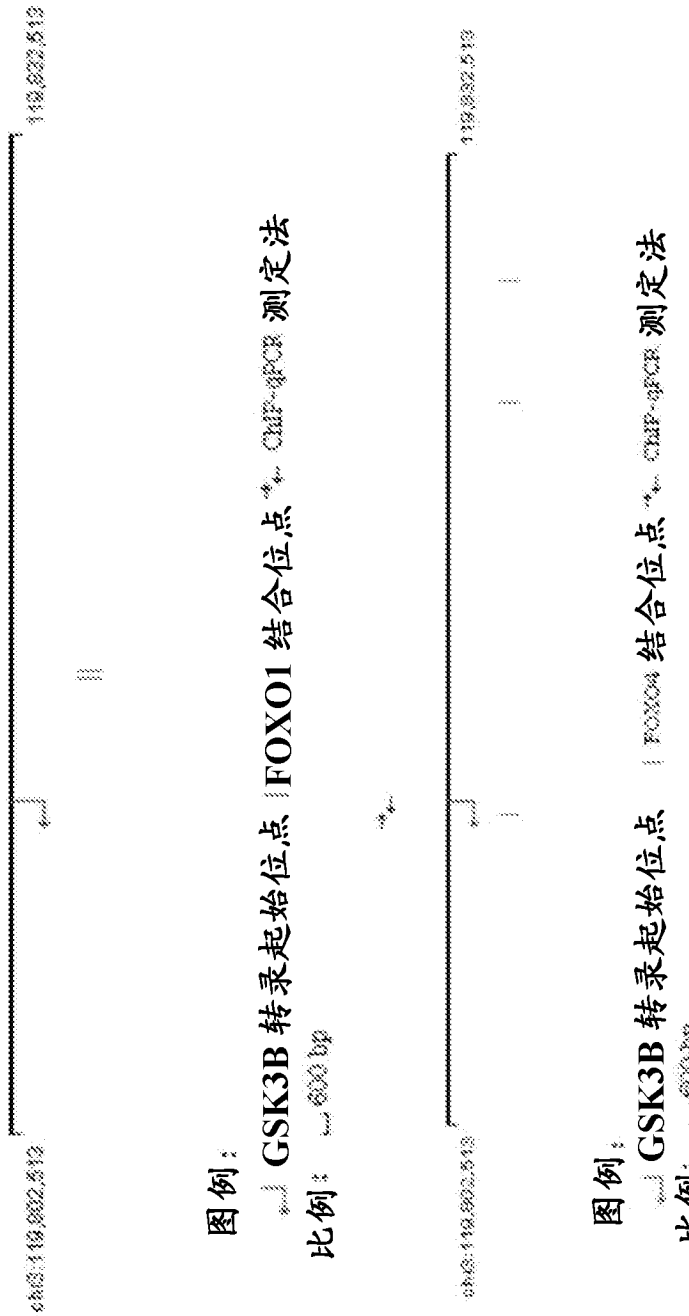

在人 GSK3B 启动子上存在 5 个 FOXO1/3/4 结合基序
图例：
GSK3B 转录起始位点
FOXO1 结合位点
ChIP-qPCR 测定法
比例：
图例：
GSK3B 转录起始位点
FOXO4 结合位点
ChIP-qPCR 测定法
比例：

图 19a

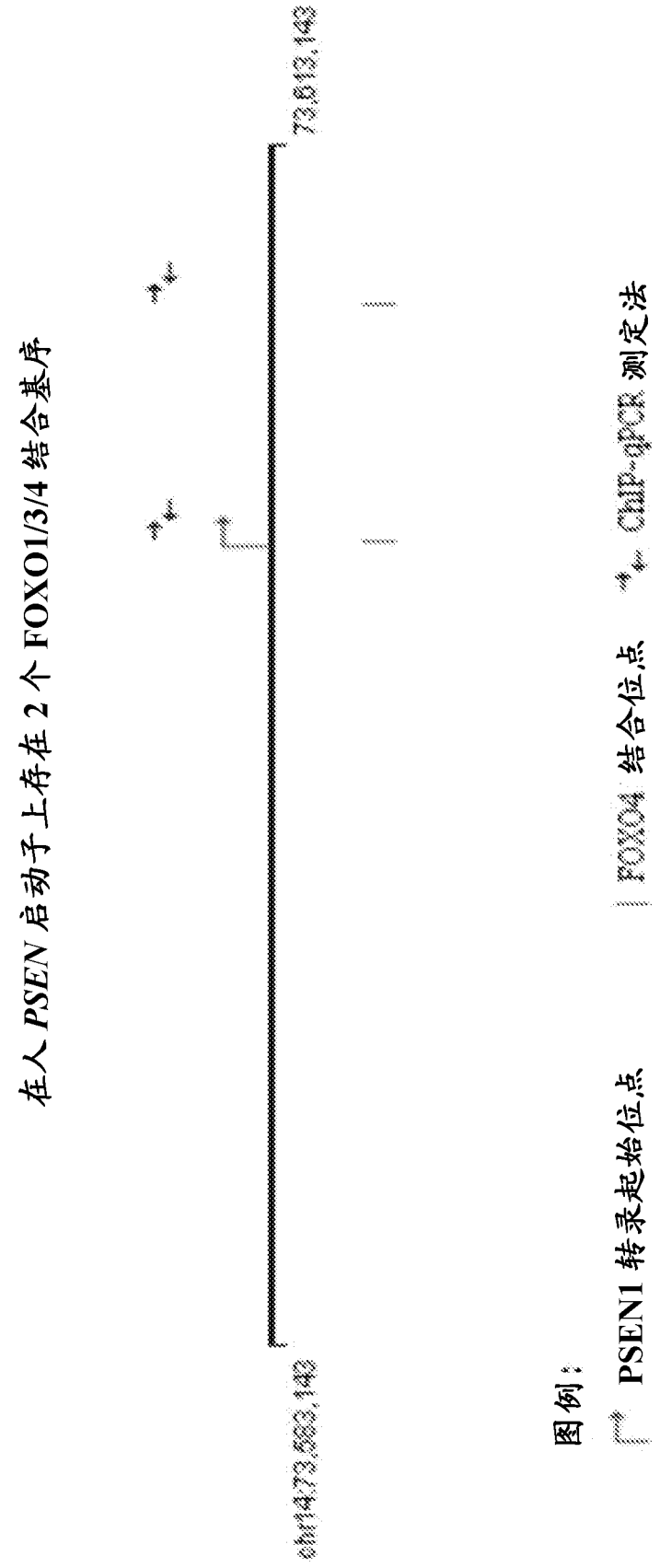

在人 PSEN 启动子上存在 2 个 FOXO1/3/4 结合基序
chr14:73,563,143
73,613,143
图例：
PSEN1 转录起始位点
FOXO4 结合位点
ChIP-qPCR 测定法
比例：
600 bp

图 19b

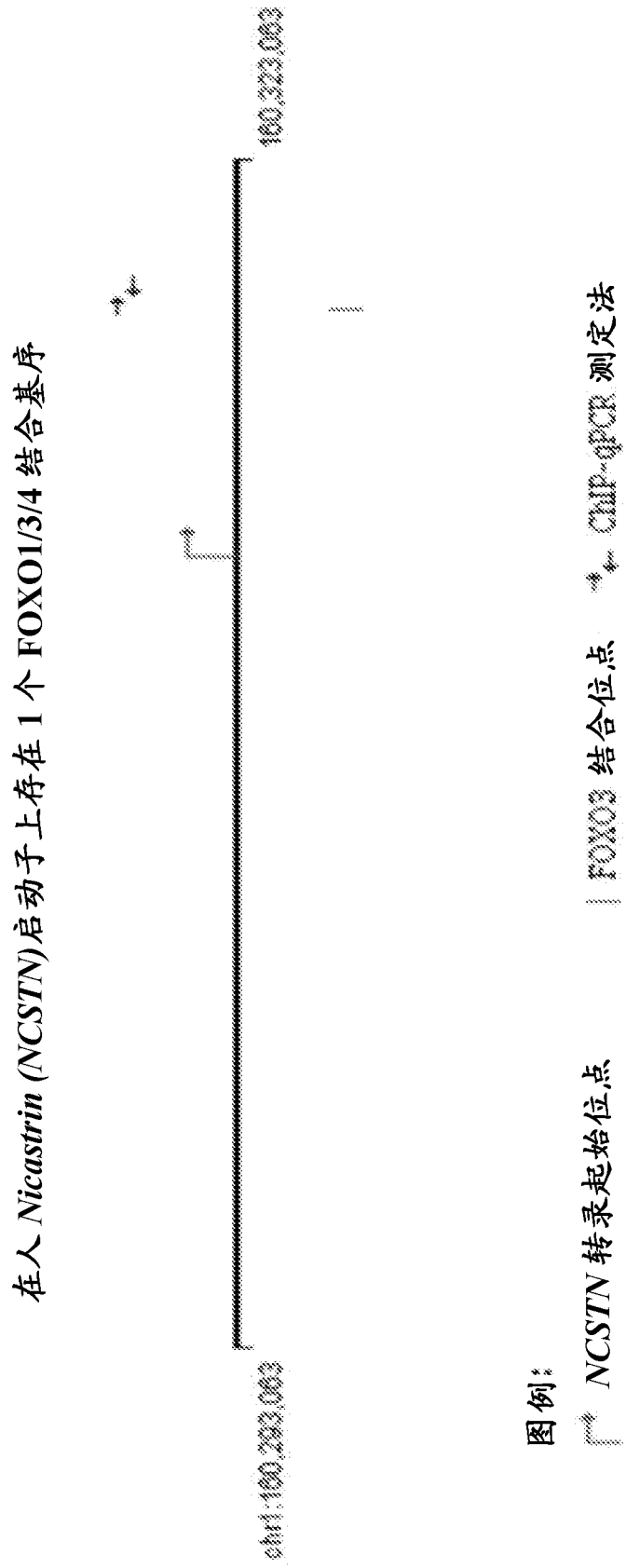

在人 Nicastrin (NCSTN)启动子上存在 1 个 FOXO1/3/4 结合基序
chr1:160,232,063
160,323,063
图例：
NCSTN 转录起始位点
FOXO3 结合位点
ChIP-qPCR 测定法
比例：
600 bp

图 19c

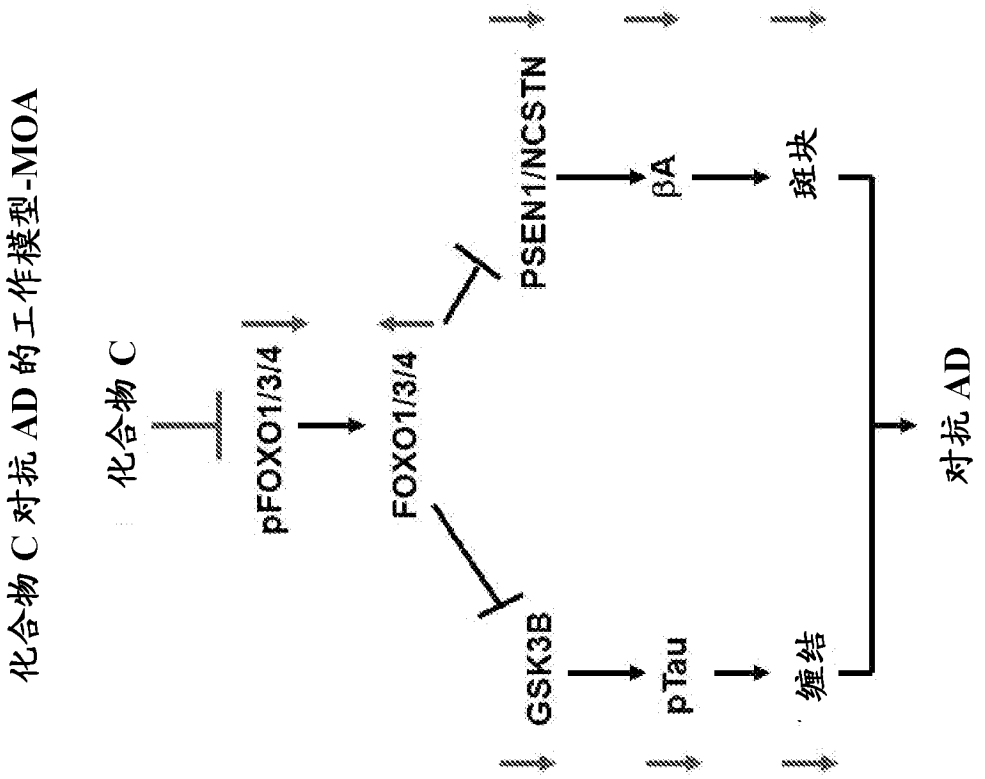

化合物 C 对抗 AD 的工作模型-MOA
化合物 C
pFOXO1/3/4
FOXO1/3/4
PSEN1/NCSTN
βA
斑块
GSK3B
pTau
缠结
对抗 AD

图 19d