



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114533753 A

(43) 申请公布日 2022.05.27

(21) 申请号 202210024252.2

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2014.03.14

A61K 31/7076 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/07 (2006.01)

61/788133 2013.03.15 US

A61K 38/05 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 9/00 (2006.01)

201480028372.3 2014.03.14

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(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 C. 伊根

A. 伊安尼库里斯 兰子鉴 肖日进

L.C. 杰克逊 S. 奎亚特科夫斯基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理人 彭昶

权利要求书1页 说明书77页

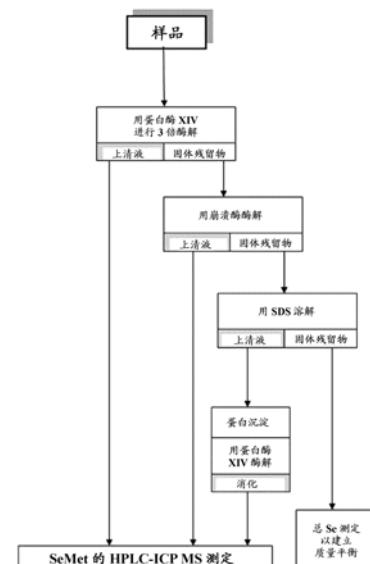
序列表10页 附图48页

(54) 发明名称

含硒组合物及其治疗和预防与线粒体功能障碍有关的疾病或病症的应用

(57) 摘要

本申请涉及含硒的组合物(例如,富硒酵母和由此获得或衍生的含硒化合物)和使用所述组合物以治疗和抑制肥胖症、糖尿病和相关病症的方法。特别是,本申请提供包含富硒酵母(例如,包含2%或更少的无机硒的富硒酵母)、存在于其中和/或从中衍生的含硒化合物的组合物,和使用所述组合物以增强受试者中线粒体活性和功能(例如,在骨骼肌和肝中)的方法(例如,作为对糖尿病、肥胖症和相关病症的疗效性和/或预防性治疗)。



1. 组合物在制备用于增加受试者的细胞中线粒体功能的药物中的用途,所述组合物包含选自分离的5'甲基硒代腺苷、硒代腺苷基同型半胱氨酸、亮氨酰基-缬氨酰基-硒代甲硫氨酸酰基-精氨酸或其组合的化合物。
2. 权利要求1的用途,其中所述组合物以每天25-800 μg 的硒的剂量给予所述受试者。
3. 权利要求1的用途,所述组合物还包含选自以下的分离的化合物:硒代(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、N-乙酰半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、烯丙基硒代腺苷基同型半胱氨酸、硒代-羟基腺苷基同型半胱氨酸、硒代腺苷、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷基-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、腺苷基-羟基硒亚砜、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、甲基硒代半胱氨酸及其组合。
4. 权利要求1的用途,其中所述组合物以每天200-500 μg 的硒的剂量给予所述受试者。
5. 权利要求1的用途,其中所述组合物经口服给予。
6. 权利要求1的用途,其中所述组合物包含载体。
7. 权利要求1的用途,其中所述组合物被配制为粉末、片剂、丸剂、胶囊、凝胶、糖浆、溶液、粉末、袋剂、糖锭剂或悬浮液。

含硒组合物及其治疗和预防与线粒体功能障碍有关的疾病或 病症的应用

[0001] 相关申请的交叉参照

本申请作为PCT国际专利申请于2014年3月14日提交并要求2013年3月15日提交的美国专利申请系列号61/788,133的优先权，其公开的内容通过引用以其全文结合到本文中。

[0002] 本申请的领域

本申请涉及含硒的组合物(例如，富硒酵母和含硒化合物)和使用所述组合物治疗线粒体功能障碍的方法。特别是，本申请提供包含富硒酵母(例如，含有2%或更少无机硒的富硒酵母)、存在于其中和/或从中衍生的含硒化合物的组合物，和使用所述组合物治疗与线粒体功能障碍有关的疾病和病症的方法。

[0003] 本申请的背景

称为线粒体的细胞器是高级生物的细胞的主要能量来源。线粒体提供对大量的细胞呼吸、氧化和代谢过程的直接和间接的生物化学调节作用。这些包括电子传递链(ETC)活性，这驱动氧化磷酸化，以产生三磷酸腺苷(ATP)形式的代谢能量，这也成为细胞内钙稳态中中枢线粒体作用的基础。

[0004] 线粒体呼吸发生在内部线粒体膜上并经电子流通过电子传递系统而实现，所述系统含有4个复合物(复合物I、II、III和IV)，伴有一个另外的用作ATP合成(ATP合酶)的位点的复合物(复合物V)。任何复合物的活性受损或减弱中断电子流并可引起线粒体呼吸功能障碍(见例如，Schildgen等，*Exp Hematol* 2011；39: 666-67510,11；Arthur等，*Mol Neurodegener* 2009；4:37)。线粒体代谢功能障碍的分析可以通过氧电极分析监测(见例如，Chance和Williams，*J Biol Chem* 1955；217: 383-393)。分析使得对线粒体呼吸功能的深刻理解成为可能。线粒体呼吸功能异常(例如，导致细胞死亡，活性氧物质产生，增加的氧化DNA损害，增加的自我吞噬，线粒体膜电位损失(例如，经由异常的复合物I表达和/或活性)和伴随的降低的ATP生产)和多种疾病和病症(例如，糖尿病、肥胖症、老年相关性神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、中风、胰岛素抵抗、动脉粥样硬化等)之间的关系已被广泛证明(见例如，Miquel等，*Exp Gerontol* 1980；15:575-591；McLean等，*Pharmacol Rev* 2004；56:163-184；Kujoth等，*Science* 2005；309:481-484；Guarente，*Cell* 2008；132:171-176；Lopez-Lluch等，*Exp Gerontol* 2008；43:813-819；Shigenaga等，*Proc Natl Acad Sci U S A* 1994；91:10771-10778；Schaefer等，*Biochim Biophys Acta* 2004；1659:115-120)。

[0005] 本申请概述

本申请涉及含硒(例如，富硒酵母和由此获得或衍生的含硒化合物)的组合物和使用所述组合物治疗线粒体功能障碍的方法。特别是，本申请提供包含富硒酵母(例如，含有2%或更少无机硒的富硒酵母)、存在于其中和/或从中衍生的含硒化合物的组合物，和使用所述组合物治疗与线粒体功能障碍有关的疾病和病症的方法。

[0006] 因此，在一些实施方案中，本申请提供一种包含分离的含硒化合物的组合物，其中

含硒化合物选自2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酸、N-乙酰硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、甲基硫代硒代谷胱甘肽、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、硒代甲基-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸- γ -谷氨酰基半胱氨酸、二-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-2,3-DHP硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-N-乙酰硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代半胱氨酰甘氨酸、 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、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、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、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-硫代-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽- γ -谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-谷胱甘肽、硒代二谷胱甘肽、二-硒代谷胱甘肽、硫代-二硒代谷胱甘肽、甲基脱氢同型半胱氨酸、硒代甲硫氨酸、硒代高羊毛氨酸、N-乙酰硒代胱硫醚、去羟基5'-甲基硒代腺苷、N-乙酰基半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代羊毛硫氨酸、乙基硒代腺苷、N-丙酰硒代胱硫醚、2,3-DHP-硒代胱硫醚、甲基硒代谷胱甘肽、 γ -谷氨酰基硒代胱硫醚和硒代谷胱甘肽。

[0007] 在本申请的一些实施方案中,含硒化合物包括,但不限于,硒代(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、N-乙酰半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、烯丙基硒代腺苷基同型半胱氨酸、硒代-腺苷基同型半胱氨酸、硒代-羟基腺苷基同型半胱氨酸、硒代腺苷、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷基-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、腺苷基-羟基硒亚砜、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜及其组合。

[0008] 在实施方案中,组合物包含选自甲基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、N-乙酰半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、烯丙基硒代腺苷基同型半胱氨酸、硒代-腺苷基同型半胱氨酸、硒代-羟基腺苷基同型半胱氨酸、硒代腺苷、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷基-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、腺苷基-羟基硒亚砜、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜及其组合的化合物。在特定的实施方案中,组合物包含化合物甲基硒代腺苷。在实施方案中,一种或多种化合物被分离和/或纯化。在实施方案中,组合物可用来增加细胞的线粒体功能或增加丙酮酸脱氢酶复合物的活性。

[0009] 在本申请的一些实施方案中,含硒化合物包含含硒肽。包含硒肽的化合物的实例包括,但不限于,MVAEAEK、DYMGAAK、YMGAAK、ELQDIANPIMSK、NQAAMNPSNTVFDAK、NFTPEQISSMVLGK、NFTPEQISSMVLGK、MVSEAEK、PEVQGDMK、ELQDIANPIMSK、AMSSR、VQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGK、AAAEGPMK、LTGMAFR、PFVSNDYAAVMVK、AFGIEEGLMTTVHSLTATQK、PFITNDYAAYMFK、PGMVVTFAPAGVTTEVK、VETGVIKPGMVVTFAPAGVTTEVK、AAATAAMTK、SIVPSGASTGVHEALEMR、WMGK、SIVPSGASTGVHEALEMR、AMPQK、AAMAK、HVGDMIEIR、VIEEPITSETAMK、VLQALEEIGIVEISPK、LPAASLGDMVMATVK、AGMTTIVR、AGMTTIVR、MLMPK、TMGAK、MNAGR、TYENMK、MGHDQSGTK、GEAIMAPK、Ac-MNVFGK、AMEVVASER、IVMR、MA(I/L)R、AMXAK、DLETLMHTK、LVMR、VMR、LTGMAFR、SRPNVEVVALNDPFIITNDYAAYMFK和VINDAFGIEEGLMTTVHSLTATQK,其中各个肽片段含有硒分子,和所述化合物在制备用于治疗

或预防与线粒体功能障碍有关的疾病或病症的药物中的用途。

[0010] 本申请还提供在受试者中增加线粒体活性的方法,其包括给予受试者有效量的(例如,本文所述的)含硒的组合物。在一些实施方案中,增加线粒体活性包括增加线粒体ATP生产。在一些实施方案中,增加线粒体活性包括增加线粒体代谢。在一些实施方案中,增加线粒体活性导致在受试者(例如,在受试者的骨骼肌、肝、皮层或卵巢组织)中减少活性氧物质产生。在一些实施方案中,增加线粒体活性导致受试者(例如,在受试者的骨骼肌和/或肝组织)中葡萄糖代谢增加。在一些实施方案中,增加的线粒体活性包括增加的线粒体复合物I活性。在一些实施方案中,增加的线粒体功能发生在存在于受试者的骨骼肌的线粒体中。在一些实施方案中,增加的线粒体功能发生在存在于受试者肝的线粒体中。

[0011] 在一些实施方案中,含硒的组合物选自含有2%或更少无机硒的富硒酵母、硒醚、含有SeCys的二-和/或三-肽的缀合物、硒醇(selonol),和硒亚砜。在一些实施方案中,含硒成分从含有2%或更少无机硒的富硒酵母获得或衍生。在实施方案中,含硒成分选自SeCys或SeMet肽、含硒腺苷基分子,及其组合。在特定的实施方案中,含硒化合物是甲基硒代腺苷或亮氨酸-缬氨酸-硒代甲硫氨酸-精氨酸。

[0012] 在实施方案中,增加细胞的线粒体功能的方法包括给予有效量的包含分离的5'甲基硒代腺苷、LVSe-MR或其组合的组合物,其中与未暴露于组合物的细胞比较,所述有效量增加细胞中的线粒体功能。

[0013] 在其它实施方案中,增加细胞中丙酮酸脱氢酶复合物的方法包括给予有效量的包含5'甲基硒代腺苷的组合物,其中与未暴露于组合物的细胞比较,有效量增加细胞中丙酮酸脱氢酶复合物的活性。

[0014] 在一些实施方案中,受试者具有或处于与线粒体功能障碍有关的疾病或病症的风险中。本申请不受与线粒体功能障碍有关的疾病或病症的类型的限制。事实上,本申请的组合物和方法发现对各种疾病和病症(例如,本文公开的那些)有用。在一些实施方案中,受试者患有心肌病。在一些实施方案中,受试者患有肌少症。在一些实施方案中,受试者患有肌蛋白缺乏症。

[0015] 本申请还提供用于增加受试者的葡萄糖代谢的方法,其包括给予有此需要的受试者有效量的(例如,本文所述的)含硒组合物,其中给药导致受试者的增加的线粒体活性。在一些实施方案中,提高的葡萄糖代谢发生于受试者的骨骼肌中。在一些实施方案中,提高的葡萄糖代谢发生于肝中。

[0016] 本申请提供用于治疗患有与改变的线粒体功能有关的疾病或病症的受试者的方法,其包括给予受试者治疗有效量的(例如,如本文所述的)含硒组合物,其中给药导致受试者的线粒体活性增加,由此治疗受试者的疾病或病症。

[0017] 本申请不受给予的含硒组合物的限制。在一些实施方案中,含硒的组合物包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母。在一些实施方案中,本申请提供从富硒酵母(例如,含有2%或更少无机硒的富硒酵母)制备的含硒部分的应用和给药。例如,在一些实施方案中,含硒的组合物包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的水溶性部分。在其它实施方案中,含硒的组合物包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的水不溶性部分。在一些实施方案中,给予受试者的含硒的组合物包含单一的液相,所述液相包含富硒酵母的提取物(例如,在酸性条件下可溶的(例如,在第一pH(例如,pH 1.85)下提取和/或沉淀的可溶性含硒化合物的部分

(例如,可溶的硒代糖蛋白),在第二pH (例如,pH 3.0)下沉淀的第二部分,在第三pH (例如,pH 4.0)下沉淀的第三部分,和在第四pH (例如,pH 6.0)下沉淀的第四部分)。

[0018] 在一些实施方案中,本申请提供含硒化合物(例如,从富硒酵母(例如,含有2%或更少无机硒的富硒酵母)或其衍生物获得或衍生的含硒化合物)的应用和给药。本申请不受所用的一种或多种含硒化合物的限制。在一些实施方案中,一种或多种含硒化合物是硒醚、含有SeCys的二-和/或三-肽的缀合物、硒醇或硒亚砜(或其衍生物)、含硒蛋白和/或本文所述的含硒肽。

[0019] 例如,在一些实施方案中,含有给予受试者(例如,在本申请的方法中)的成分的含硒组合物包含一种或多种以下成分:2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酸、N-乙酰硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、甲基硫代硒代谷胱甘肽、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、硒代甲基-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、二-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-2,3-DHP硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-N-乙酰硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代半胱氨酰甘氨酸、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、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、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、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-硫代-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-谷胱甘肽、硒代二谷胱甘肽、二-硒代谷胱甘肽、硫代-二硒代谷胱甘肽、甲基脱氢同型半胱氨酸、硒代甲硫氨酸、硒代高羊毛氨酸、N-乙酰硒代胱硫醚、N-乙酰基半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代羊毛硫氨酸、N-丙酰硒代胱硫醚、2,3-DHP-硒代胱硫醚、甲基硒代谷胱甘肽、γ-谷氨酰基硒代胱硫醚,或硒代谷胱甘肽。

[0020] 在实施方案中,含硒化合物包含去羟基5'-甲基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、乙基硒代腺苷、烯丙基硒代腺苷基同型半胱氨酸、硒代-腺苷基同型半胱氨酸、硒代-羟基腺苷基同型半胱氨酸、硒代腺苷、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷基-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷),或硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜的一种或多种。

[0021] 在一些实施方案中,给予受试者的含硒的组合物(例如,在本申请的方法中)包含一种或多种蛋白或肽片段,其中存在于蛋白或肽的一个或多个氨基酸残基中的一个或多个硫分子用硒分子取代。本申请不限于特定的含硒蛋白或肽。在一些实施方案中,给予受试者的含硒的组合物包含一个或多个肽片段,其中存在于肽的一个或多个氨基酸残基中的一个或多个硫分子用选自以下的硒分子取代:MVAEAEK、DYMGAAK、YMGAAK、ELQDIANPIMSK、NQAAMNPSNTVFDK、NFTPEQISSMVLGK、NFTPEQISSMVLGK、MVSEAEK、PEVQGDMK、ELQDIANPIMSK、AMSSR、VQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGK、AAAEGPMK、LTGMAFR、PFVSNDYAYMVK、AFGIEEGLMTTVHSLTATQK、PFITNDYAYMFK、PGMVVTFAPAGVTTEVK、VETGVIKPGMVVTFAPAGVTTEVK、AAATAAMTK、SIVPSGASTGVHEALEMR、WMGK、

SIVPSGASTGVHEALEMR、AMPQK、AAMAK、HVGDMEMR、VIEEPITSETAMK、VLQALEEIGIVEISPK、LPAASLGDMVMATVK、AGMTTIVR、AGMTTIVR、MLMPK、TMGAK、MNAGR、TYENMK、MGHDQSGTK、GEAIMAPK、Ac-MNVFGK、AMEVVASER、IVMR、MA (I/L) R、AMXAK、DLETLTMHTK、LVMR、VMR、LTGMAFR、SRPNVEVVALNDPFITNDYAAYMFK和VINDAFGIEEGLMTTVHSLTATQK。

[0022] 在一些实施方案中,组合物(例如,药用组合物)包含2或更多(例如,3或更多、4或更多、5或更多、6或更多、7或更多、8或更多、9或更多、10或更多、15或更多、20或更多、30或更多、40或更多,或50或更多)种不同的含硒化合物(例如,本文所述的那些)。在一些实施方案中,本申请提供包含2或更多(例如,3或更多、4或更多、5或更多、6或更多、7或更多、8或更多、9或更多、10或更多、15或更多、20或更多、30或更多、40或更多,或50或更多)种含硒化合物(例如,分离的、化学合成的,或重组的含硒化合物)的组合的组合物,其为特定用途而定制(例如,当组合时,显示所需水平的生物活性(例如,刺激和/或抑制活性))。

[0023] 例如,在一些实施方案中,包含两种或更多种含硒化合物的组合的第一组合物被用来增强肌肉组织中的线粒体活性(例如,ATP生产和/或呼吸),而包含两种或更多种不同的含硒化合物(例如,显示不同于第一组合物的生物活性)的组合的第二组合物被用来改变肝组织中的线粒体活性。在一些实施方案中,包含两种或更多种含硒化合物的组合物专为个体的特定基因谱定制(例如,以靶向特定基因或蛋白)。

[0024] 酵母提取物或部分可以类似的方式定制,供用于治疗个体的特定疾病或病症。以这样一种方式,为需要治疗的个体受试者开发定制制剂。在一些实施方案中,给予本申请的含硒组合物的受试者具有或处于与线粒体功能障碍有关的病症或疾病的风险中。本申请不受处于线粒体功能障碍的风险或患有线粒体功能障碍的受试者类型的限制。事实上,本领域众所周知,各种受试者处于线粒体功能障碍的风险中或患有线粒体功能障碍,包括,但不限于,对线粒体功能障碍有遗传倾向的受试者。

[0025] 在实施方案中,受试者患有病症或疾病,包括但不限于,心肌病、肌少症或肌蛋白缺乏症。

[0026] 在一实施方案中,一种增加肌细胞的蛋白含量的方法,其包括给予有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物至肌细胞,其中有效量增加肌细胞中的蛋白。在其它实施方案中,治疗肌少症的方法包括给予受试者有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物,其中有效量改善肌少症的症状。

[0027] 在实施方案中,治疗心肌病的方法包括给予受试者有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物,其中有效量改善心肌病的症状。

[0028] 在另一方面,本申请提供在心肌细胞、骨骼肌细胞,和/或肝细胞中调节(例如增加或减少)基因表达。

[0029] 在其它实施方案中,在心肌细胞中调节转录活性的方法包括给予有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物至心肌细胞,其中有效量有效调节心肌细胞中的NFATc2/c3和/或Foxo3转录活性。在进一步的实施方案中,与未暴露于组合物的肌细胞比较,接触含有2%或更少无机硒的富硒酵母的心肌细胞中的NFATc2/c3转录活性降低。在其它实施方案中,与未暴露于组合物的肌细胞比较,NFATc2/c3的磷酸化在与含有2%或更少无机硒的富硒酵母接触的心肌细胞中增加。在实施方案中,与未暴露于组合物的心肌细胞比较,Foxo3转录活性在与含有2%或更少无机硒的富硒酵母接触的心肌细胞中增加。

[0030] 在实施方案中,一种在心肌细胞中降低基因表达的方法包括给予有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物至心肌细胞,其中有效量降低Myh7、Ankrd1、Lcn2、pS6K1及其组合的表达。在另一个实施方案中,在心肌细胞中增加基因表达的方法包括给予有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物至心肌,其中与未暴露于组合物的心肌细胞比较,有效量增加选自Atm、Gadd45g、Gsk3b、UCP2及其组合的基因在与含有2%或更少无机硒的富硒酵母接触的心肌细胞中的表达。

[0031] 在其它实施方案中,降低一种或多种基因在骨骼肌细胞中的表达的方法包括给予有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物至骨骼肌细胞,其中与未暴露于组合物的心肌细胞比较,有效量降低肌肉生长抑制素、Avcr2b、mTOR、S6K1、Gsk3b、Fxbo32、Trim 63和Nr2f2的一种或多种或所有在与含有2%或更少无机硒的富硒酵母接触的心肌细胞中的表达。在实施方案中,增加一种或多种基因在骨骼肌细胞中的表达的方法包括给予有效量的包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物至骨骼肌细胞,其中与未暴露于组合物的肌细胞比较,有效量增加Prkaa2、Myf6、Des和PGC1a的一种或多种或全部在与含有2%或更少无机硒的富硒酵母接触的骨骼肌细胞中的表达。

[0032] 在其它实施方案中,与在喂饲缺硒食物的动物的肝细胞中的基因表达比较,选自Nr2F2的基因在用含有2%或更少无机硒的富硒酵母的食物喂饲动物的肝细胞中的表达增加。

[0033] 在其它实施方案中,增加细胞的线粒体功能的方法包括给予有效量的包含分离的5' 甲基硒代腺苷、LVSe-MR或其组合的组合物,其中与未暴露于组合物的细胞比较,有效量增加细胞中的线粒体功能。其它实施方案包括一种增加细胞中的丙酮酸脱氢酶复合物的方法,其包括给予有效量的包含分离的5' 甲基硒代腺苷的组合物,其中与未暴露于组合物的细胞比较,有效量增加细胞中丙酮酸脱氢酶复合物的活性。

[0034] 在本申请的进一步的实施方案中,提供一种包含分离的化合物的组合物,所述化合物选自甲基硒代腺苷、硒代(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、N-乙酰半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、烯丙基硒代腺苷基同型半胱氨酸、硒代-腺苷基同型半胱氨酸、硒代-羟基腺苷基同型半胱氨酸、硒代腺苷、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷基-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、腺苷基-羟基硒亚砜、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜及其组合。在实施方案中,分离的化合物是甲基硒代腺苷。在其它实施方案中,组合物用于增加细胞的线粒体功能。

[0035] 在一些实施方案中,给予受试者的含硒组合物的量是在有此需要的受试者中延缓、停止或逆转线粒体功能障碍和/或与线粒体功能障碍有关的疾病或病症的进展,同时最大限度地减少毒性的有效量。在一些实施方案中,本申请的含硒组合物(例如,有机硒(例如,硒化酵母(例如,SEL-PLEX)或存在于其中或从中衍生的含硒化合物))以日剂量给予,以提供每日25和800 μg 之间的硒给受试者(例如,SEL-PLEX以这样一种方式给予受试者,其每日提供25和800 μg 之间的硒给受试者)。然而,本申请并不受这样的限制。事实上,在一些实施方案中,本申请的含硒的组合物以日剂量给予,以每日提供少于25(例如,24、23、22、21、20,或更少)或大于800(例如,825、850、900、950、1000、1050、1100,或更多) μg 的硒给受试者。在一些实施方案中,硒(例如,有机硒(例如,硒化酵母(例如,SEL-PLEX)))以200和500 μg 每日之间的日剂量给予。在其它实施方案中,硒以200和400 $\mu\text{g}/\text{日}$ 之间的日剂量给予。在

一些实施方案中,单一剂量的硒(例如,有机硒(例如,硒化酵母(例如,SEL-PLEX)))每日一次给予。在其它实施方案中,每日给予2、3、4或更多个剂量。在一些实施方案中,日剂量是介于25-75 mg之间的硒。在其它实施方案中,日剂量是200 mg的硒(例如,有机硒(例如,硒化酵母(例如,SEL-PLEX)))。

[0036] 本申请还提供治疗线粒体功能障碍的方法,其包括给予有此需要的受试者有效量的包含含有硒的组合物的药用组合物,所述硒选自含有2%或更少无机硒的富硒酵母、含有2%或更少无机硒的富硒酵母的水溶性部分,和含有2%或更少无机硒的富硒酵母的水不溶性部分;和药学上可接受的载体。

[0037] 本申请还提供在受试者中治疗与线粒体功能障碍有关的疾病或病症的方法,其包括给予有此需要的受试者有效量的含有2%或更少无机硒的富硒酵母的步骤。

[0038] 附图简述

图1显示允许完全溶解样品的顺序提取程序和本申请的一个实施方案的各个部分中硒代甲硫氨酸的测定。

[0039] 图2显示通过阴离子交换HPLC-ICP-MS测定富硒(Se)酵母中的硒代甲硫氨酸。插图显示经SEC-ICP-MS的消化的完整性验证(无Se存在于高分子量部分和从柱定量回收)。

[0040] 图3显示根据本申请的一个实施方案,获得和鉴定存在于硒化酵母中的水溶性和水不溶性部分的示例性方法。

[0041] 图4显示对硒代谢物的HPLC-ICP-MS分析。(a) 尺寸排阻色谱法(SEC)-ICP-MS; (b) 离子对(HFBA)反相HPLC-ICP-MS。

[0042] 图5显示水提取物的尺寸排阻-ICP MS色谱图(76Se-深灰色线,77Se-黑线,78Se浅灰色线)。

[0043] 图6显示SUPERDEX肽柱后,水提取物的尺寸排阻-ICP MS色谱图(76Se-深灰色线,77Se-黑线,78Se浅灰色线)。

[0044] 图7显示样品的SEC肽色谱图:a) 水提取物,b) 分离峰I, c) 用胰蛋白酶消化的峰I,d) 用蛋白酶消化的水提取物;黑线-80Se,浅灰色线78Se,深灰色线-77Se。

[0045] 图8显示(A) 图7A的水提取物的肽色谱图和(B) 从图7A所示的SEC柱在58 min洗脱的峰的反相(RP)色谱图。

[0046] 图9显示利用质谱和与Orbitrap联接的反相色谱法,从图8B所示的SEC柱在58 min洗脱的硒代化合物的鉴定。

[0047] 图10显示以洗脱顺序出现的富硒酵母的水溶性提取物的亚-部分的反相HPLC-ICP MS色谱图。亚部分1-10被示出。

[0048] 图11显示在样品的亚部分8中鉴定的含硒肽的质谱。

[0049] 图12显示胰蛋白酶消化的物质的亚部分的色谱图。亚部分1-10被示出。

[0050] 图13显示从富硒酵母的水溶性提取物亚-部分的胰蛋白酶消化物中发现的含硒肽列表(MW-分子量,Z-电离状态)。

[0051] 图14显示存在于SELPLEX中的含硒化合物的阳离子-交换HPLC-ICP MS曲线图,(A) 全部样品和(B) 分离的部分的反相ICP MS色谱图。

[0052] 图15显示利用质谱和Orbitrap,在SELPLEX中鉴定的含硒化合物的列表。

[0053] 图16显示在酸性(顶部小图)和碱性(底部小图)媒介中洗脱的各个SPE部分中硒物

质的分子量 (SEC-ICP MS) 曲线图。

[0054] 图17显示酵母蛋白提取物的胰蛋白酶消化的SEC分馏。

[0055] 图18显示各个SEC部分的曲线图

图19显示样品L09-4531的印迹和印迹片数VI和VII的RP ICP MS色谱图。

[0056] 图20显示印迹样品提取物(非水溶性)中发现的含硒化合物的示例性MS谱。

[0057] 图21提供使用1D凝胶电泳、HPLC分析前的印迹消化、印迹样品的ICP MS分析和印迹样品的MS/MS (Orbitrap) 分析,从富硒酵母的水不溶性提取物鉴定的含硒肽列表。

[0058] 图22显示在13-月龄Po1G小鼠中具有升高的肥大标记基因(包括Myh7和Ankrd1)的心脏肥大。(A) 来自13-14月龄Po1G小鼠的扩大的心脏尺寸和心肌细胞。从Dai等(2010)修改的照片。(B) 在13-月龄Po1G心脏中的升高的Myh7和Ankrd1表达(深色条)。表达水平经Actb mRNA归一化,并表示为均数± SEM (n=6)。当与它们在2-月龄Po1G心脏中的表达(浅色条)比较时,*P < 0.01。

[0059] 图23显示通过实时PCR和蛋白质印迹分析,在来自以富硒酵母的形式给予硒的小鼠的小鼠心肌中肥大标记Myh7和Ankrd1的衰减表达。A. 通过实时PCR,在对照 (SD) 和治疗 (SP) 年幼和年老Po1G小鼠中Myh7 mRNA的心脏表达(顶部小图),和通过蛋白质印迹分析,对照 (SD) 和治疗 (SP) 年老Po1G小鼠的Myh7蛋白的心脏表达(中部小图)。相对Myh7蛋白表达(经各个样品中Actb蛋白的归一化)显示于底部小图中。B. 对照 (SD) 和治疗 (SP) 年幼和年老Po1G小鼠中Ankrd1 mRNA的心脏表达(顶部小图),和对照 (SD) 和治疗 (SP) 年老Po1G小鼠的Ankrd1蛋白的心脏表达(中部小图)。定量Myh7蛋白表达(经各个样品中Actb蛋白的归一化)显示于底部小图中。对于A和B二者,数据被表示为指定数目的小鼠的均数± sem.*P < 0.05,** P<0.01,与相同年龄的对照组对比。

[0060] 图24显示通过以富硒酵母的形式给予硒,在小鼠心脏中Nfat信号传导的调节作用。A. 心脏肥大中Cn/Nfat信号传导的示意图解。Nfat活性经包括神经钙蛋白(S6K和Gsk3b)的通路调节。灰色背景表示在实验期间鉴定的心脏中的分子靶标,该实验在开发由以富硒酵母形式的硒调节的本申请实施方案期间进行。B. 来自对照 (SD) 和治疗 (SP) 的13月龄小鼠的心脏中Cn-A、pNfatc2、Gsk3b和pS6K1的蛋白质印迹分析。C. 在蛋白质印迹中pNfatc2、Gsk3b和pS6K1蛋白水平(由Actb或微管蛋白归一化)的定量分析。在C中,数据被表示为每组4只小鼠的均数± sem.*P < 0.05,**P < 0.01。

[0061] 图25显示Foxo3,一种抗肥大基因,在给予含有富硒酵母形式的硒的食物374天的Po1G小鼠中的提高的心脏表达。(A) 在Po1G心脏中显示显性Foxo3表达的Foxo家族成员基因的QRT-PCR,并且与对照 (SD) Po1G小鼠比较,在治疗 (SP) Po1G小鼠中,心脏Foxo3表达升高。(B-C) 在硒 (SP) 治疗374天后,Po1G小鼠心脏中的Foxo3蛋白水平升高。在A和C中,数据被表示为指定数目的小鼠的均数± sem.*P < 0.05对比SD对照。

[0062] 图26显示在Po1G小鼠中,以mRNA水平调节Atm和Gadd45g表达。A. QRT-PCR显示在Po1G小鼠中心脏Atm表达的年龄依赖性减少,且这种减少通过给予富硒酵母的硒而消失。B. 在给予富硒酵母形式的硒治疗374天后,Po1G小鼠中Gadd45g mRNA表达升高。数据被表示为每组指定数目的小鼠的均数± sem。在条图中的不同字母表示显著性差异,如经ANOVA分析,接着用Student's t-检验所测定的。

[0063] 图27显示用硒治疗,经QRT-PCR在Po1G心脏中的Ucp1-3 mRNA表达的调节作用。数

据被表示为每组指定数目的小鼠的均数± sem。当与对照组中Ucp2表达比较时, **P < 0.01。

[0064] 图28显示, QRT-PCR显示Po1G小鼠中心脏Lcn2表达的年龄依赖性增加和通过给予富硒酵母形式的硒抑制年龄依赖性增加的表达。数据被表示为每组6只小鼠的均数± sem。条图中的不同字母表示显著性差异, 如经ANOVA分析, 接着用Student's t-检验所测定的。

[0065] 图29显示在来自正常小鼠的骨骼肌中升高的总蛋白水平, 所述正常小鼠喂给补充有含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的食物 (SP, SELPLEX) 或不补充硒的食物 (SD) 达3个月。数据被表示为每组指定数目的样品的均数± sem. P<0.01。

[0066] 图30显示从微阵列分析获得的数据, 其表明在用补充有含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的食物 (SP) 喂养3个月的正常小鼠骨骼肌中, 存在涉及用于蛋白合成的蛋白伸长的升高的基因表达 (与补充有硒代甲硫氨酸 (SM) 形式的硒的食物, 补充有亚硒酸钠 (SS) 形式的硒的对照食物或不补充硒的食物比较)。数据被表示为均数± sd (n=6)。

[0067] 图31显示从微阵列分析获得的数据, 其表明在用补充有含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的食物 (SP) 喂养3个月的正常小鼠骨骼肌中, 存在减少的参与蛋白合成的分子 (Gsk3b, mTor, S6K1) 表达和升高的用于蛋白合成的关键信号传导分子 (Prkaa2) 的表达 (与补充有硒代甲硫氨酸 (SM) 形式的硒、补充有亚硒酸钠 (SS) 形式的硒的对照食物或不补充硒的食物比较)。数据被表示为均数± sd (n=6)。

[0068] 图32显示在用补充有含有2%或更少无机硒的富硒酵母 (SP) 形式的硒的食物喂养3个月的正常小鼠 (与补充有硒代甲硫氨酸 (SM) 形式的硒, 补充有亚硒酸钠 (SS) 形式的硒的对照食物或不补充硒的食物比较) 的骨骼肌中, 萎缩基因Trim63和Fbxo32的表达显著减少。数据被表示为均数± sd (n=6)。

[0069] 图33显示在用补充有含有2%或更少无机硒的富硒酵母 (SP) 形式的硒的食物喂养3个月的正常小鼠的骨骼肌中 (与补充有硒代甲硫氨酸 (SM) 形式的硒, 补充有亚硒酸钠 (SS) 形式的硒的对照食物或不补充硒的食物比较), Acvr2b的表达显著减少。数据被表示为均数± sd (n=6)。

[0070] 图34显示在用补充有含有2%或更少无机硒的富硒酵母 (SP) 形式的硒的食物喂养3个月的正常小鼠骨骼肌中 (与补充有硒代甲硫氨酸 (SM) 形式的硒, 补充有亚硒酸钠 (SS) 形式的硒的对照食物或不补充硒 (SD) 的食物比较), 分化的肌肉卫星 (干细胞) 的表达升高。数据被表示为均数± sd (n=6)。

[0071] 图35显示由含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式 (或存在于其中的一种或多种含硒化合物) 的硒调节的通路的几个非限制性实例, 导致在给予在开发本申请的实施方案进行的实验期间发现的相同化合物的受试者中总骨骼肌蛋白质量增加。

[0072] 图36显示与对照 (Exp 1, 未补充硒, Exp 2, 补充有硒代甲硫氨酸) 比较, 在给予富硒酵母形式的硒 (Exp 4) 的小鼠骨骼肌中MAP2K2的表达减少。亚硒酸钠 (Exp 3) 也减少小鼠骨骼肌中MAP2K2的表达。

[0073] 图37显示, 给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的受试者显示在皮层组织和腓肠肌组织中FT0基因表达显著减少的水平。Exp 1显示在对照 (SD) 小鼠中的FT0表达, Exp 2显示在喂饲硒代甲硫氨酸的小鼠中的FT0表达, Exp 3显示在喂食亚硒酸钠的小鼠中的FT0表达, 和Exp 4显示在喂食含有2%或更少无机硒的富硒酵母 (SELPLEX) 的小鼠中的FT0

表达。

[0074] 图38显示,与对照受试者(SD)比较,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(SP)导致在骨骼肌中的PGC1- α 表达的显著提高和Nr2F2表达的显著减少。 $*p<0.05$ 。

[0075] 图39显示,与对照受试者(SD)比较,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(SP)导致在肝中PGC1- α 表达的显著减少和Nr2F2表达的显著提高。 $*p<0.05$ 。

[0076] 图40显示(A) 在对照(C)、LVSe-MR ($C_{22}H_{44}N_7O_5Se$) (#6) 和甲基硒代腺苷 ($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9) 的存在下,在3种不同的呼吸状态(包括ATP合成(状态III)、复合物I依赖性(NADH-驱动)最大呼吸能力(状态V_{fccp})和复合物II(FADH-驱动)依赖性最大呼吸能力(状态V_{succ})中测定的线粒体耗氧率(OCR)参数。(B) 显示与对照组比较,含硒肽LVSe-MR增加状态III(7.7%)、状态V_{fccp}(13.3%)和状态V_{succ}(9.6%)。与使用液相氧电极(oxytherm)的对照比较,甲基硒代腺苷($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9)增加状态III(29.9%)、状态V_{fccp}(17.3%)和状态V_{succ}(15.3%)。

[0077] 图41显示在0、50、500和1000份/每十亿(PPB)甲基硒代腺苷($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9)的存在下的线粒体酶活性(PDHC活性、复合物I活性和复合物IV活性)。

[0078] 定义

如本文所用的,术语“酵母”和“酵母细胞”指在真菌界分类的真核微生物,具有细胞壁、细胞膜和细胞内成分。酵母不形成特定的分类或动植物种类分组。目前已知约1,500种;据估计所有的酵母种类仅有1%已得到描述。术语“酵母”通常被作为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)的同义词,但是酵母的动植物种类多样性由它们在两个菌属:子囊菌(Ascomycota)和担子菌(Basidiomycota)中的位置显示。芽殖酵母(“真正的酵母”)被分类在酵母菌目(order Saccharomycetales)中。大多数的酵母品种通过芽殖而无性繁殖,虽然某些通过二分裂繁殖。酵母是单细胞的,虽然一些品种通过形成一串连接的称为假菌丝(*pseudohyphae*),或伪菌丝(*false hyphae*)的芽殖细胞而变成多细胞的。酵母大小可根据种类而有很大的变化,通常测量为直径3-4 μm ,虽然一些酵母可达到40 μm 。

[0079] 如本文所用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白”全部指通过共价“肽键”连接的氨基酸的主要序列。一般来说,肽由几个氨基酸组成,通常是2-50个氨基酸,并且比蛋白短。术语“多肽”涵盖肽和蛋白。在一些实施方案中,肽、多肽或蛋白是合成的,而在其它实施方案中,肽、多肽或蛋白是重组的或天然发生的。合成的肽是在体外经人工方式生产的肽(即,未在体内生产)。

[0080] 术语“样品”和“样本”以其广泛的意义使用并涵盖从任何来源获得的样品或样本。如本文所用的,术语“样品”被用来指从动物(包括人)获得的生物样品,并涵盖流体、固体、组织,和基因。在本申请的一些实施方案中,生物样品包括脑脊液(CSF)、浆液、尿液、唾液、血液和血液制品如血浆、血清等。然而,这些实例不应视为限制本申请使用的样品类型。

[0081] 如本文所用的,术语“硒-富集的酵母”和“富硒酵母”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)。本申请不受所用硒盐的限制。确实,各种各样的硒盐被期望可用于本申请包括,但不限于,亚硒酸钠、硒酸钠、亚硒酸钴或硒酸钴。游离硒代甲硫氨酸(例如,不与细胞或酵母结合)也可用作富硒酵母的硒源,因为酵母结合这种形式的硒。在培养期间,由于硒和硫之间的化学相似性,酵母结合硒以代替通常在细胞内的含硫有机化合物中的硫。在这样的酵母制剂中的含硒化合物是以结合进多肽/蛋白的形式存在的硒

代甲硫氨酸。在这样的制剂以硒代甲硫氨酸形式存在的总细胞硒的量将是变化的,但可在介于10和100%、20-60%、50-75%和60和75%之间。在硒代甲硫氨酸生物合成的途径中,富硒酵母制剂中的有机硒的其余部分主要由中间产物组成。这些包括,但不限于,硒代半胱氨酸、硒代胱硫醚、硒代同型半胱氨酸和硒代-腺苷基硒代甲硫氨酸。最终产品中的残留无机硒盐的量一般是相对低的(例如,< 2%)。然而,本申请不受这种百分率的限制,因为含有比这种百分率更高(例如,2和70%之间)或更低(例如,0.1和2%之间)的制剂也被本申请涵盖在内。

[0082] 如本文所用的,术语"SEPLEX"指的是在补料分批发酵中培养的一种干燥的,没有自生能力的富硒酵母(例如,登录号CNCM I-3060的酿酒酵母,Collection Nationale De Cultures De Microorganisms (CNCM),巴斯德研究所(Institut Pasteur),巴黎,法国),所述补料分批发酵以最大限度地减少硒盐对酵母生长速率的不利影响并允许无机硒最佳结合到细胞有机材料中的方式,提供增量的甘蔗废糖蜜和硒盐。除去残留的无机硒(例如,使用一个严格的洗涤过程)且不超过2%的总硒含量。

[0083] 如本文所用的,术语"有机硒"指任何有机化合物,其中硒替代硫。因此,有机硒可指由酵母经生物合成的任何这样的化合物,或它可指经化学合成的游离的有机硒代-化合物。后者的实例是游离硒代甲硫氨酸。

[0084] 如本文所用的,术语"无机硒"一般指任何硒盐(例如,亚硒酸钠、硒酸钠、亚硒酸钴和硒酸钴)。还存在各种其它无机硒源(见例如,在默克索引(Merck index)中列出的那些)。富硒酵母可使用无机硒的来源生成,包括,但不限于,亚硒酸钠、硒酸钠、亚硒酸钴、硒酸钴、硒酸、亚硒酸、溴化硒、氯化硒、六氟化硒,硒亚砜,溴氧化硒、氯氧化硒、氟氧化硒、硫化硒、四溴化硒、四氯化硒和四氟化硒。

[0085] 如本文所用的,术语"硒化合物"、"含硒化合物"和"含硒成分"指能够提供生物可利用来源的硒的任何含硒化合物。硒化合物可包括无机化合物,如含有亚硒酸盐和硒酸盐的矿物质,和有机化合物如硒醚、含有SeCys的二肽和三肽的缀合物、硒醇(selenols)、硒亚砜、含硒蛋白和肽、含有硒(例如,替代其中的硫)的氨基酸(例如,异亮氨酸、丙氨酸、亮氨酸、天门冬酰胺、赖氨酸、天冬氨酸盐、甲硫氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、精氨酸、组氨酸)或二价或四价硒的化合物、富硒酵母或其部分,以及本文所述的含硒分子。硒化合物可源自酵母或植物提取物或源自商业合成。在特定的实施方案中,硒化合物提供生物可利用的硒源,硒很容易被人体吸收到血浆或细胞内液体中。在优选的实施方案中,含硒化合物是富硒酵母或存在于其中或从中衍生的含硒分子。

[0086] 如本文所用的,术语"氧化应激"指例如作为利用分子氧的代谢过程的副产物生成的氧自由基(例如,超氧化物阴离子(O_2^-)、羟基(OH),和过氧化氢(H_2O_2))的细胞毒作用(见例如,Coyle等, Science 262: 689-695 (1993))。

[0087] 如本文所用的,术语"宿主"、"受试者"和"患者"指被研究、分析、测试、诊断或治疗的任何动物,包括但不限于,人和非-人动物(例如,狗、猫、牛、马、羊、家禽、鱼、甲壳类动物等)。如本文所用的,术语"宿主"、"受试者"和"患者"可互换使用,除非另外指明。

[0088] 如本文所用的,术语"体内"指在活的有机体进行的,在生物有机体内发生的研究和/或实验。

[0089] 如本文所用的,术语"体外"指活的有机体外部的人造环境和指正常应发生在有机

体内,但在人造环境中发生的生物过程或反应。体外环境可包含,但不限于,试管和细胞培养。

[0090] 术语“蛋白质印迹”、“蛋白质免疫印迹”、“免疫印迹”和“Western”指已固定到膜载体上的蛋白、多肽或肽的免疫学分析。蛋白首先被聚丙烯酰胺凝胶电泳(即SDS-PAGE)溶解以分离蛋白,接着将蛋白从凝胶转移至固体载体,如硝基纤维素或尼龙膜。然后使固定的蛋白暴露于对相关抗原具有反应性的抗体。抗体的结合(即,初次抗体)通过使用特异地结合初次抗体的二次抗体来检测。二次抗体通常缀合于酶,所述酶允许通过生产有色反应产物使抗原-抗体复合物可视化或催化发光酶促反应(例如,ECL试剂,Amersham)。

[0091] 如本文所用的,术语“ELISA”指酶联免疫吸附试验(或EIA)。许多ELISA方法和应用是本领域已知的,并在许多参考文献(见例如,Crowther,“酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)(ELISA)”,在分子生物方法手册(Molecular Biomethods Handbook),Rapley et al. (编辑),pp. 595-617,Human Press, Inc., Totowa, N.J. (1998);Harlow和Lane (编辑),抗体:实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual),Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988);Ausubel等(编辑),分子生物学的当前方案(Current Protocols in Molecular Biology), Ch. 11, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994))中有描述。此外,有许多可市售获得的ELISA 试验系统。

[0092] 如本文所用的,术语“报道试剂”、“报道分子”、“检测底物”和“检测试剂”用于指允许结合于抗原的抗体的检测和/或量化的试剂。例如,在一些实施方案中,报道试剂是一种已与抗体缀合的酶的比色底物。将合适的底物加入到抗体-酶缀合物中导致比色或荧光信号(例如,在缀合的抗体与相关抗原的结合后)的产生。其它报道试剂包括,但不限于,放射性化合物。这种定义也涵盖生物素和抗生物素蛋白-基化合物(例如,包括但不限于中性链亲和素和链霉抗生物素)作为检测系统的部分的应用。

[0093] 如本文所用的,术语“信号”通常用于指指示反应已经发生(例如,抗体结合于抗原)的任何可检测方法。期望放射性、荧光的或比色产物/试剂形式中的信号均将在本申请中发现用途。在本申请的各个实施方案中,对信号进行定性评价,同时在另外的实施方案中,对信号进行定量评价。

[0094] 如本文所用的,术语“固体载体”被用于指试剂如抗体、抗原,和其它试验成分连接的任何固体或固定材料。例如,在ELISA方法中,微量滴定板的孔提供固体载体。固体载体的其它实例包括显微镜载玻片、盖玻片、珠、颗粒,细胞培养瓶,以及许多其它合适的物件。

[0095] 如本文所用的,术语“受试者的特征组织”指组织样品的一种或多种特性的鉴定。在一些实施方案中,组织通过本文详细描述的各种基因的表达,或其缺失的识别进行特征鉴定。

[0096] 如本文所用的,术语“能够特异地检测基因表达的试剂”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。合适的试剂的实例包括,但不限于,能够特异地杂交于mRNA或cDNA的核酸探针,和抗体(例如,单克隆或多克隆抗体)。

[0097] 如本文所用的,术语“有效量”指足以影响有益或所需结果的组合物(例如,含硒-例如,SEPLEX)的量。有效量可以一种或多种给药途径、应用程序或剂量给予且不打算限于特定制剂或给药途径。

[0098] 如本文所用的,术语“给药”和“给予”指给予药物、前药,或其它药剂,或治疗剂治

疗(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)的行动。给药至人体的示例性途径可通过眼(眼科)、嘴(口腔)、皮肤(局部或经皮)、鼻(鼻腔)、肺(吸入)、口腔粘膜(颊下)、耳、直肠、阴道、经注射(例如,静脉内、皮下、肿瘤内、腹膜内等)等。

[0099] 如本文所用的,术语“共同给药”和“共同给予”指给予受试者至少两种药物(例如,包含SEL-PLEX或一种或多种存在于其中或从中衍生的含硒化合物的组合物)和一种或多种其它药物(例如,治疗剂)或疗法。在一些实施方案中,共同给予两种或更多种药物或疗法是同时发生的。在其它实施方案中,第一药物/疗法在第二药物/疗法之前给予。本领域技术人员理解,所采用的给予各种药物或疗法的制剂和/或途径可以变化。共同给药的适宜剂量可由本领域技术人员容易地确定。在一些实施方案中,当共同给予药物或疗法时,各自的药物或疗法以比适合于它们单独给药的更低剂量给予。因此,在其中共同给予药物或疗法可降低所需的潜在有害(例如,毒性)药物的剂量,和/或当共同给予两种或更多种药物导致受试者对通过共同给予其它药物的药物之一的有益作用的敏感性的实施方案中,共同给药是特别合乎需要的。

[0100] 如本文所用的,术语“治疗”或语法上的同义词涵盖疾病症状的改善和/或逆转。当用于筛选本申请的方法时,引起与疾病有关的任何参数的改善的化合物可因此被鉴定为治疗化合物。如本文所用的,术语“面临疾病的风险”(例如,面临肥厚性心肌病、糖尿病、癌症等的风险)指易于经历特定疾病(例如,肥厚性心肌病、糖尿病、癌症等)的受试者(例如,人)。这种易患病的体质可以是遗传的(例如,经历疾病,如遗传性疾病的特殊遗传倾向),或由于其它因素(例如,高血压、年龄、体重、环境条件、暴露于环境中存在的有害化合物等)。因此,不打算将本申请限于任何特定的风险,也不打算将本申请限于任何特定疾病。

[0101] 如本文所用的,术语“罹患疾病”(例如,罹患肥厚性心肌病、糖尿病、癌症等)指经历特定疾病(例如,肥厚性心肌病、糖尿病、癌症等)的受试者(例如,人)。不打算将本申请限于任何特定的体征或症状,也不限于任何疾病。因此,意欲使本申请涵盖经历任何程度的疾病(例如,从亚-临床表现至完全-爆发的疾病(full-blown disease))的受试者,其中受试者表现出至少一些与特定疾病有关的征候(例如,体征和症状)。

[0102] 如本文所用的,术语“疾病”和“病理学病症”可互换使用,以描述与活的动物或其任何器官或组织的正常状态的任何受损(其打断或改变正常功能的表现)有关的状态、体征,和/或症状,并可对环境因素(如营养失调、工业危害,或气候),对特定的感染剂(如蠕虫、细菌,或病毒),对有机体的先天缺陷(如各种遗传异常),或对这些和其它因素的组合有反应。

[0103] 术语“化合物”指可用来治疗或预防疾病、病变、病症,或身体功能的紊乱的任何化学实体、药品、药物等。化合物包含已知的和潜在的治疗化合物二者。通过使用本申请的筛选方法筛选,可确定为治疗剂的化合物。“已知的治疗化合物”指在这样的治疗中已显示(例如,通过动物试验或以前给予人的经验)为有效的治疗化合物。换言之,已知的治疗化合物不限于在治疗疾病(例如,神经退行性疾病)中有效的化合物。

[0104] 如本文所用的,术语“药剂盒”用于指试剂和其它材料的组合。期望药剂盒可包括试剂如营养素和药物以及给药装置。不打算使术语“药剂盒”限于特定试剂和/或其它材料的组合。

[0105] 如本文所用的,术语"毒性"指对受试者、细胞或组织的任何不利的或有害的影响(与给予毒物之前的相同的细胞或组织比较)。

[0106] 如本文所用的,术语"药用组合物"指活性剂(例如,包含SEL-PLEX和/或存在于其中或从中衍生的一种或多种含硒化合物的组合物)与载体(惰性或活性)的组合,使得组合物特别适合于体外、体内或离体的诊断或治疗应用。

[0107] 如本文所用的,术语"药学上可接受的"或"药理学上可接受的"指,当给予受试者时,基本上不产生不利反应,例如,毒性、过敏的或免疫学反应的组合物。

[0108] 如本文所用的,术语"局部地"指应用本申请的组合物至皮肤和粘膜细胞和组织(例如,齿槽、颊下、舌下、嚼肌,或鼻粘膜,和中空器官或体腔的内衬的其它组织和细胞)的表面。

[0109] 如本文所用的,术语"药学上可接受的载体"指任何标准药用载体,包括但不限于,磷酸缓冲盐水溶液、水、乳液(例如,如油/水或水/油乳液),和各种类型的湿润剂、任何和所有的溶剂、分散介质、包衣料、十二烷基硫酸钠、等渗剂和吸收延迟剂、崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠)等。组合物还可包含稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和辅助剂的实例(见例如,Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版, Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975),通过引用结合到本文中)。

[0110] 如本文所用的,术语"药学上可接受的盐"指本申请化合物的任何盐(例如,通过与酸或碱反应而获得),其在目标受试者(例如,哺乳动物受试者,和/或体内或离体、细胞、组织或器官)中是生理学上可耐受的。本申请化合物的"盐"可衍生自无机或有机酸和碱。酸的实例包括,但不限于,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、羟基乙酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、甲苯-对-磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、磺酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。其它酸,如草酸,虽然本身不是药学上可接受的,可用于制备用作获得本申请的化合物及其药学上可接受的酸加成盐的中间体的盐。

[0111] 碱的实例包括,但不限于,碱金属(例如,钠)氢氧化物、碱土金属(例如,镁)氢氧化物、氨,和式 NW_4^+ 的化合物,其中W是 C_{1-4} 烷基等。

[0112] 盐的实例包括,但不限于:乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐,十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、flucoheptanoate、甘油磷酸盐、半硫酸盐(hemisulfate)、庚酸盐、己酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐,2-萘磺酸盐,烟酸盐,草酸盐,棕榈酸盐,果胶酯酸盐,过硫酸盐,苯丙酸盐,苦味酸盐,特戊酸盐,丙酸盐,琥珀酸盐,酒石酸盐,硫氰酸盐,甲苯磺酸盐,十一烷酸盐等。盐的其它实例包括与合适的阳离子如 Na^+ 、 NH_4^+ 和 NW_4^+ (其中W是 C_{1-4} 烷基)等化合的本申请化合物的阴离子。对于治疗使用,本申请化合物的盐期望为药学上可接受的。然而,也可以在非-药学上可接受的酸和碱的盐,例如,在药学上可接受的化合物的制备或纯化中找到用途。

[0113] 对于治疗使用,本申请化合物的盐期望为药学上可接受的。然而,也可以使用非-药学上可接受的酸和碱的盐,例如,在药学上可接受的化合物的制备或纯化中也可找到用途。

[0114] 当与核酸相关联使用时,术语"分离的",如在"分离的寡核苷酸"或"分离的多核苷酸"中,指的是一种核酸序列,该核酸序列从在其天然来源中通常相关的至少一种成分或污

染物中被鉴定和分离出来。分离的核酸以与其自然发现的形式不同的形式存在,或者存在于和其天然存在环境不同的环境中。相反,未分离的核酸是以其在自然界中的存在状态发现的核酸,如DNA和RNA。例如,一个给定的DNA序列(如一个基因)存在于宿主细胞染色体上位于邻近基因的附近;RNA序列,如编码一个特定蛋白的特定mRNA序列,作为编码大量蛋白的众多其它mRNA形成的混合物存在于细胞中。然而,编码给定蛋白的分离的核酸包括例如在正常表达该给定蛋白的细胞中的这样的核酸,其中在该细胞中所述核酸的染色体位置不同于天然细胞中的染色体位置,或者该核酸的侧翼序列为不同于天然情况下发现的侧翼序列的核酸序列。分离的核酸、寡核苷酸或多核苷酸可以以单链或双链的形式存在。当一种分离的核酸,寡核苷酸或多核苷酸待用于表达蛋白时,该寡核苷酸或多核苷酸将最少包含有义链或编码链(即,该寡核苷酸或多核苷酸可以是单链的),但也可以包含有义链和反义链两者(即,该寡核苷酸或多核苷酸可以是双链的)。

[0115] 如本文所用的,术语“纯化的”或“纯化”指的是从样品中移除成分(如污染物)。例如:抗体通过移除污染性非免疫球蛋白被纯化;它们也可以通过移除不与靶分子结合的免疫球蛋白而得到纯化。非免疫球蛋白的去除和/或不与靶分子结合的免疫球蛋白的去除导致样品中与靶反应的免疫球蛋白的百分率增高。在另一例子中,在细菌宿主细胞中表达重组多肽,并且通过移除宿主细胞蛋白纯化该多肽;由此样品中重组多肽的百分比增高。

[0116] 如本文所用的,术语“高效液相色谱法”和术语“HPLC”指一种分离化合物的液相色谱形式。所述化合物溶于溶液中。化合物通过向柱中注入一个柱体积的样品混合物而分离。HPLC器具包含一个流动相的贮库、泵、注射器、分离柱,和检测器。经定量检测折射率的变化,UV-VIS在一个设定的波长的吸收,用一个合适的波长激发后的荧光,或电化学反应记录柱流出物中的被分析物的存在。

[0117] 如本文所用的,术语“扫描电子显微镜”和术语“SEM”指一种类型的电子显微镜,其通过用高能量的电子束,以光栅扫描模式扫描样品,使样品表面成像。电子与组成样品的原子相互作用,产生含有有关样品表面形貌、组成和其它特性如电导率的信息的信号。

[0118] 如本文所用的,术语“固定剂”指的是一种化学物,其能够使一种物质固定于另一种物质,以“固定”、稳定,或其他方式,以其目前的形式保持物质,以防止物质降解或其它变化。通常,固定剂用于扫描电子显微镜(SEM)以制备样品。一次固定剂:如本文所用的,术语“一次固定剂”指用来“固定”物质的第一固定剂。二次固定剂:如本文所用的,术语“二次固定剂”指用来“固定”物质的第二固定剂。三次固定剂:如本文所用的,术语“三次固定剂”指用来“固定”物质的第三固定剂。

[0119] 如本文所用的,术语“被分析物”指原子、分子、原子和/或分子的分组、物质,或化学成分。一种被分析物,其本身不能被测量,相反被分析物的方面或特性(物理、化学、生物等)可使用分析程序(如HPLC)测定。例如,人们不能测量一把“椅子”(被分析物-成分)本身,但是可测量椅子的高度、宽度等。同样地,人们不能测量一种毒枝菌素,但是可测量与其浓度相关的毒枝菌素荧光。

[0120] 如本文所用的,术语“信号”一般用于指表明反应已经发生(例如,抗体结合于抗原)的任何可检测的过程。信号可经定性及定量评价。“信号”类型的实例包括,但不限于,放射性信号、荧光信号或比色产物/试剂信号。

[0121] 如本文所用的,术语“生物可利用度”指可被有机体利用或到达系统循环的部分分

子或成分。当分子或成分经静脉内给予时,其生物可利用度为100%。然而,当分子或成分经由其它途径(如口服)给予时,其生物可利用度降低(由于不完全的吸收和首过代谢作用)。

[0122] 本申请的详细描述

通过电子传递链的(ETC)的电子下传获得的能量被用来将质子从线粒体基质泵送入膜间隙,创造一种跨越线粒体内部膜(IMM)的电化学质子梯度,称为 $\Delta \Psi$ 。这种电化学质子梯度允许ATP合酶(ATP-酶)使用H⁺流通过酶返回基质,从二磷酸腺苷(ADP)和无机磷酸盐生成ATP。在线粒体中已鉴定出4个膜-结合的复合物。各自是嵌入内部膜的跨膜结构。它们中有3个是质子泵。结构是通过脂溶性电子载体和水溶性电子载体电连接。复合物I(NADH辅酶Q还原酶;标记I)接受来自Krebs循环电子载体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的电子,并使它们通过辅酶Q(泛醌;(UQ)),其还接受来自复合物II(琥珀酸脱氢酶;(II))的电子。UQ传递电子至复合物III(细胞色素bc₁复合物;(III)),其将它们传递给细胞色素c(cyt c)。Cyt c传递电子至复合物IV(细胞色素c氧化酶;(IV)),其使用电子和氢离子以将分子氧还原为水。

[0123] 在复合物I(NADH脱氢酶,也称为NADH:泛醌氧化还原酶)中,两个电子从NADH移除并转移至可溶于液体的载体,泛醌(Q)中。还原的产物,泛醇(QH₂)在膜内自由扩散,和复合物I跨膜转位四个质子(H⁺),因此产生质子梯度。复合物I是主要位点之一,在此发生过早的电子泄漏至氧,因而是产生有害的超氧化物的主要部位之一。因此,与复合物III一起,其产生由传递链生成的大多数活性氧(主要为超氧化物基团)。除了遗传突变,线粒体功能障碍被认为主要是由活性氧(ROS)对其亚-成分造成的损害引起的(见例如,Kirkinezos和Moraes, 2001)。确实,存在广泛的一致性,即老化过程和代谢性疾病(例如,2型糖尿病)的发病起源于ROS-诱导的细胞损伤。线粒体是细胞内ROS的主要生产者和这种区别意味着它们还是遭受由ROS引起的损害和所谓的氧化应激的第一细胞器(见例如,Kaneto et al., 2012)。显著数目的线粒体疾病特异性地与复合物I功能障碍或不足有关。

[0124] 电子的通路如下发生:在一个两-电子步骤中,通过还原黄素单核苷酸为FMNH₂,NADH被氧化为NAD⁺。然后FMNH₂在一个两-电子步骤中,通过半醌中间体被氧化。各个电子因此从FMNH₂转移至Fe-S簇,从Fe-S簇转移至泛醌(Q)。第一电子的转移导致Q的游离基(半醌)形式,且第二电的转移将半醌形式还原为泛醇形式,QH₂。在这个过程中,4个质子从线粒体基质转位至膜间隙。

[0125] 在复合物II(琥珀酸脱氢酶)中,额外的电子被传递至源自琥珀酸盐的醌池(Q)中并转移(经由FAD)至Q中。复合物II包含4个蛋白亚单位:SDHA、SDHB、SDHC和SDHD。其它电子供体(例如,脂肪酸和甘油3-磷酸)也引导电子进入Q(经由FAD)。

[0126] 在复合物III(细胞色素bc₁复合物)中,Q-循环有助于通过质子的不对称吸收/释放所致的质子梯度。两个电子在Q₀位点从QH₂移除,随后转移至细胞色素c,一种位于膜间隙内的水溶性电子载体的两个分子中。随后两个其它电子穿过蛋白至Q_i位点,在那里泛醌的醌部分被还原为对苯二酚。质子梯度由两个对苯二酚(4H+4e⁻)在Q₀位点氧化,在Q_i位点形成一个对苯二酚(2H+2e⁻)而形成(总共有6个质子被转位:两个质子还原醌为对苯二酚和4个质子从两个泛醌分子释出)。

[0127] 在复合物IV(细胞色素c氧化酶),有时称为细胞色素A3中,从4个细胞色素c分子移除4个电子并转移至分子氧(O₂)中,产生2分子的水。同时,4个质子从线粒体基质移除(虽

然只有2个被转位穿过膜),产生质子梯度。细胞色素c氧化酶的活性受氰化物的抑制。

[0128] 电子传递链和氧化磷酸化通过跨越内部线粒体膜的质子梯度连接。质子从线粒体基质的流出产生电化学梯度(质子梯度)。这种梯度被 F_0F_1 ATP合酶复合物用来使ATP经由氧化磷酸化。ATP合酶有时被描述为电子传递链的复合物V。ATP合酶的 F_0 成分用作提供质子流返进入线粒体基质的离子通道。这种回流释放在生成电子载体(NAD^+ 和Q)的氧化形式期间产生的自由能。自由能被用来驱动由复合物的 F_1 成分催化的ATP合成。

[0129] 因此,复合物I(NADH:泛醌氧化还原酶)是线粒体呼吸链中的第一个酶。它从NADH(经糖和脂肪的氧化产生)提取能量,并以跨越线粒体内部膜的电势差或电压捕获能量。电势差被用来供应合成ATP的能量。由于复合物I是细胞中能量产生的中心,其功能异常导致广泛范围的神经肌肉疾病。它们中的一些由于线粒体基因组中的突变,但其它一些则因复合物I的活性降低,或活性氧产生的增加而产生。

[0130] 非胰岛素-依赖性(II型)糖尿病(DM)是以骨骼肌、肝和脂肪中的胰岛素抵抗,合并有由于胰腺 β -细胞功能所致胰岛素分泌缺乏为特征的疾病。胰岛素抵抗是II型糖尿病的中性特点。已知例如,绝大多数的II型糖尿病是胰岛素-抵抗。同样地,在II型糖尿病患者的子女中,胰岛素抵抗是该病后来发展的最好的预测因素(见例如,Warram等,1990)。减少胰岛素抵抗的干预措施也预防糖尿病的发展。线粒体功能对于正常葡萄糖-刺激的来自胰腺 β 细胞的胰岛素分泌素是需要的。

[0131] 骨骼肌和肝是维持葡萄糖稳态的两个关键的胰岛素-反应器官。这些器官转变为胰岛素-抵抗状态占在罹患II型糖尿病的患者中发现的葡萄糖代谢改变的大多数(见例如,Lowell和Shulman,2005)。在这两个器官中,根据因胰岛素抵抗发展而自然增加的后果,骨骼肌是更重要的。这是由于已发现骨骼肌处理掉或代谢每日摄取的葡萄糖的80-90% (见例如,DeFronzo等,1985)。

[0132] 基因组广泛表达分析已经证明,当与健康对照组比较时,线粒体氧化磷酸化(OXPHOS)基因在糖尿病前期和糖尿病个体中表现出减少的表达,并且在许多情况下,这些基因是转录共激活剂增殖物-激活受体 γ 共激活剂1- α (PGC1- α ,见例如,Mootha et al.,2003)的靶标。在这些研究中,OXPHOS基因表达的典型下降是适度的(约20%),但与在患有或者受损的葡萄糖耐受性或者相对于具有正常葡萄糖耐受性的那些II型糖尿病的个体中,89%的所研究的基因显示较低的表达极其一致。

[0133] 本领域一般理解和意识到,促进在肌肉中的OXPHOS活性的药物或药剂作为用于2型糖尿病的有价值的治疗剂存在。为支持这种假设,早就已知有氧训练是治疗糖尿病的最好的非药物干预,因为它增加线粒体活性和数量并促进OXPHOS基因表达。

[0134] 除了2型糖尿病,还存在多种与线粒体功能障碍有关的疾病和病症。由于线粒体是高级有机体细胞的主要能量来源,线粒体提供广泛罗列的细胞呼吸、氧化和代谢过程的直接和间接生物化学调节作用。这些包括电子传递链(ETC)活性,其驱动氧化磷酸化,以产生三磷酸腺苷(ATP)形式的代谢能量,并且其还成为细胞内钙稳态中线粒体中心作用的基础。

[0135] 除了它们在生长细胞中能量产生的作用外,线粒体(或至少线粒体成分)还参与程序性细胞死亡(PCD),也称为细胞凋亡(见例如,Newmeyer等,Cell 1994, 79:353-364;Liu等,Cell 1996, 86:147-157)。细胞凋亡对于神经系统的正常发育,和对于免疫系统的适当的功能是需要的。此外,一些疾病状态被认为是与或者不足的或者过量的细胞凋亡水平

有关(例如,癌症和自身免疫性疾病,和分别在后一情况下的中风损伤和阿尔茨海默氏病中的神经退化)。线粒体在细胞凋亡中的作用已有文献报道(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)。改变的或有缺陷的线粒体活性,包括但不限于ETC的任何步骤的缺乏,可导致具有损害细胞和组织的潜力的高反应性自由基的生成。这些自由基可包括活性氧(ROS)如超氧化物、过亚硝酸盐和羟基,和潜在的其它可能对细胞有毒的反应性物质。例如,氧自由基诱导的脂质过氧化反应是在中枢神经系统(CNS)损伤中完全确立的发病机制,例如在许多退行性疾病,和在局部缺血(例如,中风)中发现的发病机制。

[0136] 除了自由基介导的组织损害外,还有至少两种暴露于反应性自由基的有害后果,反应性自由基由不利地影响线粒体本身的线粒体功能障碍产生。首先,自由基介导的损害可灭活ETC的一种或多种蛋白。其次,自由基介导的损害可导致已被称为“渗透性转变”(PT)或“线粒体渗透性转变”(MPT)的线粒体崩塌。根据线粒体功能的一般可接受的理论,并且如本文所述的,适当的ETC呼吸活性需要通过偶合化学渗透机制,在内部线粒体膜维持电化学势。自由基氧化活性可消散这种膜电位,由此防止ATP生物合成和中断病毒生物化学能量来源的产生。另外,线粒体蛋白如细胞色素c在渗透性转变后可泄漏线粒体并可诱导称为细胞凋亡或程序性细胞死亡的基因程序性细胞自杀序列。

[0137] 线粒体相关的疾病(例如,由功能障碍的线粒体引起)也可通过并非自由基氧化的机制与线粒体膜电化学势的失去相关,并且渗透性转变可由线粒体基因、基因产品或相关下游介质分子和/或线粒体外基因、基因产品或相关下游介质的直接或间接影响,或从其它已知的或未知的原因产生。因此线粒体电位的丧失可以是与改变的线粒体功能相关的疾病进展中的一个关键事件,所述疾病包括退行性疾病以及与老化相关的疾病/病症(例如,癌症、心血管疾病和心力衰竭、2型糖尿病、阿尔茨海默氏病和帕金森氏病、脂肪肝疾病、白内障、骨质疏松、肌肉萎缩、睡眠失调和炎性疾病如牛皮癣、关节炎和结肠炎)。

[0138] 心肌病

核-编码DNA聚合酶c (POLG) 是动物细胞线粒体中唯一已知的DNA聚合酶。人POLG基因中的突变与各种症状相关的许多疾病有联系,包括眼肌麻痹、白内障,进行性肌肉无力、帕金森氏综合征、卵巢过早衰竭、男性不育、听力损失(老年性耳聋),和心脏功能障碍(见例如,Kujoth等, *PLoS Genetics*, 2007. 3 (2))。PolG^(D257A) 小鼠模型显示线粒体编码的复合物的呼吸功能在12周的进行性下降,导致氧消耗降低和ATP生产减少(见例如,Kujoth等, *PLoS Genetics*, 2007. 3 (2))。已报道PolG小鼠显示加速的心脏老化表型伴有由扩大的心脏尺寸和13-14个月龄的心肌细胞指示的显著的心脏肥大(见例如,Dai等2010, Kujoth等, 2005和图25A)。

[0139] 肥厚性心肌病(HCM)是最常见的单基因遗传形式的心脏疾病并且是35岁以下年龄的个体心源性猝死的最常见原因(见例如,Frey等, *Nat Rev Cardiol*, 2012. 9 (2): p. 91-100)。为HCM的基础的遗传突变已进行了充分的特征鉴定,具有大多数突变编码肌小节蛋白,如肌球蛋白-7(也称为心肌β-肌球蛋白重链;MYH7) (见例如Frey等, *Nat Rev Cardiol*, 2012. 9 (2): p. 91-100)。

[0140] 心锚蛋白重复蛋白(CARP)由ANKRD1基因编码,ANKRD1基因和CARP核因子的表达涉及左室肥厚、人心脏衰竭、扩张型心肌病(DCM),和阿霉素-诱导的心肌病(见例如,Duboscq-

Bidot等, Archives of Cardiovascular Diseases, 2009. 102, 增刊1 (0): p. S73)。与文献记录的表型一致,当与POLG年幼小鼠比较时,在POLG年老小鼠的心脏组织中,心脏肥大标记物Myh7和Ankrd1的年龄依赖性表达升高。

[0141] 因此,在开发本申请的实施方案期间进行的整个实验中产生的经验数据确定,PolG小鼠系是针对心脏肥大的卓越的实验模型。例如,已发现和确定PolG小鼠提供一种心脏老化的活动物模型,其允许依次分析/测试涉及心脏老化和肥大的特异性分子(例如,在遗传和蛋白水平)。此外,还发现PolG模型允许评价和表征改变涉及心脏老化和肥大的特异性分子的化合物(例如,在遗传和蛋白水平)。因此,在一些实施方案中,本申请提供鉴定试验化合物的方法(例如,用于治疗和/或预防肥厚性心肌病),该方法包括使表现出显著的心脏肥大(由扩大的心脏尺寸和13-14个月龄的心肌细胞指示)的PolG小鼠暴露于一种或多种化合物,并检测在试验化合物存在下(例如,与未给予试验化合物(例如,给予对照物质)的动物比较),心脏尺寸或心肌细胞和/或涉及肥厚性心肌病的分子表达的改变。如本文所用的,术语“试验化合物”指可用来治疗或预防疾病、病变、病症,或身体功能的紊乱,或以其它方式改变样品的生理学或细胞状态的任何化学实体、药品、药物等。试验化合物包含已知的和潜在的治疗化合物二者。通过使用本申请的筛选方法筛选,可确定为治疗剂的试验化合物。“已知的治疗化合物”指在这样的治疗或预防中已显示(例如,通过动物试验或以前给予人的经验)为有效的治疗化合物。在一些实施方案中,试验化合物是单一药物候选物。

[0142] 本申请提供含硒的组合物(例如,由此获得或衍生的富硒酵母和含硒化合物)和使用含硒组合物以治疗和抑制心肌病的方法。特别是,本申请提供包含富硒酵母(例如,包含2%或更少无机硒)、存在于其中和/或从中衍生的含硒化合物的组合物,和使用它们以治疗和抑制受试者的心脏肥大的方法(例如,作为对心肌病的疗效能和/或预防性治疗)。例如,在一些实施方案中,本申请提供包含富硒酵母(例如,SEPLEX)、存在于其中和/或从中衍生的含硒化合物的组合物,和使用它们以抑制或减弱肥厚性蛋白肌球蛋白重链β (Myh7) 和/或心脏锚蛋白重复蛋白 (Ankrd1) 的表达的方法(例如,作为对心肌肥大的疗效能和/或预防性治疗)。虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒,当给予受试者时,调节转录因子Foxo3以抑制Myh7和Ankrd1分子的表达(例如,由此抑制心肌肥大)。

[0143] 在开发本申请的实施方案期间进行的实验已经发现和表明,富硒酵母(例如,含有2%或更少无机硒的富硒酵母),当给予受试者时,抑制肥厚性蛋白肌球蛋白重链β (Myh7) 和心脏锚蛋白重复蛋白 (Ankrd1) 的积聚,由此抑制和/或预防心肌老化和肥大。虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒,当给予受试者时,调节Nfat信号传导(例如,通过增加Nfatc2/3的磷酸化,导致核Nfatc2/3活性相关基因转录的降低(例如,由此抑制肥厚性蛋白Myh7和Ankrd1的心脏积聚))。

[0144] 在开发本申请的实施方案期间进行的其它实验已经发现和表明,含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒,当给予受试者时,显著减少pS6K1的心脏表达(例如,由此抑制和/或减少心肌老化和肥大)。

[0145] Atm/Gadd45信号传导在骨骼肌及心肌二者中,是细胞周期阻滞和DNA修复的关键途径。在开发本申请的实施方案期间进行实验,以特征鉴定来自对照和硒治疗的Po1G小鼠的心脏中的Atm和Gadd45表达。已发现在Po1G小鼠心脏中,Atm表达存在年龄依赖性降低。然而,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒消除Po1G小鼠中Atm表达的年龄依赖性降低。此外,心脏Gadd45的表达,Atm的下游目标在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G小鼠中显著上调。虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒,当给予受试者(例如,年老的受试者)时,中和和/或消除年龄相关的Atm在心脏组织中的表达减少(例如,由此增强和/或提高Atm的分子下游的表达(例如,Gadd45)和/或通过保护心肌细胞避免DNA损害(例如,由此抑制和/或预防心肌肥大(例如,在老年受试者中))来改善心脏的健康)。

[0146] 在线粒体(MT)中的解偶联蛋白(Ucp)对于生热作用和维持线粒体电位或完整性是重要的。Ucp2的缺失已被证明引起线粒体的较短寿命和活性氧(ROS)的产生升高。在开发本申请的实施方案期间进行的实验已经发现和表明,Ucp2是心肌中表达的主要Ucps。给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒并不改变Ucp1或Ucp3表达,然而,Ucp2表达在硒-治疗的Po1G小鼠中显著升高。虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒,当给予受试者(例如,年老的受试者)时,上调心脏中的Ucp2表达(例如,由此控制活性氧产生(例如,通过保护心肌细胞避免DNA损害(例如,由此抑制和/或预防心肌肥大(例如,在老年受试者中))来改善心脏的健康)。

[0147] Lcn2是心力衰竭的一个生物标记物,且对于心肌收缩是至关重要的。当人衰老时,心脏变得僵硬,伴有心肌细胞扩大和肌细胞收缩力减少,二者是心力衰竭和心脏肥大的主要原因。实验在开发本申请的实施方案期间进行,以表征来自对照和硒治疗Po1G小鼠的心脏中的Lcn2表达。Lcn2表达的显著和引人注目的增加在老年Po1G心脏中发现。甚至更让人吃惊的是观察到,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒导致年老Po1G小鼠(与对照组比较)中Lcn2表达的显著减少。这些发现支持本文公开的关于在硒-治疗的po1G心脏中pNfat2/3水平增加(例如,基因转录中Nfat活性的灭活)的其它结果。此外,已证明Lcn2是Nfat靶标。因此,虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒,当给予受试者(例如,年老的受试者)时,中和和/或消除心脏组织中与年龄相关的Lcn2表达的升高(例如,由此抑制和/或预防心肌肥厚(例如,在年老的受试者中))。

[0148] 因此,在一优选的实施方案中,本申请提供包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(或其水溶性部分(例如,本文所述的)或其水不溶性部分(例如,本文所述的)或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物(例如,本文所述))的组合物(例如,药用组合物),其被用来在受试者(例如,以在给予含硒的组合物的受试者中抑制心脏肥大和/或涉及心肌增厚的分子表达,与未接受包含硒的组合物的对照受试者中的心肌肥厚和/或涉及心肌增厚的分子表达比较)中减少肥厚性蛋白的心脏表达(例如,以预防性或疗效性治疗心脏肥大)。

[0149] 在另一个优选的实施方案中,本申请提供包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(或其水溶性部分(例如,本文所述的)或其水不溶性部分(例如,本文所述的)或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物(例如,本文所述))的组合物(例如,药用组合物),其被用来给予受试者以防止涉及心肌增厚的分子表达(例如,以在给予含硒的组合物的人或动物受试者中预防心脏肥大(与未接受包含硒的组合物的对照受试者的心脏肥大的存在或严重性比较))。本申请不受受试者中预防性或疗效性治疗的心肌病类型的限制。事实上,本申请的组合物和方法在预防性和/或疗效性治疗从减少肥厚性蛋白的心脏表达收益的任何心肌病中发现用途,包括但不限于,肥厚性心肌病(例如,由于家族性肥厚性心肌病、心肌梗塞,或瓣膜性心脏疾病(例如,相关的瓣膜粘液样变性、乳头肌功能不全或风湿热))、扩大性心肌病、限制性心肌病,和致心律失常性右心室心肌病(ARVC)。

[0150] 虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在优选的实施方案中,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或其水溶性部分(例如,本文所述的)或其水不溶性部分(例如,本文所述的)或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物(例如,本文所述))的硒,降低肥厚性蛋白(例如,beta (β)-肌球蛋白重链和/或锚蛋白重复蛋白)的心脏表达,由此抑制和/或预防心肌老化和肥大。在一个非限制性实施方案中,在给予含硒的组合物的受试者中(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式给予受试者),肥厚性蛋白(例如,beta (β)-肌球蛋白重链和/或锚蛋白重复蛋白)的心脏表达降低通过减少受试者中心脏核Nfatc2/3活性相关基因转录而获得。在另一个非限制性实施方案中,在给予含硒的组合物的受试者(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式给予受试者)中,肥厚性蛋白(例如,beta (β)-肌球蛋白重链、锚蛋白重复蛋白)的心脏表达降低通过减少受试者中心脏核糖体(ribosomal)蛋白激酶(pS6K1)表达和/或活性而发生。

[0151] 在一些实施方案中,在给予含硒的组合物的受试者(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式给予受试者)中,肥厚性蛋白(例如,beta (β)-肌球蛋白重链、锚蛋白重复蛋白)的心脏表达降低通过在受试者中提高叉头框03(foxo3)的心脏表达和/或活性获得。

[0152] 在一些实施方案中,在给予含硒的组合物的受试者(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式给予受试者)中,肥厚性蛋白(例如,beta (β)-肌球蛋白重链、锚蛋白重复蛋白)的心脏表达降低通过在受试者中减少或消除年龄相关的、脂质运载蛋白-2(lipcalin-2)(Lcn2)的心脏表达升高而发生。

[0153] 本申请不受本申请的组合物和方法给予的受试者类型的限制。确实,从给予本申请的组合物和方法收益的各类受试者包括,但不限于,其中心脏肥大的进展要寻求减缓的受试者,其中心脏肥大的进展要停止的受试者和其中心脏肥大的进展要逆转的受试者。在受试者中减慢心脏肥大的进展的非-限制性实例是在受试者中通过以有效减少肥厚性蛋白的心脏表达的量给予含硒的组合物(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式),减少受试者中(例如,与未接受包含硒的组合物的对照受试者比较)肥厚性蛋白(例如,beta (β)-肌球蛋白重链和/或锚蛋白重复蛋白)的心脏表达。

[0154] 受试者可显示心脏肥大的体征、症状或其它指征,或处于(例如,遗传倾向于)显示心脏肥大的体征、症状或其它指征的风险中(例如,目前不显示心脏肥大的体征、症状或其

它指征,但医学上诊断的具有遗传上易面临心脏肥大的高风险的体质)。在其它实施方案中,受试者具有或处于心肌病(例如,肥厚性心肌病(例如,由于家族性肥厚性心肌病、心肌梗塞、瓣膜性心脏疾病(例如,相关的瓣膜粘液样变性、乳头肌功能不全或风湿热)等)、扩大性心肌病、限制性心肌病,和致心律失常性右心室心肌病(ARVC)的风险中。

[0155] 通过比较治疗受试者对比未治疗者的mRNA表达的水平,可检测基因表达的变化。引物,和探针可以获得并根据可识别的序列设计。引物或探针通常为约200、150、100、75、50、25、15、10或5个核苷酸或介于5和200个核苷酸之间的任何整数。引物或探针特异性地杂交于编码具有以下所示序列的蛋白的核酸序列。引物或探针可用报道分子可检测地标记。

[0156] 表1

基因符号	索取号(NCBI)	GI (NCBI)	索取号(NCBI)	GI (NCBI)
Myh7	NP_000248	115496169	NM_000257	115496168
AnKrd1	NP_055206	38327522	NM_014391	38327521
Foxo3	NP_001446	4503739	NM_001455	146260266
Pgc1a	NP_037393	7019499	NM_013261	116284374
Nr2F2	NP_005645	5032173	NM_005654	53749664
Prkaa2	NP_006243	46877068	NM_006252	157909838
Trim63	NP_115977	19924163	NM_032588	378744182
Fbxo32	NP_001229392	335057520	NM_001242463	335057519
Acvr2b	NP_001097	116734708	NM_001106	116734707
Gadd45g	NP_006696	5729836	NM_006705	209413759
UCP2	NP_003346	13259541	NM_003355	13259540
UCP1	NP_068605	11225256	NM_021833	194733736
UCP3	NP_003347	4507807	NM_003356	215272349
Atm	NP_000042	71902540	NM_000051	71902539
mTOR	NP_004949	4826730	NM_004958	206725550
Gsk3b	NP_001139628	225903437	NM_001146156	225903436
S6K1	NP_991385	45430051	NM_205816	45430050
MAP2k2	NP_109587	13489054	NM_030662	187171274
NFAT1	NP_001265598	522021835	NM_001278669	522021834
NFAT2	NP_001129493	209862843	NM_001136021	385137138
Lcn2	NP_005555	38455402	NM_005564	108936956

本文公开的基因的核酸和蛋白序列可由本领域技术人员测定。示例性序列在表1中示出。

[0157] 肌少症

肌少症,年龄相关的骨骼肌质量的丢失,是以肌肉数量和质量的降低,导致运动的逐渐迟缓,力量和能力下降,脆弱和增加跌倒相关的损伤的风险为特征。肌少症已被定义为四肢的骨骼肌质量(kg/身高² (m²))为低于参照组的均数的少于两个标准误差(见例如, Baumgartner等(Am J Epidemiol 1998;147:755-63;149: 1161)。肌少症流行率的估计值范围为从60岁以上成人的13%-24%至80岁和更大年龄的人群中的超过50%。生长激素分泌从

青春期中期逐渐下降,且生长激素已知增加肌肉质量。患有生长激素缺乏症的患者有减少的肌肉质量和增加的脂肪质量。生长激素替代增加肌肉质量并导致脂肪质量减少。

[0158] 参与肌肉组织再生的正常机制起初涉及卫星细胞的募集。肌肉卫星细胞是一个独特谱系的肌源性祖细胞 (myogenic progenitors), 其位于成熟肌纤维的基底膜和肌纤维膜之间 (见例如, Bischoff, 1994; Grounds 和 Yablonka-Reuveni, 1993)。在再生周期中, 卫星细胞被激活并从肌纤维向再生部位迁移以产生成肌细胞。大多数增殖的成肌细胞分化为肌管 (myotubes)。肌管成熟并被结合到肌肉纤维中。不分化为肌管的成肌细胞返回肌纤维, 以更新卫星细胞群体。

[0159] 肌肉再生周期在整个人和动物寿命期间连续地发生 (例如, 以更换损耗或损坏的肌肉组织)。当身体老化时, 肌肉再生周期变得不那么有效。肌少症, 导致肌肉质量和性能下降, 与正常老化相关。虽然骨骼肌在老化期间仍然能够自身再生, 老年人衰老的肌肉的未知因素创造对肌肉卫星细胞激活、增殖和分化是不支持的环境, 导致肌肉组织的净损失 (见例如, Greenlund 和 Nair, 2003)。一些生长因子, 包括肝细胞生长因子 (HGF)、成纤维细胞生长因子 (FF) 和机械生长因子 (MGF), 已显示通过调节卫星细胞激活对肌肉再生有积极影响 (Floss 等, 1997; Miller 等, 2000, Goldspink 和 Harridge; 2004)。

[0160] 本申请提供含硒的组合物 (例如, 富硒酵母和由此获得或衍生的含硒化合物) 和使用含硒的组合物以治疗和抑制肌少症的方法。特别是, 本申请提供包含富硒酵母 (例如, SELPLEX)、存在于其中和/或从中衍生的含硒化合物的组合物, 和使用所述组合物在受试者中增加和/或维持骨骼肌质量的方法 (例如, 作为肌少症的疗效性和/或预防性治疗)。在开发本申请的实施方案期间进行的实验已经发现和表明, 富硒酵母 (例如, 含有2%或更少无机硒的富硒酵母), 当给予受试者时, 提高骨骼肌蛋白合成并且还抑制骨骼肌蛋白酶体蛋白降解。给予受试者含有2%或更少无机硒的富硒酵母还激活骨骼肌卫星 (干细胞) 细胞。而且, 给予受试者富硒酵母激活神经钙蛋白的表达, 由此促进骨骼肌中的肥厚性基因表达。

[0161] 因此, 在一优选的实施方案中, 本申请提供包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式 (或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物) 的硒的组合物 (例如, 药用组合物), 其被用来治疗受试者的肌少症 (例如, 以在给予含硒的组合物的人或动物受试者中增加和/或维持肌肉质量 (与未接受包含硒的组合物的对照受试者的肌肉质量比较))。在另一个优选的实施方案中, 本申请提供包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式 (或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物) 的硒的组合物 (例如, 药用组合物), 其被用来预防受试者的肌少症 (例如, 以在给予含硒的组合物的人或动物受试者中增加和/或维持肌肉质量 (与未接受包含硒的组合物的对照受试者的肌肉质量比较))。

[0162] 虽然对本申请的实践而言, 并不需要理解一种机制, 并且同时本申请不限于任何特定的作用机制, 在一些实施方案中, 在给予富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的硒的受试者中, 总蛋白质量的增加是由于蛋白合成的刺激和/或蛋白降解的抑制。在一个非限制性实施方案中, 在给予硒 (含有2%或更少无机硒的富硒酵母或存在于其中或从中衍生的含硒化合物的形式) 的受试者中, 总蛋白质量的增加是由于存在于含有2%或更少无机硒的富硒酵母中的含硒化合物调节Gsk3b和/或Ampk表达和改变mTOR/MAPK/S6K1信号传导, 因而提高骨骼肌中的蛋白合成的能力。虽然对本申请的实践而言, 并不需要理解一种机制, 并且同时本申请不限于任何特定的作用机制, 在一些实施方案中, 含

有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒刺激肥厚性基因表达(例如,神经钙蛋白和蛋白延伸因子),由此增加蛋白合成和对抗骨骼肌萎缩。

[0163] 在另一个非限制性实施方案中,在给予受试者含硒的组合物(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式)的受试者中,总蛋白质量的增加通过从减少肌肉生长抑制素/Acvr信号传导对蛋白合成的抑制作用产生的蛋白合成增加(例如,由此抑制肌少症和/或导致骨骼肌肥大)而获得。在一些实施方案中,在给予受试者含硒的组合物(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式)的受试者中,总蛋白质量的增加通过激活骨骼肌卫星细胞获得。在一些实施方案中,在给予受试者含硒的组合物(以富硒酵母和/或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物的形式)的受试者中,总蛋白质量的增加通过刺激信号传导分子神经钙蛋白和/或NFAT获得。

[0164] 虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,在给予硒(含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式)的受试者中,抑制蛋白降解和预防骨骼肌萎缩是由于存在于含有2%或更少无机硒的富硒酵母中的含硒化合物减少/减弱萎缩基因Trim63和Fbxo32的表达(由于减少mTOR表达的结果),和/或减弱涉及Foxo转录因子的活性的能力。

[0165] 因此,在一些实施方案中,本申请提供一种治疗肌少症的方法,其包括给予有此需要的受试者(例如,人或动物受试者)有效量的含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物的含硒组合物。在一些实施方案中,本申请提供含硒的组合物(含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物)在受试者中增加骨骼肌卫星细胞激活的方法中的用途。在一些实施方案中,本申请提供含硒的组合物(含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物)在受试者中减少肌肉生长抑制素和/或蛋白合成的Acvr抑制作用的方法中的用途。在一些实施方案中,本申请提供含硒的组合物(含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物)在受试者中抑制肌肉生长抑制素/Acvr信号传导(例如,通过下调肌肉生长抑制素和/或Acvr(例如,Acvr2b)的表达)的方法中的用途(例如增加受试者的骨骼肌质量)。

[0166] 通过测定mRNA表达的水平(与参照基因如放射菌素b (actinomycin) b (Act b)比较)或通过使用分析法如免疫分析检测蛋白水平的增加,可检测基因表达的变化。引物和探针可以获得并根据如下对本文所述的基因所示的示例性参考序列设计。这样的蛋白和核酸序列是公众可获得的。引物或探针通常为约200、150、100、75、50、25、15、10或5个核苷酸或介于5和200个核苷酸之间的任何整数。引物或探针特异性地杂交于编码具有以下所示序列的蛋白的核酸序列。引物或探针可用报道分子可检测地标记。这样的标记物包括Alexa粉、生物素、FAM、TAMRA、HEX、NED、ROX等。

[0167] 在一些实施方案中,本申请提供在有此需要的受试者中维持或增加肌肉质量的方法,其包括给予有效量的含硒的组合物(含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物)至受试者(例如,以在受试者中治疗肌少症)。

[0168] 本申请不受要探索骨骼肌质量维持和/或增加的受试者类型的限制。如上所述,所定义的肌少症是四肢骨骼肌质量(kg/高度² (m²))为低于年青参照组的均数的少于两个标准误差(t-分值)。t-分值通过测量受试者的轴向骨骼肌质量,通常通过dxa (双能x线吸光

测定法)或类似的和可再现的测量来测定。轴向骨骼肌质量的测量可被用来跟踪受试者的进展(在采用本文所述的治疗受试者的方法之前、期间和/或之后),以确定治疗是否减慢、预防,或逆转骨骼肌质量下降。

[0169] 本申请的一个目的是治疗和/或抑制肌少症,包括减慢其进展、停止其进展,和部分地逆转它。减慢肌少症的进展的一个实例是改变时间的长度,受试者将从-1.5趋向-2的t-分值(例如,如果这样的进展通常将花费5年,则本文所用的治疗可延缓这种变化至10年)。部分逆转的实例包括减少t-分值0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0或更多单位(例如,从-2的t-分值移向-1.9、-1.8、-1.7、-1.6、-1.5、-1.4、-1.3、-1.2、-1.1的t-分值等)。治疗肌少症还包括延迟肌少症的发病。例如,如果一个典型的50岁男性将在55岁时开始见到肌少症的体征,根据本申请的治疗可推迟发病1、2、3、4、5、6、7、8、9、10,或更多年。因此,治疗肌少症包括治疗尚未诊断出患有肌少症,但应为易发生肌少症的或预料易发生肌少症的受试者。为易发生肌少症的或预料易发生肌少症的受试者的非限制性实例还包括,但不限于,给予激素疗法包括糖皮质激素类固醇的受试者,患有神经退行性疾病的受试者,患有慢性感染的受试者,患有AIDS的受试者,患有慢性炎性病症的受试者和患有癌症的受试者。

[0170] 从本申请的组合物和方法收益的其它受试者包括罹患肌肉质量损失,但未遭受干扰日常生活行动的病症和/或防止受试者以免独立生活的那些受试者(例如,可能很快就需要帮助生活的患者)。

[0171] 例如,从本申请的组合物和方法收益的受试者包括具有选自(但不限于)以下t分值的受试者:3、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0、-0.1、-0.2、-0.3、-0.4、-0.5、-0.6、-0.7、-0.8、-0.9、-1.0、-1.1、-1.2、-1.3、-1.4、-1.5、-1.6、-1.7、-1.8、-1.9、-2.0、-2.1、-2.2、-2.3、-2.4、-2.5、-2.6、-2.7、-2.8、-2.9、-3.0、-3.1、-3.2、-3.3、-3.4、-3.5、-3.6、-3.7、-3.8、-3.9、-4.0、-4.1、-4.2、-4.3、-4.4、-4.5、-4.6、-4.7、-4.8、-4.9、-5.0、-5.1、-5.2、-5.3、-5.4、-5.5、-5.6、-5.7、-5.8、-5.9和-6.0。然而,本申请并不受这样的限制。例如,在一些实施方案中,从本申请的组合物和方法收益的受试者包括具有t分值高于3或低于-6.0的受试者。

[0172] 在一些实施方案中,从本申请的组合物和方法收益的受试者包括年龄在40-45、45-50、50-55、55-60、60-65、65-70、70-75、75-80、80-85、85-90岁之间,或更大年龄的受试者。然而,本申请并不受这样的限制。例如,在一些实施方案中,从本申请的组合物和方法收益的受试者包括年龄不足40岁的受试者(例如,患有癌症的受试者,患有神经退行性疾病的受试者、患有慢性炎性疾病的受试者等)。

[0173] 在优选的实施方案中,本申请提供一种治疗肌少症的方法,其包括给予有此需要的受试者(例如,人或动物受试者)有效量的含硒的组合物(含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式或存在于其中的或从中获得的一种或多种含硒化合物)。

[0174] 肥胖症、2型糖尿病和相关病症

肌少症和肥胖症是两个独立但相互关联的病症,其在发达国家中对期望寿命和卫生保健费用有越来越大的影响。减少的肌肉质量伴有增加的脂肪质量的组合被称为"少肌性肥胖(sarcopenic obesity)"(见例如,Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-

113)。肥胖症加重肌少症,因为它促进脂肪质量的增加和脂质积聚,这防止氨基酸结合和减少骨骼肌中的蛋白合成(见例如,Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113)。反过来,由于骨骼肌质量对具有全身葡萄糖处置和胰岛素敏感性的基本作用的代谢健康是至关重要的,肌少症加重肥胖症(见例如,Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113)。除了肌少症,肥胖症往往是与其它代谢性疾病如II型糖尿病、高血糖症等相关的副作用。已充分理解,遗传上易患病的体质和肥胖相关分子的表达也是一个促进因素。

[0175] 肥胖症在发达国家中对期望寿命和卫生保健费用有越来越大的影响(见例如,Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113)。肥胖症与几种代谢性疾病如II型糖尿病、高血糖代谢综合征、胰岛素抵抗和许多其它疾病有关。要理解,遗传和与增加的肥胖有关的特异性基因的表达对这些病症起着一种促进作用。

[0176] 一个这样的实例是脂肪质量和肥胖相关基因(FTO),也称为“肥胖基因”。FTO与身体质量指数增加和儿童和成人中易患肥胖症的体质强烈相关(见例如,Gulati等, PNAS, 2013. 110 (7): p. 2557-2562)。FTO基因是广泛表达的,但在大脑中,mRNA水平在海马回、小脑和下丘脑内是特别高的,提示脑FTO在控制食物摄入量、全身代谢和肥胖中的潜在作用(见例如,Church, PLoS Genetics, 2009)。

[0177] 实行在开发本申请的实施方案期间进行的其它实验,以确定给予受试者硒是否可改变FTO的表达。利用在实施例2描述的动物模型,确定给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的受试者显示与对照受试者比较的显著减少水平的FTO基因表达,这不仅在皮层组织(倍数变化= -1.70)中,而且还在腓肠肌组织(倍数变化= -3.33)中显示。

[0178] 在患有2型糖尿病受试者中,在增加的FTO表达和减少的线粒体氧化功能之间存在强烈的关系(见例如,Bravard等, 2011)。从富硒酵母鉴定和分离的几种含硒化合物被发现显著提高线粒体生物能量,伴有增加的线粒体ATP合成能力以及使用复合物I或II依赖性底物的增加的最大呼吸容量。因此,本申请在一些实施方案中提供治疗受试者(例如,患有糖尿病的受试者和/或肥胖症的受试者)的方法,其包括给予受试者有效量的含硒的组合物(含有2%或更少无机硒的富硒酵母,含有2%或更少无机硒的富硒酵母的水溶性部分,含有2%或更少无机硒的富硒酵母的非水溶性部分,富硒酵母的提取物(例如,在酸性条件下可溶的),可溶性硒代糖蛋白,含硒化合物(例如,从富硒酵母获得或衍生的(例如,含有2%或更少无机硒的富硒酵母)或其衍生物,分离的或合成的含硒化合物(例如,硒醚、含有SeCys的二-和/或三-肽的缀合物、硒醇或硒亚砜(或其衍生物)、本文所述的含硒蛋白和/或含硒肽(例如,在实施例1中)) (例如,由此提高线粒体ATP生产,增加线粒体呼吸,增加葡萄糖代谢,和/或减少与肥胖相关的分子表达(例如,FTO))。

[0179] 在开发本申请的实施方案期间也进行实验,以研究给予受试者硒是否可改变受试者的肝和/或骨骼肌中的OXPHOS活性(例如,作为2型糖尿病的治疗剂)。在开发本申请的实施方案期间产生的经验数据发现,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒,导致PGC1- α 在骨骼肌中的表达与对照受试者比较的显著提高。

[0180] PGC1- α 是一种强大的转录共激活剂,其提高骨骼肌中的线粒体活性。然而,在非骨骼肌的组织中,PGC1- α 水平的表达升高在受试者中可具有不利和/或有害的作用。例如,在肝中,PGC1- α 表现出与其在骨骼肌中表现的作用不同的作用。特别是,在肝中的PGC1- α 水平升高导致糖质新生增加(葡萄糖生产;见例如,Liang和Ward, 2006),一个发生在伴有胰岛

素敏感性受损而无法代谢葡萄糖的糖尿病受试者中的极其不利的事件。

[0181] 出乎意料地,发现给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒导致在肝组织中PGC1- α 表达与对照受试者比较的显著减少。基于给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒导致在骨骼肌中PGC1- α 表达与对照受试者比较的显著提高的观察,这个发现是让人惊奇的。因此,在一些实施方案中,本申请提供包含富硒酵母(包含2%或更少无机硒(或存在于其中或从中衍生的一种或多种含硒化合物(例如,在实施例1中描述))的组合物,其用于提高在受试者的骨骼肌中的PGC1- α 表达,同时降低在受试者的肝中的PGC1- α 表达的方法中(例如,由此提供给受试者在骨骼肌中提高的葡萄糖代谢和处置(例如,通过提高的OXPHOS)和抑制葡萄糖在肝中的生产)。

[0182] COUP-TFII (COUP转录因子2),也称为Nr2F2 (核激活亚家族2,组F,成员2)是一种公认的PGC1- α 的直接抑制剂(见例如,Lin等, 2011)。进行实验以分析在给予包含硒的组合物的受试者中的Nr2F2表达。此外,令人惊奇地发现,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒导致在骨骼肌中与对照受试者比较的Nr2F2表达的显著减少,而在肝组织中有与对照组比较的Nr2F2的显著提高。因此,本申请提供关于含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或其一种或多种水溶性部分或其一种或多种水不溶性部分或一种或多种存在于其中或从中衍生的含硒化合物(见实施例1))的含硒组合物,用于在受试者的多种组织(例如,骨骼肌组织和肝组织)中调节葡萄糖稳态的用途的第一证据。

[0183] 因此,在一些实施方案中,本申请提供治疗(治疗性或预防性)受试者(例如,患有2型糖尿病的受试者)的方法,其包括给予有效量的包含富硒酵母(包含2%或更少无机硒(或其一种或多种水溶性部分或其一种或多种水不溶性部分或一种或多种存在于其中或从中衍生的含硒化合物))的组合物,以增强在受试者骨骼肌中的PGC1- α 表达,同时降低在受试者肝中的PGC1- α 表达(例如,由此提高在受试者骨骼肌中的葡萄糖代谢和/或处置并抑制在受试者肝中的葡萄糖生产)。虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,通过硒(当给予受试者时)减少在受试者骨骼肌中的Nr2f2表达(例如,由此提高在骨骼肌中的PGC1- α 表达)和增强在受试者肝中的Nr2f2表达(例如,由此减少在肝中的PGC1- α 表达)的能力,提高在受试者骨骼肌中的葡萄糖代谢/处置,同时抑制在受试者肝中发生的葡萄糖生产。

[0184] 本申请还提供也可能通过给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母(而给予亚硒酸盐或硒代甲硫氨酸是显著无效的),以优先地和有区分地调节肝特异性线粒体活性。因此,本申请提供硒(例如,含有2%或更少无机硒的富硒酵母、亚硒酸钠等)给予受试者可用来诱导/增强葡萄糖-燃烧(OXPHOS)基因的肝特异性表达和/或葡萄糖代谢。因此,在一些实施方案中,本申请提供通过给予有此需要的受试者(例如,2型糖尿病受试者)硒(例如,富硒酵母(例如,包含2%或更少无机硒)或其一种或多种水溶性部分或其一种或多种水不溶性部分或一种或多种存在于其中或从中衍生的含硒化合物、亚硒酸钠等),提高在受试者肝中的葡萄糖利用的方法。

[0185] 在开发本申请的实施方案期间进行的实验证明,在给予本文所述的硒组合物的受试者肝中增加OXPHOS基因表达,显示与对照组比较的适度,但显著增加的表达(约20-25%)。这种增加是根据文献记录的并在胰岛素-抵抗和糖尿病受试者中看到相应的基因表达降低(见例如,Mootha等, 2004)。因此,在一些实施方案中,本申请的组合物和方法被用来在受

试者中治疗2型糖尿病(例如,虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,本申请提供增加在肝中的特异性线粒体活性的组合物和方法(例如,其恢复在2型糖尿病受试者中观察到的降低的线粒体活性)。

[0186] 其它实验在开发本申请的实施方案期间进行,以确定在实施例1中鉴定的特异性含硒化合物是否具有生物活性(例如,以确定是否含硒化合物将显示生物活性和/或如果从酵母细胞和/或其它非-含硒细胞成分的内部*mélange*的限制分离和纯化,是否含硒化合物可能具有更多(或更少)的生物活性)。从实施例1的富硒酵母鉴定的许多最丰富的含硒化合物和分子被合成。

[0187] 实验的一个焦点是如在实施例1中描述的存在于富硒酵母中总硒的最多25%的水溶性提取物。推测来自水溶性提取物的含硒化合物将是第一个从受试者及其通过肠道的通道的消费的富硒酵母释出/消化的。在上面实施例1中还描述了使用计算机辅助预测模型,鉴定存在于富硒酵母的含硒蛋白。此外,实验鉴定通过消化酶(例如,胰蛋白酶)的作用释出的小的含硒肽。

[0188] 为分析和鉴定,生成多个含硒化合物。为确定各个含硒化合物对线粒体生物能量的电位影响(如果有任何影响的话),含硒化合物直接使用分离的线粒体测试。几种含硒化合物证实在所有3种呼吸状态中线粒体活性的正增加和增加的线粒体生物能量模式。因此,本申请提供含硒化合物(例如,LVSe-MR ($C_{22}H_{44}N_7O_5Se$)、甲基硒代腺苷($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$)、硒代腺苷基同型半胱氨酸($C_{14}H_{20}N_6O_5Se$)和在实施例1中鉴定的其它化合物)和包含含硒化合物的组合物的鉴定和表征,所述化合物用于在受试者(例如,有此需要的受试者(例如,2型糖尿病受试者))中调节线粒体活性/生物能量。

[0189] 例如,在一些实施方案中,本申请提供包含本文所述的含硒化合物的组合物(例如,药用组合物)(例如,在实施例1中(例如,在制备治疗病症或疾病(例如,肥胖症、糖尿病、胰岛素抵抗、代谢综合征、慢性炎症(例如,肝炎、脂肪组织炎症等)肝脂肪变性等的药物中的用途)。在一些实施方案中,本申请提供治疗有此需要的受试者(例如,肥胖症受试者)的方法,其包括给予受试者有效量的包含本文所述的含硒化合物(例如,在实施例1中)的组合物(例如,药用组合物),以增加线粒体活性(例如,骨骼肌特异性或肝特异性线粒体活性(例如,在受试者中导致提高的葡萄糖代谢))。在一些实施方案中,本申请提供治疗有此需要的受试者(例如,糖尿病受试者)的方法,其包括给予受试者包含本文所述的含硒化合物(例如,在实施例1中)的有效量的组合物(例如,药用组合物),以增加线粒体活性(例如,骨骼肌特异性或肝特异性线粒体活性)。虽然对本申请的实践而言,并不需要理解一种机制,并且同时本申请不限于任何特定的作用机制,在一些实施方案中,通过增加线粒体中的ATP合成,在受试者中出现增加的线粒体活性(例如,骨骼肌特异性或肝特异性线粒体活性)。在一些实施方案中,通过增加呼吸容量(例如,最大呼吸容量(例如,使用复合物I或II依赖性底物)),在受试者中出现增加的线粒体活性(例如,骨骼肌特异性或肝特异性线粒体活性)。

[0190] 另一个令人惊奇的发现是这样的事实,虽然某些含硒化合物当与线粒体一起温育时显示出提高的线粒体活性特性,但对于鉴定和表征的许多其它含硒化合物却不是这种情况。例如,几种含硒化合物对线粒体活性显示出负性作用。特别是,令人惊奇地发现在总体结构上共享某些相似性的几种含硒化合物,在关于改变线粒体活性的能力方面显示出许多

不同的生物特性。例如,谷氨酰基硒代半胱氨酸($C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$) (#10)降低ATP合成(状态III)达几乎19%,即使其整体结构类似于/不截然不同于甲基硒代腺苷($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9),后者增加ATP合成达17.3%。在这两种存在于富硒酵母中的含硒化合物之间,这是一种对线粒体活性大于36%摆幅的作用。

[0191] 由于种本申请的几种含硒组合物显示增强线粒体复合物I活性的能力的事实,进行实验以确定线粒体刺激是否可通过由含硒化合物除去损害的活性氧(ROS)产生。因此,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以评价含硒化合物的抗氧化效力。

[0192] 已发现一些含硒化合物具有/显示抗氧化能力。此外,一些含硒化合物具有/显示为相加的或轻度协同的、轻度拮抗的,或协同的抗氧化能力(例如,在氧自由基清除能力方面)。

[0193] 在开发本申请的实施方案期间生成的数据和信息是独特和新奇的发现。特别是,本申请提供用于治疗(例如,预防性和/或疗效性治疗)线粒体功能障碍或不全(例如,相关糖尿病(例如,II型糖尿病)、肥胖症、胰岛素抵抗、糖尿病心肌病等)的新组合物和方法。在一些实施方案中,本申请提供包含两种或更多种含硒化合物(例如,富硒酵母的水溶性部分、富硒酵母的非水溶性部分、存在于富硒酵母和/或从中衍生的含硒化合物)的组合物,所述含硒化合物结合以生成包含所需的、提高特异性线粒体活性的能力的组合物。

[0194] 例如,在一些实施方案中,组合物(例如,药用组合物)包含2或更多(例如,3或更多、4或更多、5或更多、6或更多、7或更多、8或更多、9或更多、10或更多、15或更多、20或更多、30或更多、40或更多,或50或更多)种不同的含硒化合物(例如,本文所述的那些)。在一些实施方案中,本申请提供一种组合物,其包含2或更多(例如,3或更多、4或更多、5或更多、6或更多、7或更多、8或更多、9或更多、10或更多、15或更多、20或更多、30或更多、40或更多,或50或更多)种含硒化合物(例如,分离的、化学合成的,或重组的含硒化合物)的组合,特别适合于特异性应用(例如,当组合时,显示所需水平的生物活性(例如,刺激和/或抑制活性))。

[0195] 例如,在一些实施方案中,第一组合物包含被用来在肌肉组织中增强线粒体活性(例如,ATP生产和/或葡萄糖代谢)的两种或更多种含硒化合物的组合,而第二组合物包含被用来在肝组织中改变线粒体活性(例如,ATP生产和/或葡萄糖代谢)的两种或更多种不同的含硒化合物(例如,显示不同于第一组合物的生物活性的生物活性)的组合。在一些实施方案中,本申请提供包含含硒化合物(例如,在实施例1中鉴定)的组合物(例如,药用组合物)。在一些实施方案中,本申请提供在受试者中增加PDHC酶活性和/或增加线粒体复合物I活性的方法,其包括给予有此需要的受试者(例如,II型糖尿病受试者)有效量的组合物(例如,药用组合物),所述组合物包含给予受试者的含硒化合物(例如,在实施例1中描述的),其增加线粒体复合物I和/或PDHC活性(例如,由此在受试者(例如,在骨骼肌和/或肝)中增加线粒体呼吸)。

[0196] 在一些实施方案中,本文提供的是治疗方法,其包括:给予患有与肥胖症或胰岛素抵抗相关的病症的受试者药学上有效量的含硒的组合物(例如,含有2%或更少无机硒的富硒酵母,含有2%或更少无机硒的富硒酵母的水溶性部分,含有2%或更少无机硒的富硒酵母的水不溶性部分,富硒酵母的提取物(例如,在酸性条件下可溶的),可溶的硒代糖蛋白,含硒化合物(例如,从富硒酵母(例如,含有2%或更少无机硒的富硒酵母)或其衍生物获得或衍

生的,分离的或合成的含硒化合物(例如,硒醚、含有SeCys的二-和/或三-肽的缀合物、硒醇或硒亚砜(或其衍生物)、本文所述的含硒蛋白和/或含硒肽(例如,在实施例1中),单独或与另一种药物组合。在一些实施方案中,给药引起病症的一种或多种症状的减轻或消除,防止病症的一种或多种症状的严重性增加,和/或减轻、预防,或消除其它疾病或病症中的一种或多种。

[0197] 在某些实施方案中,胰岛素抵抗发生在受试者的脂肪细胞、肝细胞或肌细胞中。在特定实施方案中,胰岛素抵抗引起受试者罹患受损的葡萄糖代谢。在进一步的实施方案中,给予本申请的含硒组合物引起受试者中的葡萄糖代谢的增加(例如,通过脂肪细胞、肝和/或骨骼肌)。在一些实施方案中,葡萄糖代谢的增加通过增加的线粒体ATP合成、线粒体呼吸,和/或胰岛素激活信号传导而引起。

[0198] 在特定实施方案中,给予本申请的含硒组合物引起受试者中的身体脂肪减少(例如,受试者中脂肪细胞的大小和/或数量减少)。在某些实施方案中,给药引起受试者丧失至少10磅(例如,10、15、20、35、60、100、200或更多磅)。在一些实施方案中,给药引起受试者的体重的至少5%减少(例如,至少7%、10%、20%、30%、50%、75%减少或更多)。在一些实施方案中,治疗的病症是肥胖症。在其它实施方案中,治疗的病症是糖尿病(例如,II型或I和II型二者)。在另外的实施方案中,治疗的病症是胰岛素抵抗。

[0199] 在一些实施方案中,受试者经历或处于经历病症如肥胖症、糖尿病,和胰岛素抵抗的风险中。在一些实施方案中,治疗导致葡萄糖代谢增加、身体脂肪减少,身体脂肪增加的缺乏、胰岛素受体信号传导增加、线粒体活性增加/升高、慢性肝炎的减轻或预防、脂肪组织的慢性炎症的减轻或预防、肝脂肪变性的减轻或预防、代谢能量消耗的促进、循环游离脂肪酸的减少,和/或胆固醇的减少的后果。

[0200] 可通过本文提供的方法和药学上可接受的组合物治疗的病症和疾病状态包括,但不限于,肥胖症、糖尿病、II型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抵抗综合征、脂质代谢病症,和肝脂肪变性疾病(也称为脂肪肝病)。脂肪肝病的范围可从单独的脂肪肝(脂肪变性)到与炎症相关的脂肪肝(脂肪性肝炎)。

[0201] 生殖力

可通过本文提供的方法和药学上可接受的组合物治疗的病症和疾病状态包括,但不限于,肥胖症、糖尿病、II型糖尿病、代谢综合征、胰岛素抵抗综合征、脂质代谢病症,和肝脂肪变性疾病(也称为脂肪肝病)。脂肪肝病的范围可从单独的脂肪肝(脂肪变性)到与炎症相关的脂肪肝(脂肪性肝炎)。

[0202] 高龄产妇年龄(≥ 35 岁)怀有胎儿的现代社会模式具有对卫生保健服务需求的越来越大的影响。除了生殖力降低外,超过35岁的女性处于出生并发症和缺陷的较高风险中(见例如,Noda等, *Biology of Reproduction*, 2012. 86(1): p. 1-8)。在美国进行的一项研究得出结论,高龄产妇年龄是一个最普遍的与死胎有关的风险因素,尽管产科干预率较高,高龄女性具有较高的早产率、剖宫产和低出生体重(LBW) (见例如,Noda等, *Biology of Reproduction*, 2012. 86(1): p. 1-8)。

[0203] 此外,已经存在的产妇医学病症如肥胖症和糖尿病、随着高龄产妇年龄的增加而增加,如同与怀孕有关的产妇并发症如先兆子痫和妊娠糖尿病(见例如,Hoque, M., 高龄产妇和怀孕的后果:一项来自南非的回顾性研究(*Advanced maternal age and outcomes*

of pregnancy: A retrospective study from South Africa). 2012. 肥胖症不仅降低女性的排卵, 它还显著减少排卵规律妇女受孕的机会。产妇肥胖症的小鼠模型也证实纺锤体异常的高发病率以及在卵母细胞线粒体中增加的活性氧(ROS)生成(见例如, Mills等, *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 2011. 21 (4): p. 107-111)。糖尿病母亲的卵母细胞暴露的毒性条件(例如, 增加的ROS)诱导显著线粒体损害(见例如, Shaum, *Maturitas*, 2013)。另外, 糖尿病的小鼠模型已证实粒细胞凋亡增加和卵母细胞成熟受损(见例如, Shaum, *Maturitas*, 2013)。这些和其它动物模型研究强调了卵母细胞功能障碍在肥胖症和糖尿病中的作用。

[0204] 肥胖症、糖尿病和生殖力之间的联系对不断增加的肥胖流行病、糖尿病流行率, 和超过35岁妇女的延迟分娩的趋势具有特定的特殊关注(见例如, Chang等, *Endocrinology*, 2005. 146 (5): p. 2445-53)。

[0205] 最新的数据提示线粒体和点突变的积聚和线粒体DNA (mtDNA) 的缺失对老化过程的中心作用。功能障碍的线粒体和随后的低ATP生产是降低卵母细胞质量的主要因素之一(见例如, Bentov等, *Fertility and Sterility* 2013. 99 (1))。在线粒体复制和扩张过程中, 卵母细胞大幅扩大其线粒体的群体并到目前为止具有任何细胞的最大数量的线粒体和线粒体DNA (mtDNA) 拷贝。

[0206] 卵巢功能不全的妇女的卵母细胞已被报道含有比具有正常卵巢特性的妇女更少的mtDNA拷贝数量。有趣的是, 类似于高龄个体的过早表达表型特征的雌性mtDNA-突变基因小鼠 (POLG, 本文所述的) 遭受生殖力的显著降低并且在20周龄后就不能怀孕了, 尽管接触雄性已经数月(见例如, Yu等, *J Cell Physiol.*, 2010. 3: p. 672-80)。这些和其它研究指明, 生殖衰老并不是一种择优选择卵母细胞的结果, 而是老化过程的影响, 更特别是, 老化对线粒体功能的影响。

[0207] 高水平的活性氧ROS与mtDNA损害强烈相关且约90%的细胞ROS由复合物I和III的线粒体产生。

[0208] 卵泡液中的ROS水平可用于预测体外受精的成功率并怀疑腹腔液中的升高水平的ROS是在一些没有任何其它明显原因的妇女生殖能力不育的罪魁祸首(见例如, Trifunovic等, *Nature*, 2004. 429 (6990): p. 417-423)。此外, 基线总抗氧化能力(TAC)水平在卵母细胞成功受精的卵泡中已显示是较高的(见例如, Gupta等, *Reprod Fertil Dev*, 2011. 23 (5): p. 673-80)。

[0209] 因此, 在一些实施方案中, 本申请提供提高和/或维持生殖力的组合物和方法(例如, 在卵母细胞(例如, 老化的卵母细胞)中)。在一些实施方案中, 将含硒的组合物(例如, 本文所述的含硒化合物)以有效维持或增强生殖力的量给予有此需要的受试者(例如, 希望成为孕妇的受试者)。在一些实施方案中, 本申请还提供含硒的组合物(例如, 本文所述的)在制备用于维持和/或提高生殖力的药物或营养补剂中的用途。在一些实施方案中, 本申请的组合物和方法被用来改进卵母细胞质量、数量, 和/或功能(例如, 提供减少活性氧物质和/或增加总抗氧化能力(例如, 在线粒体内))。

[0210] 因此, 本申请提供可利用本申请的组合物和方法治疗的各种线粒体疾病, 包括显示由细胞的线粒体功能障碍引起的体征或症状的疾病。线粒体疾病的实例包括, 但不限于, 线粒体脑肌病、乳酸性酸中毒和卒中样发作(称为MELAS)、慢性进行性眼外肌麻痹、与破碎

红纤维(ragged-red fibers)有关的肌阵挛性癫痫;Fukuhara综合征、利伯氏病(Leber's disease)、Leigh脑病和帕金森氏病是广泛已知的。

[0211] 在一些实施方案中,本申请提供在受试者中调节骨骼肌代谢或骨骼肌能量稳态,或肝代谢或肝能量稳态的方法。在这样的方法中,将有效量的含硒的组合物(例如,本文所述的)给予有此需要的受试者。在受试者中调节骨骼肌代谢或骨骼肌能量稳态的方法包括给予有此需要的受试者调节线粒体活性(例如,如本文所述)的含硒的组合物(例如,本文所述的)。本申请的组合物和方法也可用来抗衡某些药物对肝和/或肌肉活性(例如,用化疗剂药物治疗期间和/或之后(例如,用于治疗癌症和/或自身免疫性疾病)的影响。本申请的组合物和方法也可用来增强健康受试者的活动能力(例如,身体活动能力)。

[0212] 在一些实施方案中,将含硒的组合物(例如,本文所述的)给予有此需要的受试者,以增加受试者的线粒体功能和/或活性(例如,以治疗(例如,预防性或治疗性)与线粒体功能障碍有关的病症或疾病)。在一些实施方案中,给予本文所述的含硒组合物在受试者中降低线粒体细胞死亡。在一些实施方案中,给予本文所述的含硒组合物在受试者中降低活性氧产生。在一些实施方案中,给予本文所述的含硒组合物降低受试者的缺氧相关体征、症状或病症。在一些实施方案中,给予本文所述的含硒组合物增加受试者的线粒体ATP生产。在一些实施方案中,给予本文所述的含硒组合物在受试者中增加线粒体呼吸。

[0213] 可使用本申请的组合物和方法治疗的心血管疾病包括心肌病或心肌炎;如特发性心肌病、代谢心肌病、酒精性心肌病、药物-诱导性心肌病、缺血性心肌病,和高血压心肌病。使用本文所述的组合物和方法也可治疗或可预防的疾病有大血管的动脉粥样化疾病(大血管疾病)如主动脉、冠状动脉、颈动脉、脑血管动脉、肾动脉、髂动脉、股动脉和腘动脉。可治疗或预防的其它血管疾病包括与视网膜细动脉、肾小动脉、神经滋养血管,心脏细动脉相关的那些,和眼、肾、心,和中枢和外周神经系统的相关毛细血管床。

[0214] 以类似的方式,本申请的组合物和方法可被用来治疗(例如,预防性和/或治疗性)肌肉疾病。肌肉疾病包括,但不限于,肌肉营养失调和肌病。

[0215] 本申请的组合物和方法可被用来治疗胰岛素抵抗疾病(例如,由胰岛素抵抗引起或由胰岛素抵抗促成的任何疾病或病症)。实例包括,但不限于,糖尿病、肥胖症、代谢综合征、胰岛素-抵抗综合征、X综合征、胰岛素抵抗、高血压、过度紧张、高胆固醇血、血脂异常、高脂血症、血脂异常、动脉粥样硬化疾病包括中风、冠状动脉疾病或心肌梗塞、高血糖症、高胰岛素血症和/或血胰岛素原过多、葡萄糖耐量受损、延迟的胰岛素释放、糖尿病并发症,包括冠状动脉心脏病、心绞痛、充血性心力衰竭、中风、痴呆症的认知功能障碍、视网膜病、周围神经病变,肾病、肾小球肾炎、肾小球硬化症、肾病综合征、高血压性肾硬化、妊娠并发症、女性生殖健康不良(如月经不调、不孕不育、排卵不规律、多囊性卵巢综合征(PCOS))、脂质营养失调、胆固醇相关疾病,如胆囊结石,胆囊炎和胆石病、痛风、阻塞性睡眠呼吸暂停和呼吸问题、骨关节炎,和预防和治疗骨丢失,例如骨质疏松症。

[0216] 本申请不受给予受试者的硒的类型的限制。硒源可以是合成的或天然来源,且硒可以是有机或无机的。如本文所述的,并取决于在待治疗的受试者中寻找的靶标,多种形式的硒可以独立地使用或彼此组合使用。在一优选的实施方案中,受试者被给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(例如,SELPLEX)。在一些实施方案中,本申请还提供应用和给予含硒化合物(例如,从富硒酵母获得或衍生的)或衍生物。在一些实施方案中,本申请提

供应用和给予从富硒酵母制备的含硒部分。例如,在一些实施方案中,给予受试者的含硒的组合物包含富硒酵母的水溶性部分。在一些实施方案中,给予受试者的含硒组合物包含富硒酵母的水不溶性部分。

[0217] 在一些实施方案中,给予受试者的含硒的组合物包含单一的液相,所述液相包含富硒酵母的提取物(例如,在酸性条件下可溶的(例如,在第一pH(例如,pH 1.85)提取和/或沉淀的可溶性含硒化合物的部分(例如,可溶的硒代糖蛋白),在第二pH(例如,pH 3.0)沉淀的第二部分,在第三pH(例如,pH 4.0)沉淀的第三部分,和在第四pH(例如,pH 6.0)沉淀的第四部分)。在一些实施方案中,给予受试者的含硒的组合物包含如在2012年6月28日公布的美国专利公布号20120164234A1中所述制备的富硒酵母的提取物,其全文通过引用结合到本文中。

[0218] 在一些实施方案中,本申请提供一种或多种含硒化合物(例如,硒醚、含有SeCys的二-和/或三-肽的缀合物、硒醇和硒亚砜(或其衍生物)、含硒蛋白和/或含硒肽,包含含硒化合物的组合物和使用含硒化合物的方法(例如,用于人和/或动物的如本文所述的用途)(见实施例1)。

[0219] 例如,在一些实施方案中,给予受试者的包含一种或多种以下组分的含硒组合物(例如,在本申请的方法中):2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酸、N-乙酰硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、甲基硫代硒代谷胱甘肽、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、硒代甲基-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、二-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-2,3-DHP硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-N-乙酰硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代半胱氨酰甘氨酸、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、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、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、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-硫代-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-谷胱甘肽、硒代二谷胱甘肽、二-硒代谷胱甘肽、硫代-二硒代谷胱甘肽、甲基脱氢同型半胱氨酸、硒代甲硫氨酸、硒代高羊毛氨酸、N-乙酰硒代胱硫醚、去羟基5'-甲基硒代腺苷、N-乙酰基半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代羊毛硫氨酸、乙基硒代腺苷、N-丙酰硒代胱硫醚、2,3-DHP-硒代胱硫醚、甲基硒代谷胱甘肽、γ-谷氨酰基硒代胱硫醚、硒代谷胱甘肽、硒代(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、N-乙酰半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、烯丙基硒代腺苷基同型半胱氨酸、硒代-腺苷基同型半胱氨酸、硒代-羟基腺苷基同型半胱氨酸、硒代腺苷、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷基-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、腺苷基-羟基硒亚砜,和硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜。在一些实施方案中,本申请提供鉴定存在于富硒酵母中的含硒化合物的方法(例如,在实施例1中描述的方法)。

[0220] 在一些实施方案中,给予受试者的含硒组合物(例如,在本申请的方法中)包含一种或多种蛋白或肽片段,其中存在于蛋白或肽的一个或多个氨基酸残基中的一个或多个硫

分子用硒分子取代。本申请不限于特异性含硒蛋白或肽。在一优选的实施方案中,给予受试者的含硒组合物(例如,在本申请的方法中)包含一个或多个肽片段,其中存在于肽的一种或多种氨基酸残基中的一个或多个硫分子用选自以下的硒分子取代:MVAEAEK、DYMGAAK、YMGAAK、ELQDIANPIMSK、NQAAMNPSNTVFDAK、NFTPEQISSMVLGK、NFTPEQISSMVLGK、MVSEAEK、PEVQGDMK、ELQDIANPIMSK、AMSSR、VQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGK、AAAEGPMK、LTGMAFR、PFVSNDYAAVMVK、AFGIEEGLMTTVHSLTATQK、PFITNDYAAVMFK、PGMVVTFAPAGVTTEVK、VETGVIKPGMVVTFAPAGVTTEVK、AAATAAMTK、SIVPSGASTGVHEALEMR、WMGK、SIVPSGASTGVHEALEMR、AMPQK、AAMAK、HVGDMEIR、VIEEPITSETAMK、VLQALEEIGIVEISPK、LPAASLGDMVMATVK、AGMTTIVR、AGMTTIVR、MLMPK、TMGAK、MNAGR、TYENMK、MGHDQSGTK、GEAIMAPK、Ac-MNVFGK、AMEVVASER、IVMR、MA(I/L)R、AMXAK、DLETLTMHTK、LVMR、VMR、LTGMAFR、SRPNVEVVALNDPFITNDYAAVMFK和VINDAFGIEEGLMTTVHSLTATQK。

[0221]发现用于本申请的各个实施方案的其它形式的含硒化合物被描述于美国专利号6,911,550、6,197,295、5,221,545、6和6,576,233,和美国专利申请号20010043925、20050069594和20050089530中,其全文通过引用结合到本文中。

[0222]在一些实施方案中,组合物(例如,药用组合物)包含2或更多(例如,3或更多、4或更多、5或更多、6或更多、7或更多、8或更多、9或更多、10或更多、15或更多、20或更多、30或更多、40或更多,或50或更多)种不同的含硒化合物(例如,本文所述的那些)。在一些实施方案中,本申请提供包含2或更多(例如,3或更多、4或更多、5或更多、6或更多、7或更多、8或更多、9或更多、10或更多、15或更多、20或更多、30或更多、40或更多,或50或更多)种含硒化合物(例如,分离的、化学合成的,或重组的含硒化合物)的组合的组合物,其特别适合于特定用途(例如,当组合时,其显示所需水平的生物活性(例如,刺激和/或抑制活性))。例如,在一些实施方案中,包含两种或更多种含硒化合物的组合的第一组合物被用来增强肌肉组织中的线粒体活性(例如,ATP生产和/或呼吸),而第二组合物包含两种或更多种不同的含硒化合物的组合(例如,显示不同于第一组合物的生物活性的生物活性),其被用来改变肝组织中的线粒体活性。在一些实施方案中,包含两种或更多种含硒化合物的组合物专门根据个体的特异性遗传特征定制(例如,靶向特定的基因或蛋白)。酵母提取物或部分可以类似的方式经定制用于治疗个体的特定疾病或病症。以这样一种方式,为需要治疗的个体受试者开发定制制剂。

[0223]在一些实施方案中,本申请提供含硒的组合物,其含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式,或存在于其中或从中获得的一种或多种含硒化合物,或者与营养制品在一起的形式(例如,促进例如作为改善健康或总体幸福感的柜台组合物)。

[0224]在进一步的实施方案中,本申请提供药用组合物,其包含一种或多种形式的硒(例如,如上所述),单独或与至少一种其它药物,如抗-糖尿病,脂肪酸(例如,二十碳五烯酸(EPA))等组合,并可在任何灭菌的、生物适配的药用载体中给予,所述载体包括但不限于,盐水、缓冲盐水、葡萄糖和水。

[0225]本发明方法可应用于治疗(例如,预防性地或治疗性地)受试者(例如,糖尿病受试者和/或肥胖症受试者)。含硒的组合物(例如,SEL-PLEX)可以在药学上可接受的载体(如:生理盐水)中经静脉给予受试者(例如患者)。可以使用细胞内递送化合物的标准方法(例如通过脂质体递送)。这些方法是本领域普通技术人员所熟知的。含硒的组合物可用于经静脉

内和胃肠外给药,如静脉内、皮下、肌内和腹膜内。

[0226] 如医学领域所熟知的,用于任一受试者的剂量可能依赖于很多因素,包括患者的体积、体表面积、年龄、待施用的具体药物、性别、给药时间和途径、总体健康状况,以及同时给予的其它药物之间的相互作用。

[0227] 因此,在本申请的一些实施方案中,含硒组合物和/或制剂可以单独地、或与其它形式的硒、药物、小分子联合,或在药物组合物(在该组合物中其与赋形剂或其它药学上可接受的载体混合)中给予受试者。在本发明的一个实施方案中,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,含硒组合物可以单独地给予处于罹患糖尿病和/或肥胖症的风险中的或罹患糖尿病和/或肥胖症的个体受试者。可以将含硒(例如,SEL-PLEX或存在于其中或从中衍生的含硒化合物,单独或与一种或多种其它形式的硒组合的)组合物加入营养饮料或食物(如:ENSURE, POWERBAR等)、复合维生素、营养产品、食品等中以便每日消费。

[0228] 取决于待通过治疗加以改变的靶标,可对这些药物组合物进行配制并经全身或局部给药。有关配制和给药的技术可见于最新版的“Remington's制药科学”(Remington's pharmaceutical Sciences) (Mack Publishing Co, EastonPa.)。举例来说,适宜的途径可包括口服给药或经粘膜给药;以及肠胃外递送,包括肌内、皮下、髓内、鞘内、室内、静脉内、腹膜内或鼻内给药。

[0229] 对于注射,可以将本申请的含硒组合物(例如,药用组合物)配制在水溶液中,优选地配制在生理相容性缓冲液,如Hanks'溶液、Ringers'溶液或生理缓冲盐水中。对于组织或细胞给药,在制剂中使用适于待透过的特定屏障的渗透剂。此类渗透剂一般是本领域已知的。

[0230] 在其它实施方案中,本申请的药用组合物可以使用本领域熟知的药学上可接受的载体按适于口服给药的剂量配制。这样的载体能够将药用组合物配制成片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆剂(slurry)、悬浮液等,以便被所治疗的患者经口或鼻摄取。

[0231] 本发明适用的药用组合物包括其中含有达到期望目的的有效量的活性成分(例如,富硒酵母或含硒化合物)的组合物。例如,在一优选的实施方案中,有效量的药用组合物包含一定量的含有2%或更少无机硒的富硒酵母,或存在于其中或从中衍生的含硒化合物),所述活性成分增加线粒体活性(例如,ATP生产和/或呼吸)。有效量的测定,特别是鉴于本文提供的公开内容,完全在本领域技术人员的能力范围之内。

[0232] 这些药物组合物中除含有活性成分之外还可以含有适宜的药学上可接受的载体,所述载体包括赋形剂和助剂,其有利于将活性化合物加工成可在药学上使用的制剂。配制成用于口服给药的制剂可以是片剂、糖锭剂(dragee)、胶囊剂或溶液的形式。

[0233] 本申请的药用组合物可以根据本身已知的方式(如通过常规混合、溶解、制粒、制糖锭、研磨、乳化、胶囊化、截留或冻干工艺)制备。

[0234] 肠胃外给予的药物制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。此外,还可以将活性化合物的悬浮液制备为例如适宜的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介包括脂肪油,如芝麻油;或合成的脂肪酸酯,如油酸乙酯或甘油三酯,或脂质体。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液的粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,悬浮液也可以含有适宜的稳定剂或可增加化合物的溶解性以允许制备高浓度溶液的药物。

[0235] 口服使用的药物制剂可以通过如下方式获得:将活性成分与固体赋形剂混和,任选地研磨所得混合物,和加工混合物颗粒(如果需要,在加入合适的助剂后),以获得片剂或糖锭核芯。合适的赋形剂是碳水化合物或蛋白质填充剂,如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;来自玉米、小麦、大米、土豆等的淀粉;纤维素,如甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、或羧甲基纤维素钠;树胶,包括阿拉伯胶和黄芪胶;蛋白质,如明胶和胶原。如果需要,可加入崩解剂或增溶剂,如;交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐,如藻酸钠。

[0236] 给糖锭核芯提供适宜的包衣例如,浓缩的糖溶液,其也可以含有阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、紫胶漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以在片或糖锭的包衣材料中添加着色剂或色素,用于产品识别或表征活性化合物的量。

[0237] 可以口服使用的药物制剂包括用明胶制备的推入配合式胶囊(push-fit capsule),以及用明胶和诸如甘油或山梨醇的包衣材料制成的密封的软胶囊。推入配合式胶囊可以含有活性成分与填充剂或粘合剂例如乳糖或淀粉、润滑剂如滑石粉或硬脂酸镁、以及任选地稳定剂的混合物。在软胶囊中,活性成分可以溶解或悬浮在合适的液体,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇(有或无稳定剂)中。

[0238] 本申请的含硒组合物可以单独制备或配制在药学上可接受的载体中,放置于合适的容器中,并加以标签指明所治疗的适应症。对于含有硒的组合物或制剂,标签上指出的病症可以包括与预防性或疗效性治疗糖尿病和/或肥胖症相关的病症以及从刺激线粒体活性(例如,骨骼肌和/或肝线粒体活性)获益的其它疾病或病症的治疗。

[0239] 药物组合物可作为盐的形式提供,并且其可以与许多酸形成盐,所述酸包括但不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐倾向于比相应的游离碱形式更易溶解在水性溶剂或其它质子溶剂中。在其它情况下,优选的制剂可以是在pH 4.5至5.5范围内的1mM-50mM组氨酸、0.1%-2%蔗糖、2%-7%甘露醇中的冻干粉末,该粉末在临用前与缓冲液合并。

[0240] 对于在本申请方法中使用的任何化合物,其治疗有效剂量可以最初通过细胞培养试验来估计。然后,优选地,可以在动物模型(特别是小鼠模型)中调配剂量以获得期望的循环浓度范围。

[0241] 有效量(例如,治疗有效剂量)是指在受试者中改善或预防与糖尿病和/或肥胖症相关的体征、症状和/或病症的量。这样的化合物的毒性和疗效可以通过在细胞培养物或实验动物中实施标准药学方案,例如,以确定 LD_{50} (导致50%的群体死亡的剂量)和 ED_{50} (在50%的群体中产生治疗效果的剂量)确定。毒性和疗效之间的剂量比率是治疗指数,可以表示为比率 LD_{50}/ED_{50} 。呈现大的治疗指数的化合物是优选的。从这些细胞培养物试验和额外的动物研究得到的数据,可用来确定人用剂量范围。这些化合物的剂量优选处于包括 ED_{50} 在内并且几乎无或完全无毒性的循环浓度范围内。根据所用剂型、患者的敏感性和给药途径,剂量可以在此范围内变化。

[0242] 可以由受试者或医师根据待治疗的患者来选择确切的剂量。可以通过调整药物剂量以及给药途径,提供充足水平的活性部分或维持期望效果(例如,改变受试者的基因表达)。可以考虑的其它因素包括疾病状况的严重程度;患者年龄、体重、性别;食物、给药时间和频率、药物的联合、反应敏感性和对治疗的耐受性/反应性。长效药物组合物可以根据具

体制剂的半衰期和清除速率,每3-4 天、每周或每两周给药一次。因此,本申请不受受试者给予本申请的组合物的时间长度的限制。在一些实施方案中,受试者被给予/接受本申请的组合物介于3-12月之间(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11或12月)。然而,本申请不限于这种时帧。在一些实施方案中,受试者被给予/接受本申请的组合物少于3月(例如,1或2月)或超过12月(例如,15、18、21,或24月、2.5年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或更多)。

[0243] 在一些实施方案中,本申请的含硒的组合物(例如,有机硒(例如,富硒酵母(例如,SEL-PLEX)或存在于其中或从中衍生的含硒化合物))以日剂量给予,以提供给受试者25和800 μg 之间的硒/日(例如,SEL-PLEX以这样一种方式给予受试者,以提供给受试者25和800 μg 之间的硒/日)。然而,本申请并不受这样的限制。确实,在一些实施方案中,本申请的含硒组合物以日剂量给予,以提供给受试者少于25(例如,24、23、22、21、20,或更少)或大于800(例如,825、850、900、950、1000、1050、1100,或更多) μg 之间的硒/日。在优选的实施方案中,硒(例如,有机硒(例如,富硒酵母(例如,SEL-PLEX)))以介于200和500 μg /日之间的日剂量给予。在其它优选的实施方案中,硒以介于200和400 μg /日之间的日剂量给予。在一些实施方案中,单一剂量的硒(例如,有机硒(例如,富硒酵母(例如,SEL-PLEX)))每日一次给予。在其它实施方案中,每日给予2、3、4,或更多剂量(例如,早晨一次和晚上一次,或每4-6小时一次)。例如,在一些实施方案中,硒以3个分开的、超过3个分开的、2个分开的,或少于2个分开的剂量给予受试者。在一些优选的实施方案中,日剂量以定时释放胶囊给予。在一些实施方案中,日剂量为25-75 mg之间的硒。在其它实施方案中,日剂量是200 mg的硒(例如,有机硒(例如,富硒酵母(例如,SEL-PLEX)))。在一些实施方案中,剂量被配制为给予特殊年龄的受试者(例如,小于50,大于50,小于70,大于70,小于80,大于80岁等)。

[0244] 取决于是否期望局部或全身治疗以及待治疗的区域,本申请的药用组合物可以以多种方式给予。给药可以是局部的(包括眼的和经粘膜包括阴道和直肠递送)、肺的(例如,通过吸入或吹入粉剂或气雾剂,包括利用雾化器;气管内、鼻内、表皮的和透皮的),口服的或胃肠外的。胃肠外给药包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;或者颅内,如鞘内或室内给药。含硒的组合物和制剂被认为尤其可以用于口服给药。

[0245] 局部给药的药用组合物和制剂可以包括透皮贴剂、凝胶剂、软膏剂、洗剂、霜剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。可以使用常规药物载体,水性的、粉末的或油性的基质、增稠剂等。

[0246] 口服给药的组合物和制剂包括散剂或颗粒剂,在水或非水性介质中的悬浮液或溶液,胶囊,袋剂(sachet)或片剂。增稠剂、矫味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可能是期望的。

[0247] 用于胃肠外、鞘内或室内给药的药用组合物和制剂可以包括无菌水溶液,其中也可以包含缓冲液,稀释剂和其它适宜的添加剂,例如但不限于,渗透增强剂、载体化合物和其它药学上可接受的载体或赋形剂。

[0248] 因此,在一些实施方案中,本申请的药用组合物包括,但不局限于,溶液、乳液和含脂质体的制剂。这些组合物可以从包括,但不限于,预制液体、自乳化固体和自乳化半固体的各种组分产生。

[0249] 可方便地以单位剂量形式呈现的本申请的药物制剂,可以依照制药工业中熟知的常规技术制备。这些技术包括将活性成分和药物载体或赋形剂混合在一起的步骤。通常地,

通过使活性成分与液体载体或细分散的固体载体或二者均一地和紧密地混和,然后,如果必要,使产品成形,来制备所述制剂。

[0250] 因而,在一些实施方案中,本申请的组合物可以配制成许多可能剂型中的任一种,例如,但不限于,片剂、胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本申请的组合物也可以在水的、非水的或混合的介质中配制成悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含增加悬浮液粘度的物质,包括例如:羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。该悬浮液还可以包含稳定剂。

[0251] 在本申请的一个实施方案中,可以配制药用组合物并作为泡沫剂使用。药物泡沫剂包括例如,但不限于乳剂、微乳、霜剂、凝胶剂和脂质体。尽管这些制剂在本质上基本上相似,但是在终产物的成分和稠度(consistency)上是不同的。

[0252] 本申请的组合物还可以包含在药物组合物中常规可见的其它辅助成分。因此,例如,组合物可以含有附加的、相容的、具有药物活性的物质,如,止痒剂(antipruritics)、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或可以包含在物理配制本申请的组合物的各种剂型时可以使用的其它材料,如着色剂、矫味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂(opacifier)、增稠剂和稳定剂。然而,这些物质,当加入时,不应不适当干扰本申请的组合物的成分的生物活性。这些制剂可以进行消毒,并且如果期望,可以与不有害地和制剂中的核酸相互作用的辅助剂混合,所述辅助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂、矫味剂和/或芳香物质等。

[0253] 在一些实施方案中,本申请提供药物组合物,其包含(a)一种或多种形式的硒(例如,SEL-PLEX和/或存在于其中和/或从中衍生的含硒化合物)和(b)一种或多种其它药物(例如,抗-糖尿病、抗-氧化剂等)。在一些实施方案中,两种或两种以上的联合药物可以一起或相继地使用。

[0254] 本申请也包括涉及共同给予本文所述的含硒组合物和一种或多种其它活性剂(例如,抗-糖尿病、抗-氧化剂等)的方法。事实上,提供通过联合给予本申请的含硒组合物来增强现有技术疗法和/或药用组合物的方法,是本申请的另一方面。在联合给药方案中,药物可以同时或先后给予。在一个实施方案中,本文描述的化合物先于其它活性剂给予。药物制剂和给药模式可以是以上所说的任何一种。另外,两种或两种以上的联合给予药物可以各自通过使用不同的模式或不同的制剂来给予。

[0255] 药物或待联合给予的药物取决于所治疗的病症的类型。例如,当所治疗的病症是肥胖症时,所述额外药物可以是抗-肥胖症药物或减肥药等。当所治疗的病症是预防或治疗糖尿病时,所述额外药物可以是本领域已知的任何一种抗-糖尿病药物。待联合给予的额外药物可以是本领域众所周知的任何药物,包括,但不限于,目前在临床中使用的那些药物。

[0256] 在本申请的一些实施方案中,抗氧化剂与本申请的含硒组合物或制剂共同给予。本申请不受所用抗氧化剂类型的限制。确实,期望可用于本申请的各种抗氧化剂包括,但不限于,烷基化二苯基胺、N-烷基化苯二胺、苯基- α -萘基胺、烷基化苯基- α -萘基胺、二甲基喹啉、三甲基二氢喹啉、受阻酚(hindered phenolics)、烷基化氢醌、羟基化硫代二苯醚、亚烷基双酚、硫代丙酸酯/盐、二硫代氨基甲酸金属盐、1,3,4-二巯基噻二唑、油溶性铜化合物、NAUGALUBE 438、NAUGALUBE 438L、NAUGALUBE 640、NAUGALUBE 635、NAUGALUBE 680、NAUGALUBE AMS、NAUGALUBE APAN、Naugard PANA、NAUGALUBE TMQ、NAUGALUBE 531、NAUGALUBE 431、NAUGALUBE BHT、NAUGALUBE 403、NAUGALUBE 420、抗坏血酸、生育酚类、 α -

生育酚、巯基化合物、焦亚硫酸钠、N-乙酰基-半胱氨酸)、硫辛酸、二氢硫辛酸、乳铁蛋白、抗坏血酸、棕榈酸抗坏血酸酯、抗坏血酸多肽、丁羟甲苯、类维生素A、视黄醇、棕榈酸视黄酯、生育三烯酚、泛醌、类黄酮、异黄酮、染料木黄酮、大豆昔元(diadzein)、白藜芦醇、葡萄籽、绿茶、松树皮、蜂胶、IRGANOX、抗原P、SUMILIZER GA-80、 β -胡萝卜素、番茄红素、维生素C、维生素E, 和维生素A。

[0257] 实验

提供以下实施例是为了阐明和进一步举例说明本申请的优选实施方案和方面,而不应理解为限制本发明的范围。

[0258] 实施例1

富硒酵母中含硒化合物的鉴定和表征

硒(Se)是人和动物食物的必需元素。在许多国家,低水平的Se已产生含硒食物补剂和饲料中增加的益处(见例如, Rayman, Br. J. Nutr., 92 (2004), p. 557)。在富硒(Se)介质中生长的酵母可用作人和动物补充的有机Se源。补充的Se的最常见形式是在硒酸盐和/或亚硒酸盐的存在下生长的酵母,其能够积聚至高达3000 mg Se/kg。富Se酵母,自1974年上市而可获得以来,由于其相对低的成本和高含量的用作硒代蛋白合成前体的硒代甲硫氨酸(SeMet)而具有吸引力。富Se酵母是长期以来一直难以表征硒形态的天然产物。许多问题至今仍未能回答,包括对SeMet浓度报告的值的可变性;关于Se物质组成的高可变性;以及鉴定的Se化合物的总和和总Se浓度之间的差距。

[0259] 欧盟对其所作的不充分的表征将Se酵母从指令2002/46/EC的允许的食物补充剂中排除。

[0260] 因此,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以表征富硒酵母的Se代谢物组和蛋白质组。因此,如本文所述的,本申请提供含Se代谢物和蛋白的鉴定和表征,而迄今为止其鉴定和表征(例如,生物学活性)仍是未知的。

[0261] 总Se测定和同位素组成

商业酵母样品通常含有1000 ppm或2000 ppm的Se,其最大值超过3000 ppm。据认为富Se酵母在外观、风味和气味方面与正常的干燥食物酵母无法区别(见例如, Schrauzer, Pure Appl. Chem., 78 (2006), p. 105),但是不同的制剂的形态可以是不同的。劣质富Se酵母样品在色彩上呈略带红色或略带黄色的,因为形成了Se⁰和硒化物。

[0262] 富Se酵母的总Se量的测定可直接进行。例如,酵母用HNO₃和H₂O₂的混合物在热板上或使用微波加热来消化。Se含量可随后通过氯化物-生成(HG)原子吸收波谱(AAS)或原子荧光光谱(AFS)测定。然而,完全的消化(未溶解的碳)是必要的,否则获得低的和/或不一致的结果。在一些实施方案中,电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)被用来表征含硒化合物(例如,其对溶解碳是更耐受的)。然而,当使用ICP-MS时,所用同位素被最佳化(例如,由于最丰富的⁸⁰Se同位素不适合用旧的四极杆设备工作,其不能用四极表征)。在一优选的实施方案中,配备有碰撞室(使用氢气作为碰撞气体)的仪器被用来激发对⁷⁷Se和⁷⁸Se的《M+1》干扰的创立。在一个更优选的实施方案中,使用He作为碰撞气体。CRM SELM-1的使用可被用于质量控制/保证。

[0263] 富Se酵母常常用作预混物(3-5 ppm Se)和饲料(0.3-0. ppm Se)的活性成分。然而,在市场中预混物样品的严重非匀质性是常见的,这使得样品完全消化,或批生产之间的

一致性,是很难而不可能的。例如,常见的是,在热板用HNO₃-H₂O₂混合物浸出后的固体残留物不含有Se。因此,在一些实施方案中,使用ICP-MS分析(例如,当预混物样品的完全消化不可能或不一致时)。另外,由HG-ICP-多个采集器-MS (HG-MC-ICP-MS) 精确测定的Se同位素组成已揭示,来自不同的生产商的富Se酵母中同位素比率($\delta^{82}/^{77}\text{Se}$, $\delta^{82}/^{76}\text{Se}$ 和 $\delta^{82}/^{74}\text{Se}$)的显著变化(见例如,Far et al., J Anal At Spectrom, 25 (2010) 1695)。关于同位素比率变化来源(在不同的生物技术的生物化学结合期间不同来源的Se或不同的同位素分馏)的知识和理解仍然是令人困惑的。

[0264] SeMet的测定

无论是否准确描述,总SeMet浓度常规被称为富Se酵母的“有机”特征的指标。SeMet是蛋白的要素,其中大部分是不溶于水的。因此,SeM含量已通过其从蛋白的释放来测定。因此,在一些实施方案中,本申请提供导致酵母蛋白完全分解为氨基酸的SeMet的特征鉴定的方法。在一些实施方案中,本申请提供鉴定预防SeMet的降解(例如,导致Se损失或氧化)的SeMet的方法。

[0265] 本领域的许多结果已经提及存在于水提取物中的SeMet并对富Se酵母中的有关SeMet水平的混乱负主要责任。混乱也被这样的事实夸大了,即用于氨基酸分析的标准酸(canonical acid)消化法的条件(在密闭的安瓿中于120C用6 N HCl消化)太过苛刻以致不能以控制的方式保存SeMet。两个程序可用来收获SeMet:一个程序是基于在回流下用甲磺酸的16-h消化,而另一个程序是基于用蛋白酶的多种蛋白水解消化(见例如,Mester等, Anal Bioanal Chem, 385 (2006) p 168)。因此,在一些实施方案中,本申请提供关于SeMet含量的测定,Se的保留时间和存在是证实存在于样品中的Se-Met的鉴别和纯度所需的参数。在一些实施方案中,反相(RP)或阴离子-交换(AE) HPLC-ICP-MS色谱法分析被用来表征样品中的硒物质。

[0266] 样品消化

在开发本申请的实施方案期间进行的实验已显示,市场上存在的商业酵母产品在形态学和质地方面不同并可给出比期望低得多的SeMet收获(例如,基于参照材料分析)。此外,在开发本申请的实施方案期间进行的实验已经揭示存在蛋白酶-批量可变性(例如,由此导致提取产率的差的再现性)。因此,在一些实施方案中,本申请提供使低回收风险最小化的步骤和方法。例如,在一些实施方案中,仅使用新鲜制备的和高活性蛋白酶。在另外的实施方案中,提取进行多次(例如,3次),各次使用新鲜部分的酶。在一优选的实施方案中,最终的提取/提取物含有少于1%的Se。在进一步的实施方案中,通过酶解获得样品的完全溶解。在一些实施方案中,如果经酶解完全溶解样品是不可能的,采用使用纤维素酶和半纤维素酶和离液剂(chaotropic agents)的混合物的顺序提取并验证各个提取物中SeMet的缺乏。本申请不受验证提取物中SeMet的缺乏的方法的限制(见例如,Encinar等, Anal Chem Acta, 500 (2003), 171)。提取质量平衡方法和数据可用来补充分析结果。根据本申请的一个方面的样品增溶的一个实例示于图1中。

[0267] 在开发本申请的实施方案期间进行的实验从一系列可市售获得的酵母鉴定和表征未消化的蛋白水解残基并进一步揭示在用纤维素酶-果胶酶混合物另外处理后残留的SeMet的存在。对于一些样品,残留的SeMet占总Se的最多10%,虽然通常的值是约3-5%。用十二烷基磺酸钠(SDS)处理残留物,接着蛋白水解消化,使得SeMet产率进一步增加通常2-8%,

而一种样品高达15%。残留物的存在(例如,Se⁰可用CS₂提取)是劣质酵母的指示。

[0268] HPLC-ICP-MS分析

在开发本申请的实施方案期间进行的实验鉴定和表征在酶解后获得的存在于溶液中的含硒化合物(例如,如含有SeMet但也氧化的SeMet,不同形式的SeCys,不同的Se代谢物,和不完全消化的蛋白)。已确定不完全消化的蛋白的存在导致总SeMet浓度的低估。不完全消化的蛋白被认定为以一种精细的淤浆存在(例如,由此保留在柱滤器上)或在溶液中。因此,在一些实施方案中,利用涉及通过尺寸-排阻LC-ICP-MS分析消化的验证步骤(例如,以验证高分子量化合物的缺乏和Se的完全洗脱(见例如,图2,插图))。

[0269] 可通过AE-HPLC-ICP-MS(见图2)或RP-HPLC-ICP-MS,使用标准增加的方法,可定量SeMet。色谱静止相的选择是重要的(例如,为使含Se物质的柱吸附的损失最小化)。然而,硒化合物的鉴定、定量和分析(如硒蛋白、硒氨基酸、硒肽等)可伴有质量平衡、排除或在用于定量的峰前后考虑其洗脱。这使得含硒化合物(如SeMet)的鉴定和定量成为一个复杂任务。同位素-稀释定量不能视为正确地表征样品(例如,因为不完全消化和不完全消化的含SeMe物质的保留是不准确结果的主要原因),因为加入的尖峰不太可能以与样品中SeMet的相同方式表现。

[0270] 另一个错误的常见来源是由于氧化的SeMet的发生。部分SeMet似乎作为分离的SeMetOx峰,导致SeMet浓度的低估。在该程序中SeMet的氧化可通过加入氧化还原剂(例如,二硫苏糖醇)而得到防止甚或逆转,但是原先存在的SeMet氧化物不能转化为SeMet。

[0271] 在开发本申请的实施方案期间进行的实验表明,用三重-四极杆MS替换ICP-MS用于(单或多)反应-监测模式很可能以平行模式提供一种可供选择的、增加其它SeMet形式(例如,ox-SeMet)的定量的选择性和可靠性。

[0272] 测定预混物和饲料中的SeMet

测定预混物、动物饲料和补充片剂中的SeMet比在富Se酵母中测定更难。SeMet的释放受一些可用作蛋白酶抑制剂的添加剂存在的妨碍。推荐一种提取步骤以在酶法提取SeMet之前除去这些添加剂。在一些实施方案中,动物饲料中的SeMet浓度太低,以致不能在提取物中直接测定而需要预浓缩。酶法消化的冷冻干燥导致残留的酶,以及由此的基质的共同预浓缩,所述基质干扰随后的RP-HPLC或AE-HPLC。因此,本申请提供在冷冻-干燥和HPLC-ICP-MS之前,通过尺寸排阻色谱法(SEC)分离低分子Se部分。

[0273] 分析水溶性含Se化合物和代谢物

在开发本申请的实施方案期间进行的实验表明,富Se酵母可由Se-代谢曲线图(硒代代谢物组)表征,其是酵母株和发酵参数的特征。硒代代谢物组可用作市场上可获得的制剂和生产过程的再现性的来源的指纹。如本文所述,在开发本申请的实施方案期间进行的实验提供硒代代谢物组,其含有一种或多种含Se化合物(例如,其显示治疗活性和/或抗-治疗特性(例如,毒性))。根据本申请的用于获得和鉴定存在于富硒酵母中的含Se化合物水溶性和非水溶性部分的一个实施方案的示例性程序显示于图3中。

[0274] 已确定用水提取允许收获15-25%的Se。用SEC-ICP-MS获得的典型的色谱图(100%收获)示于图4A中。水提取物含有~5%水溶性蛋白,所述蛋白或者在SuperdexPeptide柱的空隙中高分子量洗脱,或者为低分子量(5-15 kDa),包括多个富硒(1-7) SIP18,单个富硒HSP12或YMT蛋白。这些蛋白含有作为SeMet单独存在的Se。

[0275] 因此,本申请还提供构成酵母的硒代代谢物组的、以低分子量(<1500 Da)化合物/代谢物的形式存在的剩余水溶性Se。在开发本申请的实施方案期间进行的实验之前,这些代谢物的鉴定和表征已成为一个极具挑战性的任务(例如,自从由Casiot et al.使用电喷雾三重-四极MS首次正式的“重新”鉴定Se-腺苷基-Se-同型半胱氨酸以来,这些代谢物一般来说仍是未知的(见例如,Casiot et al, Anal Commun, 36 (1999), p 77))。例如,根据Se的种类形成的水提取物的复杂性被表征和举例说明于图4b中。如所显示的,观测到超过25不同的峰,而每一个峰潜在地隐藏任何数目的其它不太强烈的峰(例如,每一个峰代表一种或多种不同的含Se化合物)。

[0276] 在开发本申请的实施方案期间进行的实验已经在多维纯化技术和MS的进展中采取某些领先的优点,这些优点依次允许对酵母中硒代代谢物组的认识方面有大的增加(见图4)。特别是,提供较大的扫描内(intrascan)动态范围的FT轨道离子-阱设备的可利用性,和精确质量测定和多级碎片段化的可能性,已被用来促进Se代谢物组的鉴定和表征(例如,各个含硒化合物(例如,代谢物、肽、蛋白、核酸,和/或各自的前体)的鉴定以及各个化合物以及所述化合物的组合(例如,如本文所述)的生物特性的表征)。

[0277] 获得和表征富硒酵母(富Se酵母,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))。使用从Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, 法国)获得的LCMS级化学品。使用Milli-Q系统(MILLIPORE, Guyancourt, 法国)纯化水。在一个示例性程序中,富Se酵母中的总硒浓度是2399 mg/g (+/-40)。用5 ml水在超声波浴中提取0.2-g样品1 h。以4000 rpm离心提取物15 min。冷冻干燥上清液并且在必要时于-20°C贮存。水提取物中的总硒浓度是756 µg,其占总硒的约30%。平行进行的富硒酵母的另外的提取也产生具有浓度范围介于约170-750 µg之间(对应于约5-30%总硒)的水提取物。

[0278] 其次,使用水提取物进行尺寸排阻-ICP MS。尺寸排阻色谱法-ICP-MS使用连接于AGILENT 7500ce ICP质量分光计(配备有Scott喷雾室和碰撞室)的AGILENT 1200 HPLC系统(AGILENT, Tokyo, 日本)实现。液相色谱法用Ultimate 3000 UPLC泵(DIONEX, Paris, 法国)进行。柱的出口与具有ESI离子源的LTQ30 Orbitrap Velos质谱仪(Thermo-Fisher Scientific, Bremen, 德国)和与配备有Scott喷雾室和碰撞室的AGILENT 7700 ICP-MS连接。

[0279] 5份分离的水提取物的尺寸排阻-ICP MS色谱图显示于图5中(76Se-深灰色线,77Se-黑线,78Se浅灰色线)。富Se酵母提取物的色谱图(图5,底部小图)显示使用SELPLEX (ALLTECH, Inc., Lexington, KY)获得的典型的图案。此外,出现了先前研究未知的相对强烈的推迟洗脱(在约66 min)峰。剩余样品的曲线图(图1,上方小图)显著不同于Sel-Plex的曲线图但彼此类似。它们由一个非常丰富的宽峰主导,显然含有许多种类的在色谱法中早期洗脱的物质。由于这一观察结果,选择几种样品(图5,从上数第二小图,和底部小图)以供使用具有更合适的分离范围的尺寸-排阻柱(SUPERDEX肽柱)进一步鉴定(图6,分别为A和B)。先前色谱图中出现的宽峰(图5,从上数第二小图)分裂成两个峰,其各自具有2-3个肩峰,显示存在非常丰富的分子量在5-1.5kDa范围内的硒代化合物。已进一步鉴定,图5底部小图所示的样品也具有在约25 min处的推迟洗脱峰。

[0280] 鉴定和表征来自水溶性部分的含硒化合物

上述一系列实验鉴定在处理的样品中存在大部分的含硒化合物(约1.5-5 kDa),

其在原始酵母中是缺乏的。因此,在开发本申请的实施方案期间进行实验,以表征这一部分。

[0281] 从尺寸-排阻色谱法(SEC)分离相关部分(任意地称为“峰I”) (见图7A)并经冷冻-干燥预浓缩。如在图7B中所示,这允许收获不含存在于未处理的酵母中的其它Se-化合物的完整的相关部分。样品的SEC肽色谱图:a) 水提取物,b) 分离峰I,c) 用胰蛋白酶消化的峰I,d) 用蛋白酶消化的水提取物;黑线- 80Se,浅灰色线78Se,深灰色线- 77Se示于图7中。

[0282] 几种通过反相HPLC分馏出其它相关部分的尝试已失败。从试验的RP-HPLC柱的回收率是非常低的且分离差。因此,努力试图使这种部分的蛋白水解酶消化(胰蛋白酶和蛋白酶XIV),以进一步表征所述部分并鉴定其中含有的成分。如在图7C中所示的,胰蛋白酶(在精氨酸和赖氨酸残基上裂解)减少混合物中的Se-化合物的平均分子量。因此,如本文所述的,在一些实施方案中,本申请提供,在含硒化合物用反相HPLC-ICP MS和/或Orbitrap MS分离和/或鉴定之前,经蛋白水解消化(例如,用胰蛋白酶、蛋白酶XIV,或其它酶)富Se1酵母的一种或多种水溶性部分。

[0283] 例如,如在图7D中所示,肽的蛋白酶消化主要给出硒代甲硫氨酸(图7 D,高黑线约27分钟)。也存在在约25分钟前洗脱的其它含硒化合物。

[0284] 额外的实验在开发本申请的实施方案期间进行,以分离、纯化和表征在58 min从图7A中所示的SEC柱的洗脱峰。为鉴定在58min洗脱时间的尺寸排阻色谱仪中存在的化合物-见图7A,分离和浓缩峰。优化用于反相色谱法的洗脱方法。在58 min从SEC柱的洗脱峰的示于图7A (也示于图8A)的RP色谱图显示仅仅一个尖锐和很好分辨的峰(见图8B)。其次,进行包括质谱在内的进一步的分析,以鉴定硒代化合物。将反相色谱法与Orbitrap偶联。质量346.04025的硒代化合物被鉴定为Se-甲基-Se-腺苷(见图9)。

[0285] 实验在开发本申请的实施方案期间进行,以进一步鉴定和表征在从富硒酵母分离的水溶性部分中的含硒化合物。

[0286] 使用来自上述富Se酵母的水提取物(含有756 g,占约30%的总硒),其含有约70%的水溶性含硒化合物。浓缩提取物并注入尺寸排阻色谱仪(SEC)柱中并在均匀的时间间隔收集10个亚-部分(从示于图2A中的第一宽峰开始)。此外,这些部分表示不存在于未处理的酵母水性提取物中的种类。将各个部分分为两个分开的样品,一个样品被用来部分修饰(dramatization)和另一个样品用胰蛋白酶消化处理。

[0287] 样品首先用ICP MS (见图10),使用RP C18柱分析。该分辨率足以用于UPLC-Orbitrap MS分析。

[0288] 分析样品和对含硒形态的亚-部分8获得的170个化合物的列表在下表1给出。此外,表5提供这些化合物的示例性光谱。在未消化部分中鉴定的所有肽的质量均在介于1和3.4 kDa之间的范围内。鉴定的含硒化合物比它们从中衍生的原始蛋白要小得多。图11提供样品的亚部分8中鉴定的含硒肽的列表。因此,在一些实施方案中,本申请提供一种或多种含硒化合物(例如,在下述表2、图11、图13和图15中鉴定的),包含相同化合物的组合物和使用相同化合物的方法(例如,如本文所述的用于人和/或动物的应用)。

N°	质量
1	504.22677
2	517.59942

3 519.20538
4 528.90197
5 531.75903
6 532.67706
7 539.25262
8 539.33910
9 540.67584
10 541.24383
11 541.26294
12 541.74151
13 542.24139
14 542.24725
15 552.71209
16 553.25964
17 562.28595
18 563.78735
19 566.25152
20 566.91772
21 567.24585
22 567.76349
23 568.64807
24 571.90582
25 573.77539
26 581.73694
27 589.32348
28 601.79260
29 601.95440
30 604.25134
31 604.41015
32 608.38354
33 614.28143
34 614.78192
35 619.25683
36 622.77655
37 623.27374
38 627.17450
39 628.17425
40 631.36401
41 632.69647

42 638.27905
43 640.34161
44 648.30755
45 648.58545
46 650.31329
47 651.35296
48 677.32788
49 683.32922
50 684.33172
51 695.28955
52 698.28625
53 702.70654
54 702.98858
55 704.29077
56 707.36828
57 709.31628
58 710.30029
59 712.28479
60 714.33471
61 714.83740
62 718.80896
63 720.81946
64 721.67334
65 722.00866
66 724.69372
67 724.83240
68 726.81750
69 727.31964
70 728.32373
71 729.84302
72 734.82367
73 741.04901
74 741.05059
75 741.38433
76 741.85113
77 745.81677
78 747.29687
79 748.37677
80 750.67205

81 751.87048
82 752.39074
83 764.31012
84 775.89483
85 776.39734
86 780.83679
87 781.35034
88 785.24920
89 789.43182
90 792.33807
91 794.72375
92 796.31152
93 803.32995
94 803.80926
95 804.80969
96 814.71167
97 814.79699
98 815.04895
99 815.80066
100 821.72363
101 821.87463
102 822.37549
103 828.33893
104 833.06408
105 833.06604
106 833.39843
107 833.40020
108 833.72723
109 833.72827
110 835.41009
111 839.04785
112 839.38415
113 839.82940
114 844.36627
115 844.40557
116 849.87439
117 850.19653
118 854.69995
119 855.03100

120 861.87719
121 862.36950
122 863.74206
123 863.74316
124 863.87079
125 864.07483
126 871.40753
127 872.73132
128 878.90771
129 881.38879
130 881.88763
131 886.74395
132 891.72467
133 895.74530
134 896.07586
135 908.87964
136 909.37103
137 924.37268
138 925.08465
139 925.41833
140 929.44366
141 929.74249
142 931.39825
143 932.34991
144 955.42822
145 960.50860
146 966.89325
147 975.96557
148 990.36322
149 990.41070
150 998.92859
151 1003.74280
152 1016.45190
153 1021.41125
154 1022.39312
155 1037.80859
156 1038.13623
157 1043.39104
158 1057.86181

159	1076.48632
160	1102.13940
161	1123.56475
162	1133.01947
163	1134.47436
164	1217.36182
165	1221.56891
166	1249.09771
167	1249.59564
168	1427.01928
169	1486.43866
170	1489.46460

[0289] 表2. 在亚部分8中发现的含硒化合物的质量列表。

[0290] 还进行实验以进一步表征亚-部分。特别是,进行亚-部分的酶(例如,胰蛋白酶)消化,随后利用反相色谱法和质谱(例如,HPLC-ICP MS)分析(图12)。UPLC-Orbitrap MS/MS分析揭示存在许多含硒肽。确定含硒肽以及从中衍生各个含硒肽的蛋白的特性并示于图13中。

[0291] 富硒酵母的水溶性部分中的含硒化合物和/或代谢物的进一步的分析

中等分子大小(约300-1000 Da)的水溶性有机硒化合物被进一步有针对性的鉴定和表征。独特的硒代代谢物组在理论上构成来自不同来源的酵母的指纹谱(例如,提供关于构成商业产品的组成的信息)。

[0292] 水提取后接着分馏。0.2 g酵母(SEL-PLEX,含有2%或更少无机硒的富硒酵母, ALLTECH, Inc., Lexington KY)用5 mL水,使用超声波浴提取1小时。离心(2700 g, 10 min)提取物,轻轻倒出,冻干并在冷冻机中贮存。然后使粉末溶于0.15 mL的10 mM乙酸铵缓冲液(pH 7.5)中并离心(14000 g, 15 min)。在SUPERDEX肽柱(尺寸排阻色谱法, SEC)上分馏上清液;用100 mM乙酸铵(pH 7.5),以0.7 mL min⁻¹的速率进行洗脱。收集20和30 min之间的洗脱液,冷冻并干燥。使冻干物溶于0.15 mL水并在进一步分析前于-20°C贮存。

[0293] HPLC-ICP MS分析

将先前溶于水的来自SEC的冻干样品在缓冲液A中稀释20倍并将10 μL的等分试样注入阳离子-交换PRP-X200 SCX柱(150 mm x 2.1 mm x10 μm;Hamilton, Reno, NV)中。梯度洗脱用甲酸铵(缓冲液A:1 mM铵和10 mM甲酸在20%甲醇中(pH 3),缓冲液B:100 mM铵和110 mM甲酸在20%甲醇(pH 6)中,以0.5 mL min⁻¹传递)进行。洗脱液在过柱后以一种方式分流,即其一部分(30%)被进料给ESI-MS,而其余的(70%)进入废物流。程序是:0-8 min最多3% B,8-15 3% B,15-20最多至10% B,20-25最多100% B,25-38 100% B,38-40最多100% A,40-52 100% A 4.1.3。

[0294] HPLC - ESI MS/MS鉴定。纯化的含Se部分的阳离子-交换HPLC-ESI MS在线分析用PRP-X200 SCX柱进行。以如同用于ICP MS分析的相同方式进行梯度洗脱。使用先前未经稀释的5 μL的样品,用于分析。离子源以阳离子模式操作。最佳的设置是:离子源电压, 2.60 kV;毛细管温度, 280°C;源加热器温度, 120°C;鞘气流量, 20;辅助气流量, 5;S-lens RF

水平, 61%; 分辨率, 100000。质谱在100-1000 m/z范围内获得, 并用Xcalibur 2.1软件(Thermo Scientific)处理。用咖啡因、正-丁胺、Met-Arg-Phe-Ala (MRFA), Ultramark 1621和十二烷基磺酸钠(SDS)溶于50%乙腈和0.1%甲酸溶液中的混合物对仪器进行质量校准。

[0295] 根据与所用的ICP MS和ESI MS检测器系统二者的兼容性对色谱条件最优化。含硒化合物的阳离子-交换HPLC-ICP MS曲线图揭示大量的峰存在(见图14A)。还进行实验以生成分离的部分的反相ICP-MS色谱图(见图14B)。

[0296] 随后, 相同的柱与Orbitrap连接并鉴定和表征含硒化合物/代谢物(见图14)。

[0297] 采用额外的样品制备步骤, 以区分和鉴定存在于富硒酵母中的硒物质。例如, 在ICP-MS之前, 尺寸排阻色谱法(例如, 利用SUPERDEX柱), 使用尺寸排阻ICP MS收集的各部分(见例如, 可收集包含示于图7A或8A的各个峰的部分并分析)。根据本文所述的程序(例如, 双峰反相/亲水离子相互作用液相色谱法-电喷雾混合四极阱/轨道阱质谱等)进行各部分的分析。使用以上方法在富硒酵母(SELPLEX)中鉴定其它含硒化合物, 包括: 2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酸、N-乙酰硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、甲基硫代硒代谷胱甘肽、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-半胱氨酰甘氨酸、硒代甲基-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-γ-谷氨酰基半胱氨酸、二-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸-硒代谷胱甘肽、硒代谷胱甘肽-硒代半胱氨酸、2,3-DHP-硒代半胱氨酸-2,3-DHP硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-N-乙酰硒代同型半胱氨酸、谷胱甘肽-硒代半胱氨酰甘氨酸、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、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、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、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-2,3-DHP-硒代同型半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-硒代谷胱甘肽-硫代-2,3-DHP-硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-γ-谷氨酰基硒代半胱氨酸、硒代谷胱甘肽-谷胱甘肽、硒代二谷胱甘肽、二-硒代谷胱甘肽、硫代-二硒代谷胱甘肽、甲基脱氢同型半胱氨酸、硒代甲硫氨酸、硒代高羊毛氨酸、N-乙酰硒代胱硫醚、去羟基5'-甲基硒代腺苷、N-乙酰基半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、2,3-DHP-硒代羊毛硫氨酸、乙基硒代腺苷、N-丙酰硒代胱硫醚、2,3-DHP-硒代胱硫醚、甲基硒代谷胱甘肽、γ-谷氨酰基硒代胱硫醚、硒代谷胱甘肽、硒代(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、N-乙酰半胱氨酸-硒代同型半胱氨酸、烯丙基硒代腺苷基同型半胱氨酸、硒代-腺苷基同型半胱氨酸、硒代-羟基腺苷基同型半胱氨酸、硒代腺苷、硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜、腺苷基-羟基硒亚砜、乙基硒代腺苷、硒代-(羟基)-硒吩-(3'-脱氧-腺苷)、腺苷基-羟基硒亚砜, 和硒代-腺苷基-Se(甲基)-硒亚砜。因此, 在一些实施方案中, 本申请提供一种或多种含硒化合物(例如, 硒醚、含有SeCys的二和三肽的缀合物、硒醇和硒亚砜(例如, 在面列表中提供的)或其衍生物), 包含相同的化合物的组合物和使用相同化合物的方法(例如, 用于如本文所述的人和/或动物的应用)。

[0298] 水不溶性化合物和代谢物的鉴定和表征

测定以不溶于水的含硒化合物形式(例如, 蛋白、肽、核酸等)存在的在SEL-PLEX中的80-90%的硒制备的部分。因此, 实验在开发本申请的实施方案期间进行, 以开发一种能够

提取这些化合物(例如,化合物(例如,从中衍生的完整部分或组分)的最大量的提取以致所述化合物被鉴定、表征和/或定量)的方法,此外,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以生成一种允许通过Orbitrap电喷雾和/或分析化合物的离子化(例如,有效离子化)化合物(例如,蛋白、肽、核酸等)的纯化方法。因此,如下所述,开发了一种允许大于50%天然化合物的提取的方法。研究固相提取分馏法。然而,通过非信息提供的Orbitrap MS进行分离化合物的较差纯度的分析。鉴定生成有用信息的其它方法。尝试进行产生信息结果的伴有和不伴有另外的HPLC纯化步骤的尺寸排阻LC分馏法。

[0299] 硒物质的提取

存在于样品中的大多数硒化合物/物质(从约70至95%的总Se,这取决于样品)是非水溶性的和需要定制设计的程序以将它们转换为溶液,然后通过质谱分析。对12种独立的方法进行测试并比较和获得提取率(提取物中的总硒与样品中的总Se的比率)。基于用与碘乙酰胺的衍生合并的4% SDS提取蛋白的程序,获得约55 %的最高回收率。对SELPLEX样品实施最佳化,其中水溶性物质表示约15%的总Se (结果示于下表3中)

条件	提取率%
4% SDS, 0.1M tris-HCl pH7.5; 衍生	55
4% SDS; 0.1M tris-HCl pH7.5	40.2
5%甘油; 2% SDS; 0.06M tris pH8.8	18.9
7M脲; 0.1M tris pH7.5	14.3
5M脲; 0.1M tris pH7.5	11.4
7M脲; 3.3% CHAPs	10.9
5M脲; 0.1M tris pH7.5	10.6
0.1M tris pH7.5	3.33
0.09M tris pH7.5	2.63
5mM MgCl ₂ ; 0.1M tris pH7.5	1.76
30%乙醇; 0.1M tris pH7.5	1.16
y-pex	0.61
*水	16.32

用丙酮沉淀提取的蛋白和用胰蛋白酶消化。在质谱分析之前,消化的提取物的纯化是必要的。特别是,胰蛋白酶消化的纯化被最佳化。测试的程序包括在酸性和碱性条件下(见下表4)的固相提取和制备型尺寸-排阻色谱法。

酸性模式	碱性模式
H ₂ O pH 2.5	H ₂ O pH 10.5
H ₂ O 3% ACN pH 2.5	H ₂ O 3% ACN pH 10.5
H ₂ O 10% ACN pH 2.5	H ₂ O 10% ACN pH 10.5
H ₂ O 20% ACN pH 2.5	H ₂ O 20% ACN pH 10.5
H ₂ O 20% ACN pH 10.5	H ₂ O 20% ACN pH 2.5
H ₂ O 50% ACN pH 10.5	H ₂ O 50% ACN pH 2.5
H ₂ O 8% ACN pH 10.5	H ₂ O 80% ACN pH 2.5

[0300] 表4. 用于硒化酵母化合物的胰蛋白酶消化物的固相提取 (SPE) 纯化的洗脱条件。
 [0301] 获得的结果概述于下表5中,显示各个部分中的Se洗脱的百分率。

条件	部分中Se的百分率
酸性样品的水	15%
H ₂ O pH2.5	11%
H ₂ O 3% ACN pH2.5	11%
H ₂ O 10% ACN pH2.5	16%
H ₂ O 20% ACN pH2.5	18%
H ₂ O 20% ACN pH10.5	18%
H ₂ O 50% ACN pH10.5	8%
H ₂ O 80% ACN pH10.5	3%
碱性样品的水	5%
H ₂ O pH10.5	10%
H ₂ O 3% ACN pH10.5	9%
H ₂ O 10% ACN pH10.5	21%
H ₂ O 20% ACN pH10.5	43%
H ₂ O 20% ACN pH2.5	9%
H ₂ O 50% ACN pH2.5	3%
H ₂ O 80% ACN pH2.5	0%

[0302] 各个部分中硒化合物/物质的分子量分布经SEC-ICP MS (见图15) 并通过比较曲线的总和与原始消化获得的曲线证实的完全洗脱来鉴定 (见图16)。不幸的是, SPE-纯化部分的纯度证明为不足以用于电喷雾MS分析。最终地, 选择更耗时但提供有用的材料的制备型尺寸排阻色谱法 (见图17)。图18为各个SEC部分的曲线图。这种程序允许在硒代甲硫氨酸后除去洗脱的低分子Se部分 (例如, 其对随后的分析无关)。

[0303] 各个SEC部分通过UPLC- Orbitrap MS/MS分析; 鉴定几种富硒肽。离子-交换HPLC 分馏可被用来证实特性。

[0304] 因此, 在一些实施方案中, 本申请提供用于非水溶性含硒化合物和代谢物的表征

的鉴定的方法(例如,包括步骤如用与碘乙酰胺的衍生合并的4% SDS提取蛋白,用丙酮沉淀和酶促消化(例如,用胰蛋白酶),纯化利用在酸性和碱性条件下的固相提取、制备型尺寸-排阻色谱法,和用HPLC分馏和UPLC-Orbitrap MS/MS分析)。

[0305] 通过1D凝胶电泳分析水不溶性含硒化合物

使SDS提取最佳化并如上所述,对于自SELPLEX生成的部分被认定是高效的。产生与高浓度的表面活性剂相容的分离方法(1D凝胶电泳)。激光消融扫描(Laser ablation scanning)允许识别具有高硒蛋白含量的凝胶的部分,然后分离(heartcut)这些部分并经受酶促(例如,胰蛋白酶的)消化。通过合并的UPLC-ICP MS和UPLC-ES MS/MS分析胰蛋白酶消化。这种方法允许鉴定源自甘油醛(glyceraldehyde)-3-磷酸脱氢酶3的大多数化合物。在开发本申请的实施方案期间进行的实验鉴定在SELPLEX中发现的蛋白甘油醛-3-磷酸脱氢酶3(35 kDa)在批处理期间降解为10-15 kDa蛋白/肽混合物,占超过80%的存在的不溶性蛋白。在开发本申请的实施方案期间生成和在本文提出的数据是水不溶性含硒化合物部分的首次鉴定和表征。

[0306] 水提取

称重0.1g的样品并用5mL的30mM Tris-HCl, pH 7.5在1小时期间,在超声波浴中洗涤两次。通过离心分离上清液并在分析前冷冻。残留物用于进一步分析。

[0307] 水不溶性蛋白的提取

在水提取后,用5mL的4% SDS在0.1M Tris-HCl缓冲液中的溶液洗涤残留物。样品使用超声探针在2分钟期间超声处理两次,然后在加入50μL的0.2M DTT后在超声波浴中放置1小时。离心样品并取上清液用于分析。

[0308] 凝胶电泳

在各个样品电泳之前和之后分析SDS提取物的蛋白含量,进行4次平行分析(将样品以4个不同的浓度引入凝胶)。按一式两份制备凝胶,以使得稍后转移至印迹膜上。

[0309] HPLC分析前的印迹消化

根据LA ICP MS的分析,选择要经HPLC ICP MS和HPLC MS/MS分析的凝胶样品(样品L09-4531和0087-16)。如在图6和图7中(上文描述的)标记/描述的,将根据可见光波段切割印迹。将印迹条置于独立的各管中,用TRITON X-100/CAN/Tris缓冲液提取,用IAM和DTT衍生并用胰蛋白酶消化。

[0310] 印迹样品的ICP MS分析

选择要分析的两条印迹线:1条是酵母的和1条是制备的样品,用于在pH 3时消化。使用C18 Phenomenex柱,使用梯度洗脱程序和水/甲醇/甲酸溶液作为洗脱液(见图19)分析它们。从样品L09-4531切下的7条带中,两条代表性的色谱图示于图19中并用于用Orbitrap的分析。

[0311] 印迹样品的MS/MS分析

获得完全的质谱。含硒化合物的研究和鉴定如下进行:MetWorks软件被用来寻找具有硒模式的单、双和三重荷电化合物;对列出的化合物进行手动检测,以努力排除假阳性鉴定;一旦鉴定和验证了化合物的列表,进行使用Orbitrap的第二次运行,以获得选择的质量的MS2光谱。根据描述的方法鉴定5个含硒化合物的MS谱(和对其进行测序)在图20中呈现。将酵母样品的印迹分成10份。所有10份用ICP MS分析。从对应于质量35kDa的谱带的样

品6获得有趣的色谱图。色谱图极其类似于从鉴定来自甘油醛-3-磷酸脱氢酶3的肽的先前印迹获得的色谱图。因此,本申请提供,在pH 3制备水不溶性提取物导致甘油醛-3-磷酸脱氢酶3的消化。

[0312] 手工进行MS2分析测序。通过比较和交叉核对在线蛋白质组数据库(UNIPROT, BLAST等)获得并表征序列数据。图21提供通过描述的方法鉴定的含硒肽的列表。得出的结论是,每个鉴定的含硒肽衍生自甘油醛-3-磷酸脱氢酶。因此,在一些实施方案中,本申请提供一种或多种含硒化合物(例如,在图20和21中鉴定的),包含含硒化合物的组合物和使用含硒化合物的方法(例如,如本文所述的人和/或动物的应用)。

[0313] 实施例2

含硒组合物抑制心肌细胞肥大和老化

材料和方法

动物和治疗

在C57/BL6的遗传背景下,在核酸外切酶编码的线粒体DNA聚合酶 γ 的结构域中,表达纯合性突变的雄性PolG^(D257A)小鼠由Dr. Tomas A. Prolla提供(University of Wisconsin, Madison, WI)。小鼠单独饲养,并保持在William S. Middleton纪念馆退伍军人管理局医疗中心(William S. Middleton Memorial Veterans Administration Medical Center)的共享老化啮齿动物设施(Madison, WI)中。温度和湿度维持在恒定水平。控制室内光线以提供12-hr的光和暗的周期。给小鼠自由提供水和喂给实验食物,所述食物于4°C在暗中贮存。将新鲜食物每周两次加入到喂食容器中。

[0314] 断奶后立即将小鼠随机分为三个治疗组之一。一组小鼠接受具有硒浓度<0.01 mg/kg的基础食物(SD)和第二组接受与SD食物相同,但向其中加入含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式((SP)、SELPLEX、ALLTECH, Inc. Lexington, KY)的含1.0 mg/kg硒的食物。SP食物的最终硒浓度是每百万分之一(1)份。食物预混物中的硒浓度通过原子吸收光谱(见例如,Connolly, Power, Hynes, 2004)评价;在实验食物中,通过Covance Inc. (Madison, WI)评价。基础SD食物含有15 g/100 g总脂肪,以及538.6 g/kg蔗糖、300 g/kg酿酒酵母(Torula yeast)、140 g/kg玉米油、3.0 g/kg DL甲硫氨酸、15.4 g/kg矿物混合物(含有(基于g/kg食物计)碳酸钙, 2.02;氯化钠, 2.6;柠檬酸钾(一水合物), 7.7;硫酸钾, 1.82;氧化镁, 0.84;柠檬酸铁, 0.21;碳酸亚锰, 0.12;碳酸锌, 0.056;硫酸铬钾, 0.019;碳酸铜, 0.011;碘化钾, 0.0004)和3.0 g/kg维生素混合物(含有(基于mg/kg食物计),酒石酸氢胆碱, 2800;烟酸, 30;泛酸钙, 16;吡哆醇HCl, 7;硫胺HCl, 6;核黄素, 6;叶酸, 2;生物素, 0.2;维生素B-12 (0.1%在manniton中, 25;dl- α -醋酸生育酚(500 ug), 100;维生素A棕榈酸酯(500,000 u/g), 8;胆钙化醇(cholecalciferol) (500,000 u/g), 0.4;叶绿醌, 3)。

[0315] 从各个治疗组,在60天后处死6只小鼠,和在400天处死6只小鼠(分别称为POLG-幼鼠和POLG-老龄鼠)。通过颈椎错位处死两组小鼠并收集组织。实验至少按一式两份进行。

[0316] 组织制备.

为交叉-组织基因表达研究,收集心脏、肝和腓肠肌样本,在液氮中快速冷却并于-80°C贮存。对于脑-特异性表达研究,大脑皮层与周围脑组织分离,在液氮中快速冷却并于-80°C贮存。

[0317] RNA提取.

冷冻组织样品使用QIAGEN组织Ruptor (QIAGEN, Valencia, CA) 匀化和总RNA使用RNEASY微型药剂盒 (RNEASY Mini kit) (QIAGEN), 按照该公司建议的方案提取。分离的RNA的完整性和纯度使用NanoDrop ND-1000分光光度计 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) 评价并用AGILENT 2100生物分析仪系统 (AGILENT Technologies, Santa Clara, CA) 证实。使用含有T7- (dT)₂₄引物和T7 RNA聚合酶促进剂的GENECHIP表达3' -扩增试剂一个-周期cDNA合成药剂盒 (GENECHIP Expression 3' -Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit) (AFFYMETRIX, Santa Clara, CA), 将纯化的RNA转化为双链cDNA。使用AFFYMETRIX GENECHIP表达3' -扩增的一个-周期目标标记药剂盒 (AFFYMETRIX GENECHIP Expression 3' -Amplification One-Cycle Target Labeling Kit) (AFFYMETRIX), 根据生产商推荐的程序, 将双链cDNA转化为生物素-标记cRNA。生物素-标记cRNA并使用GENECHIP样品清理模块清洁并加热 (于94°C 35分钟) 成碎片的。

[0318] 微阵列和生物信息学路径分析.

于45°C, 将标记的cRNA杂交至小鼠基因组 MG-430_2.0 GENECHIP阵列 (AFFYMETRIX) 持续16 h, 接着洗涤, 链霉抗生物素-藻红蛋白 (SAPE) 染色和最后在GENECHIP扫描仪3000 7G (AFFYMETRIX) 上扫描。使用GENESPRING GX 12.5 (AGILENT) 验证, 使微阵列数据归一化并进行统计学和基因表达图谱分析。简言之, 通过探针组 (probesets) 的阵列的第一级强度进行标准化, 以使目标强度平均为500, 接着是对本研究的所有样本中位数的基线转换。通过基于其Perfect Match (PM) 和Mis-Match (MM) 探针设计的微阵列的MAS5进行背景校正。为尽量减少误导结果的可能性, 具有低信号强度并由跨样品的AFFYMETRIX MAS5算法标记为‘缺乏’的探针组被从进一步的分析中排除。使用火山作图法, 过滤差异表达基因, 其中P < 0.05和对应的信号强度倍数变化 (FC) > 1.2或FC < -1.2的基因被定义为显著不同的。

[0319] 为剖析由改变的转录图谱表示的生物主题, 应用两个独立的途径分析方法。首先, 进行利用基因集富集的参数分析 (PAGE), 一种允许在限定的基因集测定显著变化的计算方法 (见例如, Kim & Volsky, 2005), 以鉴定由食物显著改变的生物过程和信号传导途径。只分析具有至少10和至多1,000个基因和具有水平3和3以下的那些基因本体论 (GO) 的术语。为进一步鉴定表征与食物Se状态有关的转录变化的功能簇, 使用独创性途径分析软件将显著改变的基因进一步分组到网络、功能和规范途径中 (IPA, Ingenuity System, Redwood City, CA)。Fischer的精确检验被用来确定基因和给定的网络、生物功能或规范途径之间关系的显著性。

[0320] 实时PCR分析:

根据生产商推荐的程序, 使用应用生物科学的预先设计的TAQMAN探针和引物 (INVITROGEN) 进行实时PCR分析。数据经Actb水平在各个样品这归一化, 并表示为样品数量的均数± sem。

[0321] 总蛋白测定:

使用电子称测量心脏组织重量, 然后如所描述的匀化 (见例如, Lan et al., Biol Reprod, 1998. 58 (1): p. 197-206)。匀浆中的蛋白水平根据生产商的方案, 使用Pierce 660nm蛋白测定药剂盒确定 (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Rockford,

IL)。各个样品的总蛋白水平按组织重量归一化。

[0322] 蛋白质印迹分析:

对于蛋白质印迹分析,来自SD-或SP-处理的Po1G小鼠的等量心脏蛋白经受SDS-PAGE凝胶分离,然后转移至PVDF膜,如前所述(见例如,Lan等, Biol Reprod, 1998. 58 (1): p. 197-206; Adhikari等, Hum Mol Genet, 2010. 19 (3): p. 397-410); Reddy等, Science, 2008. 319 (5863): p. 611-3)。然后膜印迹在含有5% (w/v) 牛血清白蛋白的磷酸-缓冲盐水(Sigma, St. Louis, MO)中封闭,接着与抗Myh7 (Santa Cruz) 的特异性抗体、Ankrd1 (Santa Cruz)、GSK3 β (细胞信号传导)、Foxo3a (细胞信号传导)、神经钙蛋白A (Abcam)、磷酸化NFATc2、磷酸化NFATc3 (Santa Cruz)、Actb或 β -微管蛋白 (Li-COR) 一起温育。在膜印迹上的阳性信号使用Amersham's提高的化学发光的蛋白质印迹检测试剂(GE healthcare)或荧光-标记的二次抗体(LI-COR)检测。这些信号的图像使用LI-COR Odyssey Fc图像系统记录。蛋白带密度使用Li-COR确定摄影软件或NIH ImageJ软件,然后经Actb或 β -微管蛋白水平在各个样品中归一化。数据被表示为图解中指示的样品数量的均数 \pm sem。实验重复至少两次。

[0323] 统计学分析.

对于实时PCR和蛋白质印迹分析,进行Student's t-检验以确定两组之间的统计学差异,同时进行单向ANOVA,接着进行Student's t-检验以确定各组间的差别。p-值少于0.05被认为是显著的。

[0324] 给予富硒酵母形式的硒抑制老年Po1G小鼠心肌中Myh7和Ankrd1表达

核-编码的DNA聚合酶c (POLG) 是动物细胞线粒体中唯一已知的DNA聚合酶。人POLG基因中的突变与各种症状相关的多种疾病有联系,包括眼肌麻痹、白内障、进行性肌无力、帕金森氏病、卵巢过早衰竭、男性不育,听力减退(老年性耳聋),和心脏功能障碍(见例如,Kujoth et al., PLoS Genetics, 2007. 3 (2))。Po1G^(D257A)小鼠模型显示在12周的线粒体编码的复合物的呼吸功能进行性下降,导致降低的氧消耗和减少的ATP生产(见例如,Kujoth等, PLoS Genetics, 2007. 3 (2))。已报道Po1G小鼠显示加速的心脏老化表型伴有由扩大的心脏尺寸和13-14月龄的心肌细胞指示的显著的心脏肥大(见例如,Dai等2010, Kujoth等, 2005和图22A)。

[0325] 肥厚性心肌病(HCM)是最常见的单基因遗传形式的心脏疾病并且是在35岁以下个体突然心脏死亡的最常见的原因(见例如,Frey et al., Nat Rev Cardiol, 2012. 9 (2): p. 91-100)。为HCM的基础的遗传突变已被充分表征,伴有编码肌小节蛋白(sarcomeric proteins)的大多数突变,如肌球蛋白-7(也称为心肌 β -肌球蛋白重链;MYH7)(见例如,Frey等, Nat Rev Cardiol, 2012. 9 (2): p. 91-100)。

[0326] 心脏锚蛋白重复蛋白(CARP)由ANKRD1基因编码,ANKRD1基因和CARP核因子的表达涉及左心室肥大、人心力衰竭、扩张型心肌病(DCM),和阿霉素-诱导的心肌病(见例如,Duboscq-Bidot等, Archives of Cardiovascular Diseases, 2009. 102, Supplement 1 (0): p. S73)。与文献记录的表型相一致,当与POLG年幼小鼠比较时,心脏肥大标记物Myh7和Aknrd1的年龄依赖性表达在POLG年老小鼠的心脏组织中升高(见图22B)。

[0327] 实验在开发本申请的实施方案期间进行,以确定给予硒是否可改变肥厚性分子的表达。已观测到当与给予SD对照食物的Po1G年老小鼠比较时,在以富硒酵母(包含2%或更少

无机硒)的形式给予硒的Po1G年老小鼠中,肥大标记肌球蛋白重链β (Myh7) 和心脏锚蛋白重复蛋白 (Ankrd1) 的表达下调。为证实这种观测,进行定量实时 (QRT) -PCR, 当与给予SD对照食物的Po1G年老小鼠比较时,在以富硒酵母(包含2%或更少无机硒)的形式给予硒的Po1G年老小鼠中,Myh7 (图23A, 顶部小图) 和Ankrd1 (图23B, 顶部小图) 的表达显著下调。使用 Myh7和Ankrd1特异性抗体进行蛋白质印迹分析,在以富硒酵母(包含2%或更少无机硒)的形式给予硒的Po1G年老小鼠中,心脏Myh7和Ankrd1蛋白水平显著低于喂给SD对照食物的Po1G小鼠(见图23A-B, 底部小图)。因此,本申请提供含有2%或更少无机硒的富硒酵母(或存在于其中的一种或多种含硒化合物),当给予受试者时,抑制肥厚性蛋白Myh7和Ankrd1的积聚(例如,由此抑制和/或预防心肌老化和肥大)。

[0328] 给予富硒酵母形式的硒改变已知通过在Po1G年老小鼠中调节NFATs、Gsk3β和S6K的磷酸化和蛋白水平诱导心脏肥大的信号传导途径

神经钙蛋白-NFAT信号传导在病理学心脏肥大和心力衰竭中被激活(见例如, Molkentin, *Cardiovascular Research*, 2004. 63 (3) : p. 467-475)。神经钙蛋白最初认为是基于其在转基因小鼠心中的过度表达的肥厚性信号传导因子。表达神经钙蛋白的激活突变体的小鼠表现出显著的肥厚性反应(心脏大小增加2-3倍),其在2-3个月内快速发展为扩张型心力衰竭(见例如, Molkentin, *Cardiovascular Research*, 2004. 63 (3) : p. 467-475)。Cn作用的主要机制是刺激细胞质中激活T细胞(NFAT)的核因子的脱磷酸化,这导致非磷酸化NFAT在核中的升高。一旦在细胞核中,NFAT家族成员参与T细胞中各种免疫反应基因的转录诱导(见图24A)。有4种神经钙蛋白-调节的NFAT转录因子、NFATc1-c4,其各自仅由神经钙蛋白激活并在心肌中表达(见例如, Molkentin, *Cardiovascular Research*, 2004. 63 (3) : p. 467-475)。因此,进行进一步的实验以确定含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒是否可减少Cn的表达并因此改变Cn/NFAT信号传导(例如,以预防或减少心脏肥大)。

[0329] 进行蛋白质印迹分析以比较给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠与喂给SD对照食物的Po1G年老小鼠的心脏中神经钙蛋白-A (Cn-A) 的蛋白水平以及4个NFAT亚单位 (NFATC1、C2、C3和C4) 的磷酸化状态。如在图24B中所示的,Po1G年老小鼠中Cn-A水平没有改变;然而,与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较,在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠的心脏中,磷酸化-NFATc2 (pNFATc2) 水平升高(图 24B和24C)。在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的受试者中,也检测到升高水平的磷酸化NFATc3,而磷酸化NFATc1和C4 未检测到。

[0330] 神经钙蛋白的作用和NFAT的核穿梭由GSK3β拮抗,因为它使NFATc1的N-末端调节域直接磷酸化(见例如, Crabtree et al., 2002)。GSK3β的增加的表达减少心肌细胞肥厚性生长并在其中在心脏中产生组成性或诱导性GSK3β表达的转基因小鼠中,对激活神经钙蛋白响应的心脏肥大减少(见例如, Molkentin, *Cardiovascular Research*, 2004. 63 (3) : p. 467-475)。实验在开发本申请的实施方案期间进行以鉴定给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒可对心脏GSK3β水平具有什么作用。如在图24B和24C中所示,已发现与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的POLG年老小鼠具有显著提高的GSK3β的心脏表达。

[0331] 最近的研究已显示,雷帕霉素(mTor)的哺乳动物目标的抑制作用和S6K的失去可

延长小鼠寿命,即使后者仅在雄性小鼠中观测到(见例如,Selman等, Science, 2009. 326 (5949) : p. 140-4);Harrison等, Nature, 2009. 460 (7253) : p. 392-5)。已报道S6K抑制其它细胞的GSK3 β 活性(见例如,Cohen和Frame, Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2 (10) : p. 769-76)。因此进行实验以测试在蛋白合成p4E-BP,和PI3K信号传导分子pPDK1和pAkt中,磷酸化S6K (pS6K1)、mTor及其下游目标的蛋白水平在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的POLG年老小鼠(与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较)是否有改变。已发现pS6K1水平,但不是mTOR,也不是其它磷酸化PDK1/Akt/4E-BP,在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠中比给予SD对照食物的POLG年老小鼠显著减少(见图24A和24B)。

[0332] 给予富硒酵母形式的硒增加Foxo3表达,但不是Foxo1或Foxo4的表达

最近的研究已显示叉头框转录因子(Foxo)家族基因Foxo1、Foxo3和Foxo4对于心脏肥大和/或对抗氧化应激的生存的关键(见例如,Ni等, Circulation, 2006. 114 (11) : p. 1159-68;Sengupta等, J Biol Chem, 2011. 286 (9) : p. 7468-78)。

[0333] 因此,进行实验以确定给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒对Foxo家族转录因子可能具有什么作用(如果有任何作用的话)。利用实时PCR,已确定在POLG小鼠的心脏组织中分析的各个Foxo基因的表达中,没有年龄依赖性上调或下调。而且,与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较,在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的POLG年老小鼠中,虽然对Foxo1或Foxo4表达没有显著的作用,但Foxo3 (mRNA和蛋白二者)的表达有显著增加(见图25)。心脏肥大已证实见于Foxo3空突变小鼠,但未见于Foxo4空突变小鼠(见例如,Ni等, Circulation, 2006. 114 (11) : p. 1159-68)。因此,本申请提供增加Foxo3功能的表达以积极控制心脏的转录活性。

[0334] 给予富硒酵母形式的硒调节年老Po1G小鼠的心脏Atm/Gadd45g信号传导

Atm/Gadd45信号传导是细胞周期阻滞和DNA修复的关键途径[13, 14]。实验在开发本申请的实施方案期间进行,以表征在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较的心脏中Atm和Gadd45表达。已发现,利用QRT-PCR,在Po1G小鼠心脏中存在Atm表达的年龄依赖性降低(见图26A)。有趣地,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒消除Po1G年老小鼠的心脏中Atm表达的年龄依赖性降低(见图26A)。此外,心脏Gadd45的表达,一种Atm/Trp53 (p53,一个众所周知的主要用于细胞周期阻滞和DNA修复的肿瘤抑制基因)的下游靶标,在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠中(与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较)显著上调(见图26B)。

[0335] 给予富硒酵母形式的硒调节心肌细胞中的线粒体Ucp2

线粒体(MT)中的解偶联蛋白对于产热和维持MT电位或完整性是关键的(见例如,Sena等, Mol Cell, 2012. 48 (2) : p. 158-67;Krauss等, Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6 (3) : p. 248-61)。Ucp2的失去已被证实引起MT中活性氧(ROS)的较短寿命和升高的生产(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)。实验在开发本申请的实施方案期间进行,以表征给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较的Ucp1、2和Ucp3表达。已发现,利用QRT-PCR,Ucp2在给予

含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠(与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较)显著升高(见图27)。

[0336] 给予富硒酵母的硒下调脂质运载蛋白2 (Lcn2) ,一种心力衰竭的标记物和用于心肌收缩性的重要分子的表达

Lcn2是心力衰竭的生物标记物,且对于心肌收缩是关键的(见例如,Yang等, Am J Transl Res. 4(1) : p. 60-71; Xu等, J Biol Chem. 287(7) : p. 4808-17)。

[0337] 当人衰老时,心脏变得僵硬,伴有心肌细胞扩大和肌细胞收缩力减少,二者是心力衰竭的主要原因。实验在开发本申请的实施方案期间进行,以表征给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠(与给予SD对照食物的POLG年老小鼠比较)的心脏组织中的Lcn2表达。利用QRT-PCR,在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的Po1G年老小鼠中发现Lcn2表达的显著和引人注目的增加(见图28)。这种观测与本文公开的关于增加的pNFAT2/3水平的其它结果一致(例如,在基因转录中NFAT活性的激活中) (见图24),因为Lcn2是NFAT目标(见例如,Gaudineau等, J Cell Sci, 2012. 125(Pt 19) : p. 4475-86)。

[0338] 实施例3

含硒组合物减轻肌少症

材料和方法

动物和治疗

将雄性C57BL/6J小鼠单独关养,并保持在William S. Middleton纪念馆退伍军人管理局医疗中心(William S. Middleton Memorial Veterans Administration Medical Center)的共享老化啮齿动物设施(Madison, WI)中。温度和湿度维持在恒定水平。控制室内光线以提供12-hr的光和暗的周期。小鼠被自由提供水和喂给其实验食物,实验食物(由Harlan Teklad, Madison, WI生产)于4°C在暗中贮存。将新鲜食物每周两次加入到喂食容器中。

[0339] 一组小鼠接受具有硒浓度<0.01 mg/kg的基础食物(SD);第二组接受与SD食物相同但以亚硒酸钠(SS)形式向其中加入含有1.0 mg/kg硒的食物;第三组接受与SD食物相同但以硒代甲硫氨酸的形式(SM)向其中加入1.0 mg/kg硒的食物;和第四组接受与SD食物相同但以含有2%或更少无机硒的富硒酵母的形式((SP)、SEPLEX、ALLTECH, Inc. Lexington, KY)向其中加入1.0 mg/kg硒的食物。各个SS、SM和SP食物的最终硒浓度是每百万分之一(1)份。食物预混物中的硒浓度通过原子吸收光谱(Connolly, Power, Hynes, 2004)评价;在实验食物中,通过Covance Inc. (Madison, WI)评价。基础SD食物含有15 g/100 g总脂肪,以及538.6 g/kg蔗糖、300 g/kg酿酒酵母(Torula yeast)、140 g/kg玉米油、3.0 g/kg DL甲硫氨酸、15.4 g/kg矿物混合物(含有(基于g/kg食物计)碳酸钙, 2.02;氯化钠, 2.6;柠檬酸钾(一水合物), 7.7;硫酸钾, 1.82;氧化镁, 0.84;柠檬酸铁, 0.21;碳酸亚锰, 0.12;碳酸锌, 0.056;硫酸铬钾, 0.019;碳酸铜, 0.011;碘化钾, 0.0004)和3.0 g/kg维生素混合物(含有(基于mg/kg食物计)酒石酸氢胆碱, 2800;烟酸, 30;泛酸钙, 16;毗哆醇HCl, 7;硫胺HCl, 6;核黄素, 6;叶酸, 2;生物素, 0.2;维生素B-12 (0.1%在manniton中, 25;dl- α -醋酸生育酚(500 ug), 100;维生素A棕榈酸酯(500,000 u/g), 8;胆钙化醇(500,000 u/g), 0.4;叶绿醌, 3中)。

[0340] 在给予上述食物 (SD、SM、SS或SP) 3个月后,通过颈椎错位处死小鼠,然后收集组织。

[0341] 组织制备:

为交叉-组织基因表达研究,收集心脏、肝,和腓肠肌样本,在液氮中快速冷却并于-80℃贮存。对于脑-特异性表达研究,大脑皮层与周围脑组织分离,在液氮中快速冷却并于-80℃贮存。

[0342] RNA提取.

冷冻组织样品使用QIAGEN组织Ruptor (QIAGEN, Valencia, CA) 匀化和总RNA使用RNEASY微型药剂盒 (RNEASY Mini kit) (QIAGEN),按照该公司建议的方案提取。分离的RNA的完整性和纯度使用NANODROP ND-1000分光光度计 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) 评价并用AGILENT 2100生物分析仪系统 (AGILENT Technologies, Santa Clara, CA) 证实。

[0343] 使用含有T7- (dT)₂₄引物和T7 RNA聚合酶促进剂的GeneChip表达3' -扩增试剂一个-周期cDNA合成药剂盒 (GeneChip Expression 3' -Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit) (AFFYMETRIX, Santa Clara, CA),将纯化的RNA转化为双链cDNA。使用AFFYMETRIX GeneChip表达3' -扩增的一个-周期目标标记药剂盒 (AFFYMETRIX GeneChip Expression 3' -Amplification One-Cycle Target Labeling Kit) (AFFYMETRIX),根据生产商推荐的程序,将双链cDNA 转化为生物素-标记的cRNA。生物素-标记cRNA并使用Genechip样品清理模块清洁并加热 (于94℃35分钟) 成碎片的。

[0344] 微阵列和生物信息学路径分析.

于45℃,将标记的cRNA杂交至小鼠基因组 MG-430_2.0 GeneChip阵列 (AFFYMETRIX) 持续16 h,接着洗涤,链霉抗生物素-藻红蛋白 (SAPE) 染色和最后在GeneChip扫描仪3000 7G (AFFYMETRIX) 上扫描。

[0345] 使用GeneSpring GX 12.5 (Agilent) 验证,使微阵列数据归一化并进行统计学和基因表达图谱分析。简言之,通过探针组 (probesets) 的阵列的第一级强度进行标准化,以使平均目标强度为500,接着是对本研究的所有样本中位数的基线转换。通过基于其 Perfect Match (PM) 和Mis-Match (MM) 探针设计的微阵列的MAS5进行背景校正。为尽量减少误导结果的可能性,具有低信号强度并由跨样品的AFFYMETRIX MAS5算法标记为‘缺乏’的探针组被从进一步的分析中排除。使用火山作图法,过滤差异表达基因,其中P < 0.05的基因被定义为显著不同的。

[0346] 为剖析由改变的转录图谱表示的生物主题,应用两个独立的途径分析方法。首先,进行利用基因集富集的参数分析 (PAGE),一种允许在限定的基因集测定显著变化的计算方法 (见例如, Kim & Volsky, 2005),以鉴定由食物显著改变的生物过程和信号传导途径。只分析具有至少10和至多1,000个基因和具有水平3和3以下的那些基因本体论 (GO) 的术语。为进一步鉴定表征与食物Se状态有关的转录变化的功能簇,使用独创性途径分析软件将显著改变的基因进一步分组到网络、功能和规范途径中 (IPA, Ingenuity System, Redwood City, CA)。Fischer的精确检验被用来确定基因和给定的网络、生物功能或规范途径之间关系的显著性。

[0347] 总蛋白测定.

使用电子称测定腓肠肌组织重量,然后如所描述的匀化(见例如,Lan et al., 1998)。匀浆中的蛋白水平根据生产商的方案,使用Pierce 660nm蛋白测定药剂盒确定(Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Rockford, IL)。各个样品的总蛋白水平按组织重量标准化。数据被表示为样品数量的均数± sem。实验重复两次

统计学分析.

进行Student's t-检验以确定两组之间的统计学差别,同时进行单向ANOVA,接着进行Student's t-检验以确定各组间的差别。p-值少于0.05被认为是显著的。

[0348] 用富硒酵母的硒治疗受试者显示升高的骨骼肌蛋白

为研究给予富硒酵母的硒是否可影响骨骼肌组成和/或质量,监测喂给补充有富硒酵母的硒(SP)的食物的小鼠对比喂食不补充硒的食物(SD)的小鼠的总骨骼肌蛋白经3个月时期。如在图29中所示,与给予SD食物的小鼠比较,给予SP食物的小鼠的骨骼肌中总蛋白显著升高。这种数据表明,以富硒酵母的形式补充硒增加骨骼肌的总蛋白水平。

[0349] 给予富硒酵母形式的硒激活肌肉卫星细胞成熟和/或产生和骨骼肌再生

缺乏响应营养信号以产生成熟肌细胞的肌肉卫星(干)细胞的激活是肌少症的一个原因(见例如,Rya11等, 2008)。在开发本申请的实施方案期间进行实验,以通过测量激活的卫星标记基因、生肌因子6 (Myf6) 和肌间线蛋白(Des)的表达,表征在硒处理的骨骼肌中对比对照受试者的肌肉卫星(stem)细胞激活。已发现与对照组比较,在给予富硒酵母形式(含有2%或更少无机硒(SP)和亚硒酸钠(SS))的硒的小鼠的骨骼肌中,这些激活的卫星标记基因的表达显著上调(见图34)。因此,本申请提供含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或存在于其中的一种或多种含硒化合物)的硒,其促进肌肉卫星细胞的成熟(例如,以产生成熟肌细胞),由此减轻肌少症。

[0350] 给予富硒酵母形式的硒改变控制骨骼肌的蛋白合成的信号传导途径

mTOR/S6K和MAPK/S6K信号传导

通过mTOR的信号传导影响几种主要的细胞功能,其可正性和负性调节细胞行为如生长(质量积聚)和增殖(见例如,Laplante, Cell. 2012, 149 (2):274-93)。蛋白合成是由mTOR控制的最好的表征方法之一。由mTOR激活S6K是经由mTOR信号传导途径的蛋白合成的一个重要步骤(见例如,Laplante, Cell. 2012, 149 (2):274-93)。除了由mTOR-途径激活S6K外,通过MAPK/ERK2-介导的途径激活S6K也可刺激蛋白合成(见例如,Kenessey和Ojamaa, J Biol Chem, 2006, 281 (30): 20666-20672)。有丝分裂原-激活的蛋白激酶激酶2 (MAP2K2)是激活MAPK1/ERK2途径的酶并在人类中,通过MAP2K2基因编码(见例如,Biochim Biophys Acta. 2007, 1773 (8):1150-60)。然后MAPK激活RSK,后者依次使核糖体蛋白S6K磷酸化(见例如,Pende等Mol Cell Bio, 2004. 24 (8): p. 3112-3124)。一种与蛋白合成相关的途径的负性调节剂是GSK3 β 。GSK3 β 的抑制阻断涉及蛋白合成的真核起始因子2B (eIF2B)。活性形式的GSK3 β 的表达被表明诱导骨骼肌管肥大的显著增加,心脏中野生型GSK3 β 的过度表达诱导心脏大小的30%降低(见例如,Santri, Physiology (Bethesda). 2008;23:160-70)。

[0351] 与对照组比较,在给予富硒酵母形式(SP)的硒的小鼠的骨骼肌中观测到mTOR的基因表达水平的显著减少(见图31)。在给予富硒酵母形式(SP)的硒的小鼠的骨骼肌中观测到MAP2K2基因表达的甚至更加显著的减少,当与给予SD食物的小鼠比较时显示-3.03的倍数

变化(图36)。

[0352] 已发现当与对照组比较时,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母(SELPLEX)下调S6K表达(见例如,图31),这与SELPLEX减少mTOR和MAPK2K在小鼠骨骼肌中的表达这一发现相关。然而,SELPLEX在给予SELPLEX的小鼠的腓肠肌组织中显著下调GSK3 β 表达的结果在考虑到灭活GSK-3 β 可刺激蛋白合成后是令人惊奇的。这些结果表明,尽管下调已知促进肌肉中的蛋白合成的基因(例如,mTOR、MAPK2K,和S6K),含有2%或更少无机硒的富硒酵母(或一种或多种存在于其中的含硒组合物)通过其它途径增加总骨骼肌蛋白(例如,骨骼肌质量)。

[0353] Ampk,一种mTor的抑制剂,也参与蛋白合成(见例如,Gordon等, 2008;Thomson等, 2008)。与减少的S6k和mT0表达一致,Prkaa2(一种Ampk的亚单位)的表达升高,在给予富硒酵母形式的硒的小鼠(与对照组比较)的骨骼肌中也观察到(见图31)。因此,在一些实施方案中,如本文所述使用含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(或其含硒化合物成分)以增加受试者的骨骼肌质量。

[0354] 给予富硒酵母形式的硒上调在骨骼肌质量形成中的神经钙蛋白的表达
神经钙蛋白/NFAT网络

神经钙蛋白/激活T-细胞的核因子(NFAT)信号传导是在响应锻炼和钙信号传导时与增加骨骼肌质量有关的关键途径(见例如,Glass, 2003)。在开发本申请的实施方案期间进行实验,以表征控制肥厚性基因的神经钙蛋白/NFAT信号传导分子的表达。已发现与对照组比较,表达编码神经钙蛋白的催化亚单位(Ppp3cb和Ppp3cc,和神经钙蛋白B亚单位Ppp3rl)的基因在给予富硒酵母形式(含有2%或更少无机硒)的硒的小鼠的骨骼肌中均有显著升高(见下表6)。此外,Ppp3r2(神经钙蛋白B的另一种亚单位)的增加表达的趋势也被观察到(见下表6)。

	基因	SP (vs SD 组)
神经钙蛋白	Ppp3ca	无
	Ppp3cb	↑
	Ppp3cc	↑
	Ppp3rl	↑
	Ppp3r2	↑(趋势)
NFATs	Nfatc1 (NFAT2)	无
	Nfatc2 (NFAT1)	无
	Nfatc3 (NFAT4)	无
	Nfatc4 (NFAT3)	无
	Nfat5	无

基因	SP (vs SD 组)
神经钙蛋白	P _{ppp3ca} No
	P _{ppp3cb} ↑
	P _{ppp3cc} ↑
	P _{ppp3r1} ↑
	P _{ppp3r2} ↑(趋势)

[0355] 表6. 与不补充硒的对照食物比较,在用补充有含2%或更少无机硒的富硒酵母(SP)形式的硒的食物喂养3个月的正常小鼠的骨骼肌中,神经钙蛋白升高。

[0356] 还观察到与对照组比较,在给予富硒酵母形式的硒的小鼠的骨骼肌中,多个有助于增加蛋白水平和骨骼肌生长的编码蛋白延伸因子(Eef1a1、Eef1b2、Eef1e1、Eef1g、Eef2)的基因上调(见图30)。

[0357] 给予富硒酵母形式的硒改变抑制骨骼肌的蛋白合成的信号传导网络
肌肉生长抑制素/Acvr2b网络

肌肉生长抑制素及其受体,激活蛋白A,是控制肌肉萎缩的另一个重要的途径。Acvr2b(特别地在肌纤维中)的遗传消融,甚至在卫星细胞激活的不存在下足以诱导肌肉肥大(见例如, Lee等, PNAS 2012)。此外,肌肉生长抑制素/Acvr2b复合物通过破坏Akt/mTOR信号传导途径抑制蛋白合成(见例如, Sakuma和Yamaguchi, J Aging, 2012)。

[0358] 因此,在开发本申请的实施方案期间进行实验,以表征来自给予对照食物的受试者(对比含有硒的食物)的骨骼肌中的Acvr表达。已确定Acvr2b表达在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的受试者中显著下调(见图33)。

[0359] 给予富硒酵母形式的硒在骨骼肌中下调萎缩基因表达和抑制蛋白降解

已证明萎缩基因如含有三重基序(tripartite motif) 63 (Trim63) 和遍在蛋白E3连接酶atrogin-1 (Fbxo32) 的升高的表达导致肌少症中的蛋白降解(见例如, Sakuma和Yamaguchi, 2012)。因此,在开发本申请的实施方案期间进行实验,以表征给予含硒实验食物的受试者(对比给予缺硒食物的那些受试者)的骨骼肌中的萎缩基因表达。已发现与对照组比较,在给予富硒酵母形式(含有2%或更少无机硒)的硒的小鼠的骨骼肌中, Trim63和Fbxo32二者下调(见图32)。Trim53和Fbxo32的减少的表达在从给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒2年的正常小鼠(与对照组比较)的骨骼肌中得到文献证实。

[0360] 因此,在一些实施方案中,如本文所述使用含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或其含硒化合物成分)的硒来抑制骨骼肌萎缩。

[0361] 实施例4

给予含硒的组合物显著减弱与肥胖症相关的分子的表达

肌少症和肥胖症是两个独立但相互关联的病症,其在发达国家中对期望寿命和卫生保健费用有越来越大的影响。减少的肌肉质量伴有增加的脂肪质量的组合被称为“少肌性肥胖(sarcopenic obesity)”(见例如, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113)。肥胖症加重肌少症,因为它促进脂肪质量的增加和脂质积聚,这防止氨基酸结合和减少骨骼肌的蛋白合成(见例如, Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113)。反过来,

由于骨骼肌质量对具有全身葡萄糖处置和胰岛素敏感性的基本作用的代谢健康至关重要, 肌少症加重肥胖症(见例如,Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113)。除了肌少症, 肥胖症往往是与其它代谢性疾病如II型糖尿病、高血糖症等相关的副作用。已充分理解, 遗传上易患病的体质和肥胖相关分子的表达也是一个促进因素。肥胖症在发达国家中对期望寿命和卫生保健费用有越来越大的影响(见例如,Parr, E., Maturitas, 2013. 74: p. 109-113)。

[0362] 脂肪质量和肥胖相关基因(FTO), 普通称为“肥胖基因”, 与身体质量指数增加和儿童和成人中易患肥胖症的体质强烈相关(见例如,Gulati et al, PNAS, 2013. 110 (7): p. 2557-2562)。FTO基因是广泛表达的, 但在大脑中, mRNA水平在海马回、小脑和下丘脑内是特别高的, 提示脑FTO在控制食物摄入量、全身代谢和肥胖中的潜在作用(见例如, Church, PLoS Genetics, 2009)。

[0363] 在开发本申请的实施方案期间进行实验, 以确定给予受试者硒是否可改变FTO的表达。

[0364] 利用在实施例3中描述的动物模型, 确定给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒的受试者显示与给予SD食物的受试者比较的显著减少水平的FTO基因表达, 这不仅在皮层组织(倍数变化= -1.70)中, 而且还在腓肠肌组织(倍数变化= -3.33)中显示(见图36和37)。

[0365] 实施例5

在给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母后, 过氧化物酶体增殖物-激活受体 γ (PPAR γ)共激活剂1 α (PGC-1a)表达在骨骼肌对比肝表达之间的反比关系

材料和方法

动物和治疗

将雄性C57BL/6J小鼠单独关养, 并保持在William S. Middleton纪念馆退伍军人管理局医疗中心(William S. Middleton Memorial Veterans Administration Medical Center)的共享老化啮齿动物设施(Madison, WI)中。温度和湿度维持在恒定水平。控制室内光线以提供12-hr的光和暗的周期。小鼠被自由提供水和喂给其实验食物, 实验食物(由Harlan Teklad, Madison, WI生产)于4°C在暗中贮存。将新鲜食物每周两次加入到喂食容器中。

[0366] 一组小鼠接受具有硒浓度<0.01 mg/kg (SD)的基础食物; 第二组接受与SD食物相同但以亚硒酸钠(SS)形式向其中加入含有1.0 mg/kg硒的食物; 第三组接受与SD食物相同但以硒代甲硫氨酸的形式(SM)向其中加入1.0 mg/kg硒的食物; 和第四组接受与SD食物相同但以含有2%或更少无机硒的富硒酵母((SP)、SEPLEX、ALLTECH, Inc. Lexington, KY)的形式向其中加入1.0 mg/kg硒的食物。各个SS、SM和SP食物的最终硒浓度是每百万分之一(1)份。食物预混物中的硒浓度通过原子吸收光谱(Connolly, Power, Hynes, 2004)评价; 在实验食物中, 通过Covance Inc. (Madison, WI)评价。基础SD食物含有15 g/100 g总脂肪, 以及538.6 g/kg蔗糖、300 g/kg酿酒酵母(Torula yeast)、140 g/kg玉米油、3.0 g/kg DL甲硫氨酸、15.4 g/kg矿物混合物(含有(基于g/kg食物计)碳酸钙, 2.02; 氯化钠, 2.6; 柠檬酸钾(一水合物), 7.7; 硫酸钾, 1.82; 氧化镁, 0.84; 柠檬酸铁, 0.21; 碳酸亚锰, 0.12; 碳酸锌, 0.056; 硫酸铬钾, 0.019; 碳酸铜, 0.011; 碘化钾, 0.0004)和3.0 g/kg维

生素混合物(含有(基于mg/kg食物计)酒石酸氢胆碱, 2800;烟酸, 30;泛酸钙, 16;吡哆醇HCl, 7;硫胺HCl, 6;核黄素, 6;叶酸, 2;生物素, 0.2;维生素B-12 (0.1%在manniton, 25;dl- α -醋酸生育酚(500 ug), 100;维生素A棕榈酸酯(500,000 u/g), 8;胆钙化醇(500,000 u/g), 0.4;叶绿醌, 3中)。

[0367] 通过颈椎错位处死小鼠,然后收集组织。

[0368] 组织制备:

为交叉-组织基因表达研究,收集心脏、肝,和腓肠肌样本,在液氮中快速冷却并于-80°C贮存。对于脑-特异性表达研究,使大脑皮层与周围脑组织分离,在液氮中快速冷却并于-80°C贮存。

[0369] RNA提取.

冷冻组织样品使用QIAGEN组织Ruptor (QIAGEN, Valencia, CA) 匀化和总RNA使用RNEASY微型药剂盒(RNEASY Mini kit) (QIAGEN),按照该公司建议的方案提取。分离的RNA的完整性和纯度使用NANODROP ND-1000分光光度计(Thermo Scientific, Wilmington, DE)评价并用AGILENT 2100生物分析仪系统(AGILENT Technologies, Santa Clara, CA)证实。

[0370] 使用含有T7- (dT) 24引物和T7 RNA聚合酶促进剂的GeneChip表达3' -扩增试剂一个-周期cDNA合成药剂盒(GeneChip Expression 3' -Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit) (AFFYMETRIX, Santa Clara, CA),将纯化的RNA转化为双链cDNA。使用AFFYMETRIX GeneChip表达3' -扩增的一个-周期目标标记药剂盒(AFFYMETRIX GeneChip Expression 3' -Amplification One-Cycle Target Labeling Kit) (AFFYMETRIX),根据生产商推荐的程序,将双链cDNA 转化为生物素-标记的cRNA。生物素-标记的cRNA并使用Genechip样品清理模块清洁并加热(于94°C35分钟)成碎片的。

[0371] 微阵列和生物信息学路径分析.

于45 °C,将标记的cRNA杂交至小鼠基因组MG-430_2.0 GeneChip阵列(AFFYMETRIX)持续16 h,接着洗涤,链霉抗生物素-藻红蛋白(SAPE)染色和最后在GeneChip扫描仪3000 7G (AFFYMETRIX)上扫描。

[0372] 使用GeneSpring GX 12.5 (AGILENT)验证,使微阵列数据正常化并进行统计学和基因表达图谱分析。简言之,通过探针组(probesets)的阵列的第一级强度进行标准化,以使平均目标强度为500,接着是对本研究的所有样本的中位数的基线转换。通过基于其Perfect Match (PM) 和Mis-Match (MM) 探针设计的微阵列的MAS5进行背景校正。为尽量减少误导结果的可能性,具有低信号强度并由跨样品的AFFYMETRIX MAS5算法标记为‘缺乏’的探针组被从进一步的分析中排除。使用火山作图法,过滤差异表达基因,其中P < 0.05和对应的信号强度倍数变化(FC) > 1.2或FC < -1.2的基因被定义为显著不同的。

[0373] 为剖析由改变的转录图谱表示的生物主题,应用两个独立的途径分析方法。首先,进行利用基因集富集的参数分析(PAGE),一种允许在限定的基因集测定显著变化的计算方法(见例如, Kim & Volsky, 2005),以鉴定由食物显著改变的生物过程和信号传导途径。只分析具有至少10和至多1,000个基因和具有水平3和3以下的那些基因本体论(GO)的术语。为进一步鉴定表征与食物Se状态有关的转录变化的功能簇,使用独创性途径分析软件将显著改变的基因进一步分组到网络、功能和规范途径中(IPA, Ingenuity System, Redwood

City, CA)。Fischer的精确检验被用来确定基因和给定的网络、生物功能或规范途径之间关系的显著性。

[0374] 实时PCR分析:

根据生产商推荐的程序,使用应用生物科学的预先设计的TAQMAN探针和引物(INVITROGEN)进行实时PCR分析。数据经Actb水平在各个样品标准化,并表示为样品数量的均数± sem。

[0375] 统计学分析

对于实时PCR和蛋白质印迹分析,进行Student's t-检验以确定两组之间的统计学差别,同时进行单向ANOVA,接着进行Student's t-检验以确定各组间的差别。p-值少于0.05被认为是显著的。

[0376] 背景

骨骼肌和肝是维持葡萄糖稳态的两个关键的胰岛素-反应器官。这些器官转变为胰岛素-抵抗状态占在罹患II型糖尿病的患者中发现的葡萄糖代谢改变的大多数(见例如,Lowell和Shulman, 2005)。在这两个器官中,根据因胰岛素抵抗发展而自然增加的后果,骨骼肌是更重要的。这是由于已发现骨骼肌处理掉或代谢每日摄取的葡萄糖的80-90% (见例如,DeFronzo等, 1985)。

[0377] 已经证明,当与健康对照组比较时,线粒体氧化磷酸化(OXPHOS)基因在糖尿病前期和糖尿病个体中表现出减少的表达,并且显著数量的OXPHOS基因受转录共激活剂,PGC1- α 的调节(见例如,Mootha等, 2003)。在这些研究中,OXPHOS基因表达的典型下降是适度的(约20%),但与在患有或者受损的葡萄糖耐受性或者相对于具有正常葡萄糖耐受性的那些II型糖尿病的个体中89%的所研究的基因显示较低的表达极其一致。在OXPHOS分子表达的重要性的支持中,有氧训练,是治疗糖尿病、增加线粒体数量和促进OXPHOS分子表达的最好的非药物干预。

[0378] 因此,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以研究给予受试者硒是否可改变受试者的肝和/或骨骼肌中的OXPHOS活性(例如,作为2型糖尿病的治疗剂)。在开发本申请的实施方案期间产生的经验数据发现,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(Trt),导致PGC1- α 在骨骼肌中的表达与对照受试者(Con)比较的显著提高(见图38)。

[0379] 如本文所述,PGC1- α 是一种强大的转录共激活剂,其提高骨骼肌中的线粒体活性。然而,在非骨骼肌的组织中,升高的PGC1- α 水平的表达在受试者中可具有不利和/或有害的作用。例如,在肝中,PGC1- α 表现出与其在骨骼肌中表现的作用不同的作用。特别是,在肝中的PGC1- α 水平升高导致糖质新生增加(葡萄糖生产;见例如,Liang和Ward, 2006),一个发生在伴有胰岛素敏感性受损而无法代谢葡萄糖的糖尿病受试者中的极其不利的事件。

[0380] 因此,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以研究给予受试者硒可具有关于非-骨骼肌组织中PGC1- α 表达的活性(如果有任何活性的话)。出乎意料地,已发现给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母(Trt)形式的硒导致在肝组织中PGC1- α 表达与对照受试者(对照组)比较的显著减少(见图39)。基于给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒导致在骨骼肌中PGC1- α 表达与对照受试者比较的显著提高的观察,这个发现是让人惊奇的。因此,本申请提供包含富硒酵母(包含2%或更少无机硒(或存在于其中或从中衍生的一种或多种含硒化合物)的组合物,其用于提高在受试者的骨骼肌中的PGC1- α 表达,同时降低在受试

者的肝中的PGC1- α 表达的方法中(例如,由此提供给受试者在骨骼肌中提高的葡萄糖处置(例如,通过提高的OXPHOS)和抑制葡萄糖在肝中的生产)。

[0381] 为进一步表征和验证包含含有2%或更少无机硒的富硒酵母的组合物在受试者的不同组织中,对相同分子(例如,PGC1- α)的表达具有这样的完全不同影响的能力,进行实验以分析COUP转录因子2(也称为核受体亚家族2,组F,成员2(Nr2F2))在给予包含硒的组合物的受试者中的表达。Nr2F2是一种PGC1- α 的公认的直接抑制剂(见例如,Lin et al., 2011)。

[0382] 此外,令人惊奇地发现,给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式的硒(Trt)导致在骨骼肌中Nr2F2表达与对照受试者比较(Con)的显著减少(见图38,而在肝组织中存在Nr2F2与对照组比较的显著提高(见图39)。这种数据提供关于含有2%或更少无机硒的富硒酵母形式(或其一种或多种水溶性部分或其一种或多种水不溶性部分或一种或多种存在于其中或从中衍生的含硒化合物)的含硒组合物用于在受试者的多种组织(例如,骨骼肌组织和肝组织)中调节葡萄糖稳态的用途的第一证据。

[0383] 实施例6

给予富硒酵母形式的硒提高涉及葡萄糖利用的分子的表达

利用在实施例2中描述的动物模型,进行实验以分析在给予包含硒的组合物的受试者的肝中调节氧化磷酸化(OXPHOS)的分子表达。已发现有可能通过给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母以优先地和有区分地调节肝特异性线粒体活性,而给予亚硒酸盐或硒代甲硫氨酸是明显不太有效的。特别是,已观察到给予含有2%或更少无机硒的富硒酵母的小鼠显示显著增加ATP合酶;ATP酶、H⁺传递、V1亚单位A;细胞色素c氧化酶、亚单位Va;细胞色素c-1、NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体(subcomplex)10;NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体1;NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体3;NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体4;NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体aase;NADH脱氢酶(泛醌)1 β 子复合体4;NADH脱氢酶(泛醌)1 β 子复合体8;NADH脱氢酶(泛醌)1 β 子复合体10;NADH脱氢酶(泛醌)Fe-S-蛋白4;NADH脱氢酶(泛醌)Fe-S-蛋白6;和琥珀酸脱氢酶复合物,亚单位C的表达;并且还显著减少ATP酶抑制因子1;ATP酶、H⁺转运溶酶体、V1亚单位H;NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体4;和含有2的锌指蛋白CCHC结构域的表达。

[0384] 相反,给予亚硒酸钠的小鼠显示显著增加ATP酶、H⁺转运、V1亚单位A;ATP酶、H⁺转运、V1亚单位D;细胞色素c氧化酶、亚单位Va;NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体10;NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体1;NADH脱氢酶(泛醌)1 β 子复合体10;和琥珀酸脱氢酶复合物、亚单位C的表达;并且还显著减少ATP酶抑制因子1;ATP酶、H⁺转运溶酶体, V1亚单位H;和NADH脱氢酶(泛醌)1 α 子复合体4的表达。

[0385] 给予硒代甲硫氨酸的小鼠显示显著增加ATP合酶和细胞色素c氧化酶亚单位Va的表达;并且还显著减少ATP酶抑制因子1;ATP酶、H⁺转运溶酶体、V1亚单位H;和ATP酶、H⁺转运、V1亚单位A的表达。

[0386] 实施例7

分离的含硒化合物调节线粒体活性

在任何复合物生物混合物中,有可能存在于其中的分子基团不能相加作用;而是它们可协同作用或,甚至拮抗地调节最终制剂的活性。例如,含有2%或更少无机硒的本文所

述的富硒酵母的生物活性可以是其中某些或所有的硒物质/含硒化合物的作用的总和。

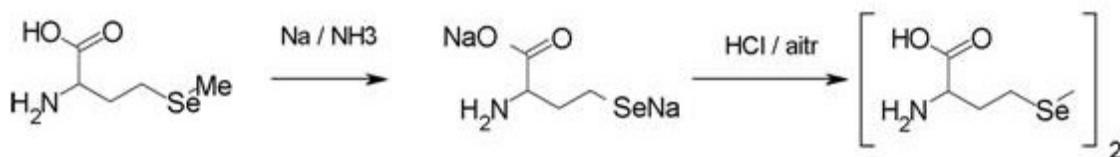
[0387] 如在上面实施例1中描述的,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以表征富硒酵母的Se代谢物组和蛋白质组。实施例1提供的是鉴定和表征因此其鉴定和表征仍是未知的含Se化合物(例如,分子、代谢物和蛋白/肽)。

[0388] 因此,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以确定在实施例1中鉴定的特定含硒化合物是否具有生物活性(例如,以确定含硒化合物是否将显示生物活性和/或如果从酵母细胞和/或其它非-含硒细胞成分的内部mélange的限制分离和纯化,是否含硒化合物可能具有更多(或更少)的生物活性)。从实施例1的富硒酵母鉴定的许多最丰富的含硒化合物和分子被合成或获得。实验的一个焦点是如在实施例1中描述的存在于富硒酵母中总硒的最多25%的水溶性提取物。推测来自水溶性提取物的含硒化合物将是第一个从受试者及其通过肠道的通道的消费的富硒酵母释出/消化的。在上面实施例1中还描述了使用计算机辅助预测模型,鉴定存在于富硒酵母的含硒蛋白。此外,实验鉴定通过消化酶(例如,胰蛋白酶)的作用释出的小的含硒肽。

[0389] 获得含硒化合物的9个小图用于分析和鉴定。这种小图包括以下含硒化合物: LVSe-MR ($C_{16}H_{33}N_6O_4Se$) (#5); LVSe-MR ($C_{22}H_{44}N_7O_5Se$) (#6); LTGSe-MAFR ($C_{35}H_{59}N_{10}O_9Se$) (#7); 硒代谷胱甘肽二聚体 ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}Se_2$) (#8); 甲基硒代腺苷 ($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9); 谷氨酰基硒代半胱氨酸 ($C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$) (#10); 酵母pH 6.0 (#25); (3X) 谷胱甘肽, 氧化的(从Sigma Aldrich获得) (#28); 和谷氨酰基半胱氨酸(从Sigma Aldrich获得) (#30)。

[0390] 所用的含硒化合物(和各自的任意指定数量)如下所示: (#1) L-硒代胱氨酸 ($C_6H_{12}N_2O_4Se_2$) 从Sigma-Aldrich Cat# 545996购得, 纯度97%;

(#2) L-硒代同型胱氨酸 ($C_8H_{16}N_2O_4Se_2$)。合成方案和方法是:



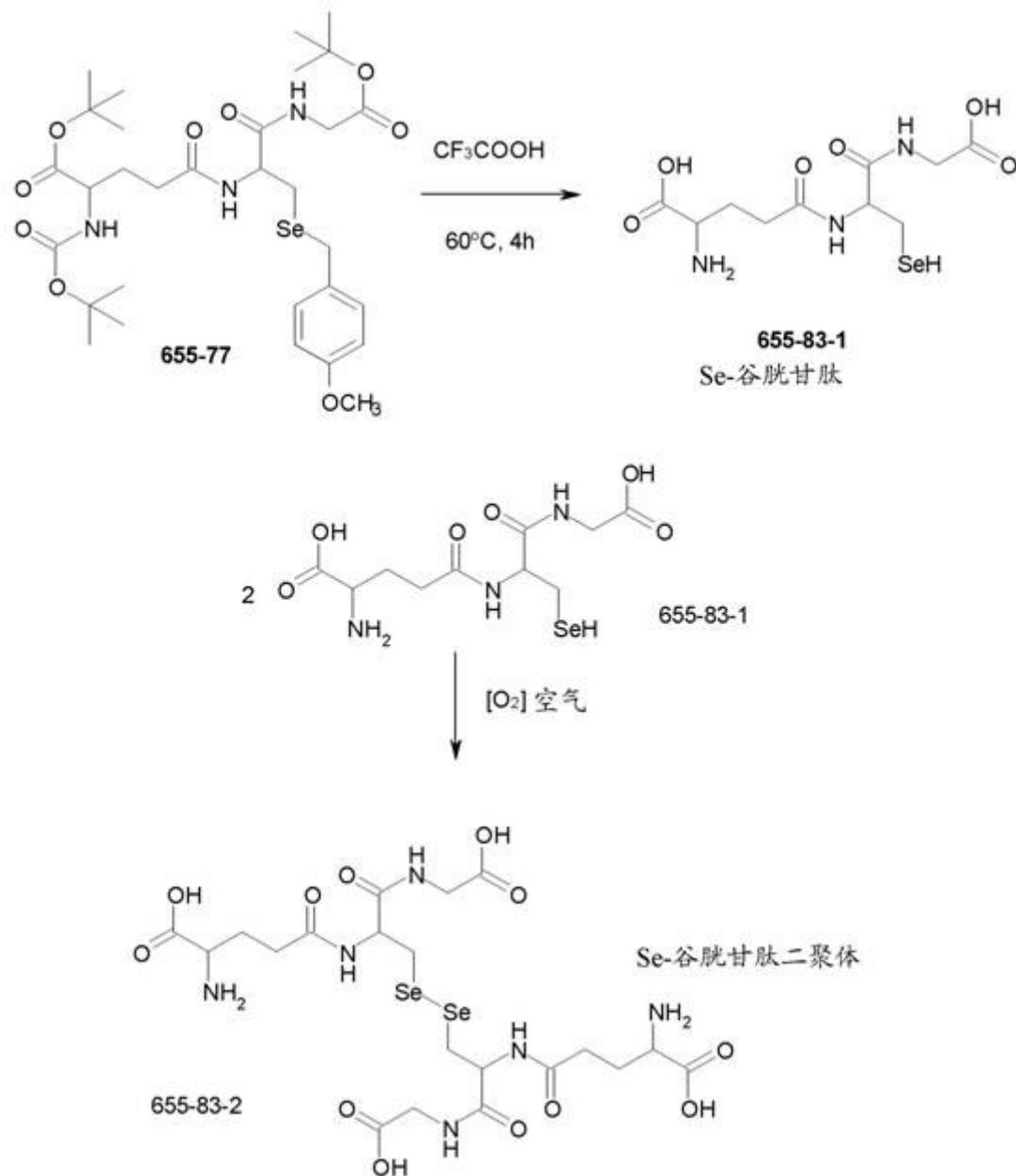
于-78°C (干冰-丙酮浴), 在搅拌下向L-(+)-硒代甲硫氨酸(1.96g, 10.0mM)在液氮(80mL, 60g)中的溶液中, 在80min内小心地加入小片金属钠(0.575g, 25.0mM), 直至该溶液维持蓝色15min。于-78°C搅拌溶液另外50min并加入固体氯化铵(3.0g, 56mM)以中和酰胺钠。使反应混合物向空气开放并缓慢升温至室温过夜。得到的黄色固体与100mL水混合并通过加入1N HCl (6.0mL), 将pH ~9.0调节至6.7。加入甲醇(50mL)并在空气流下剧烈搅拌混合物从9am (04/28/11)至9am (04/29/11)。通过过滤收集淡黄色沉淀物(1.652g, 91.2%产率)构成干净的硒代同型胱氨酸($R_f = 0.52$), 而没有硒代甲硫氨酸($R_f = 0.8$)污染。TLC: SiO_2 ; $MeOH:H_2O: NH_4OH/18:2:0.2$ 。用5% $KMnO_4$ 处理和加热后出现黄色斑点。MS ($M+H^+$) = 433。NMR, 400MHz, 1N DCI在 D_2O 中, $\delta=0.0$ ppm ($Me_3Si-CD_2CD_2CO_2Na$): 5.238 br. S 所有的 ND_3^+ , 7.13 H/D; 4.259 t, $J=6.4$ Hz, 1H, C-1; 3.058 dt, $J=3.2\&6.4$ Hz, 2H, C-3; 2.446 dp, $J=6.4\&13.6\&6.4$, 2H, C-2 (光学活性)。

[0391] (#3) 甲基硒代-L-半胱氨酸 ($C_4H_9NO_2Se$) 作为盐酸盐从Sigma-Aldrich购得, Cat# M6680, 纯度95%。 (#4) L-硒代甲硫氨酸 ($C_5H_{11}NO_2Se$) 从Sigma-Aldrich购得, Cat# S3132, 纯度98%。 (#5) VSe-MR ($C_{16}H_{33}N_6O_4Se$) 由Biomatik, Wilmington, Delaware合成和从

Biomatik, Wilmington, Delaware获得)。(#6) LVSe-MR ($C_{22}H_{44}N_7O_2Se$) 由Biomatik, Wilmington, Delaware合成并从Biomatik, Wilmington, Delaware获得)。

[0392] (#7) LTGSe-MAFR ($C_{35}H_{59}N_{10}O_9Se$) 由Biomatik, Wilmington, Delaware合成并从Biomatik, Wilmington, Delaware获得)。

[0393] (#8) 硒代谷胱甘肽二聚体 ($C_{20}H_{32}N_6O_{10}Se_2$) , 从Biomatik, Willington, Delaware 获得), 合成方案和方法是:



MOB-硒代半胱氨酸(665-71)的合成

使硒代胱氨酸3.341g (10Mmol)溶于10mL 0.5N氢氧化钠(冰浴, Ar° , 30min, 黄色溶液),接着分批加入1.35g (30Mmol)硼氢化钠,直至完全变色。在强磁力搅拌下,将2N氢氧化钠(30mL)加入到反应混合物中并在冰冷却下加入纯净的对-甲氧基苯基氯7.831g (50Mmol)。维持搅拌、冷却和 Ar° 流4h。此后,加入~7.0 mL浓盐酸以调整反应混合物pH至8.5。过滤除去形成的白色沉淀物并用2x 10mL和5x 10mL乙醚洗涤。在高真空下产品经 P_2O_5

干燥20h,产生8.29g无定形白色沉淀,其被用于下一阶段的合成而无需任何进一步的纯化。

[0394] 合成Boc-Glu(0tBu)-Se(MOB)CysOH (655-72)

在环境温度(22°C)下,将6.55g (16.357Mmol) Boc-Glu(0tBu)-NHS酯在50mL 1,4-二氧六环中的溶液在伴随磁力搅拌下加入到4.68g (16.25Mmol) MOB-硒代半胱氨酸在12.5mL水和2.3mL (16.5Mmol) 三乙胺的混合物中的悬浮液中并在有效搅拌下放置50h。此后,在冰浴中冷却混合物并逐滴加入1.4mL浓盐酸与8.6mL水的混合物。在T<25°C通过真空旋转蒸发除去过量的溶剂,溶液用20mL水(pH 6.5)稀释并用3x 50mL乙醚、3x 50mL乙酸乙酯和3x 50mL二氯甲烷提取。蒸发溶液至干燥,得到9.2g粗产物,其被用于下一阶段的合成而无需任何进一步的纯化。

[0395] 合成Boc-Glu(0tBu)-Se(MOB)Cys-NHS酯 (655-75)

使Boc-Glu(0tBu)-Se(MOB)CysOH 9.2g (16.0Mmol)、N-羟基琥珀酰胺1.841g (16.0Mmol) 和N,N-二甲基苄基胺130μL溶于/悬浮于200mL无水乙醚中。在环境温度(22°C)下,将二环己基二甲酰胺3.404g (16.5Mmol) 在100mL无水乙醚中的溶液在充分搅拌下,通过滴液漏斗(用空气平衡)加入到该溶液中。反应物在搅拌下放置24h,过滤除去形成的白色沉淀物,用3x 20mL无水乙醚洗涤并倾析。浓缩滤液,得到12.95g黄色粘稠油,其被用于下一阶段的合成而无需任何进一步的纯化。

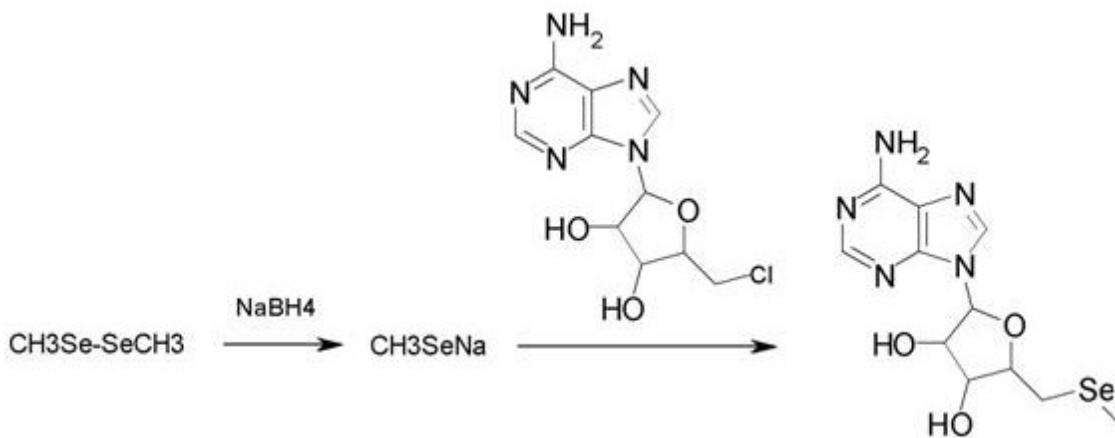
[0396] 合成全保护的硒代谷胱甘肽(见方案,655-77)

将得自前述步骤的全部Boc-Glu(0tBu)-Se(MOB)Cys-NHS酯、12.97g (~16.0Mmol), 3.2g (19.1Mmol) 甘氨酸盐酸盐-0-tBu酯和4.2mL三乙胺溶于130mL无水乙醚中并在环境温度(22°C)搅拌下放置过周末。通过过滤分离形成的白色沉淀(三乙胺 盐酸盐)并在滤器上用2x 25mL无水乙醚洗涤。使用旋转蒸发器在真空下浓缩滤液,得到12.9g油,将该油用11mL溶剂混合物:甲苯:乙酸乙酯:乙腈(7:2:1)稀释并应用于从350mL SiO₂在400mL相同溶剂的混合物中的悬浮液制备的SiO₂ LC柱(50cm床)顶部。在第一次500mL洗脱液中收集低极性杂质。通过用5:2:1甲苯:乙酸乙酯:乙腈500mL,接着用400mL相同溶剂的混合物4:2:1洗脱柱,收集产品。产品R_f 0.55在4:2:1的溶剂混合物中。通过在5% KMnO₄中浸渍板显示斑点(黄色)。合并所有的含有产品的部分并使用旋转蒸发器在真空下浓缩,最终在高真空下干燥,得到具有MW= 686.7 m/e的4,658g产物,这与对硒代谷胱甘肽式:C₃₁H₄₉N₃O₉Se的计算值完全一致。

[0397] 合成硒代谷胱甘肽二聚体(655-83)

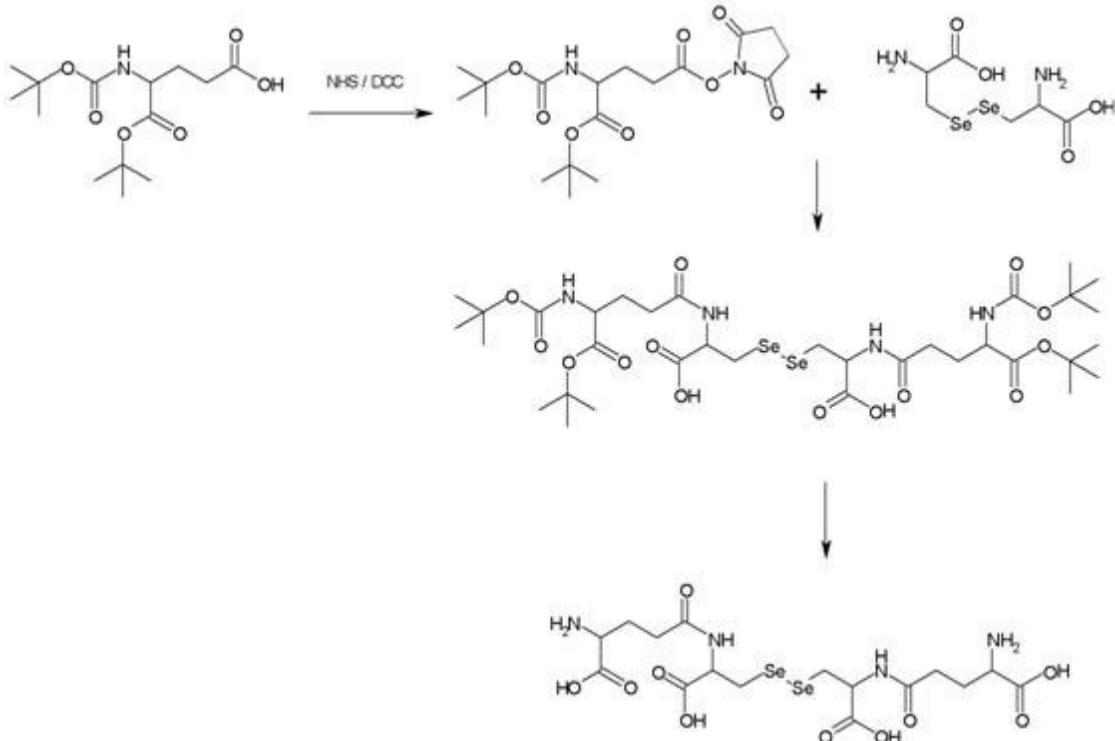
使得自前一步骤的油性、LC纯化产物溶于30mL硫代苯甲醚与50mL三氟乙酸的混合液中。搅拌产生的溶液并加热至60°C 5h。此后气体发生停止。然后于环境温度下将混合物搅拌过夜。第二天早晨,在真空下,于T<37°C,使用旋转蒸发器除去三氟乙酸。将油性残留物以~1.5mL份加入到经极其充分的机械搅拌的400mL无水乙醚中。弃去上清液同时用4x 50mL份的无水乙醚洗涤沉淀物,最终在高真空下干燥。获得的白色沉淀(3.16g)经制备型HPLC纯化,得到1.1g纯的硒代谷胱甘肽二聚体(MW 594.87) m/e.

(#9) 甲基硒代腺苷(C₁₁H₁₅N₅O₃Se)。合成方案和方法是:



将硼氢化钠(227mg, 6.0mM, 在Ar⁰下)放置在一个含有20mL无水乙醇的200mL圆底烧瓶中, 该烧瓶配备有磁力搅拌器并位于冰冷却的浴中。在冷却、搅拌和Ar气流下, 从注射器加入二甲基联硒化物(190 μ L, 376mg, 2.0mM)。在微黄色溶液变色后加入固体5'-氯-5'-脱氧腺苷(1,143g, 4.0mM)。5'-Cl-Ade是几乎不溶于乙醇的。加入100mL以上的乙醇以溶解沉淀物。于室温下连续搅拌混合物随后的4天。使用MS监测转化。5天后完成~75%的转化。蒸发溶剂, 收集产物3.22g (具有~ 20%的SM) 并经反相(C-8) 制备型色谱法纯化, 得到1.1g纯产物, 其分子量经质谱证实。

[0398] (#10) 谷氨酰基硒代半胱氨酸二聚体($C_{16}H_{26}N_2O_{10}Se_2$)。合成方案和方法是:



合成N-Boc-(0-tBu)-L-Glu-0Su (639-37)

使N-Boc-(0-tBu)-L-Glu-OH (2.712g, 9.0mM)、N-羟基琥珀酰胺 (1.047g, 9.1mM) 和二环己基碳二亚胺 (1.888g, 9.15mM) 悬浮于/溶于300mL无水乙醚中, 将50uL二甲基乙基苄胺从注射器加入到反应混合物中。维持于室温下搅拌24h。过滤混合物并用3 x 20mL乙醚洗涤沉淀物。浓缩滤液并在高真空下干燥, 得到白色结晶产物 (3.6g, 100%产率)。

MS (M+Na⁺) = 423.17; NMR 400MHz Varian, CDCl₃, ppm: 5.152 2H, d, J=7.6Hz, NH; 4.255 1H, q, J=4.4Hz; 2.838 4H, br s; 2.734 1H, ddd() 7线; 2.673 1H, ddd() 7线; 2.272 1H, octet, J=5.2Hz; 2.021 1H, m; 1.478 9H, s; 1.450 9H, s。

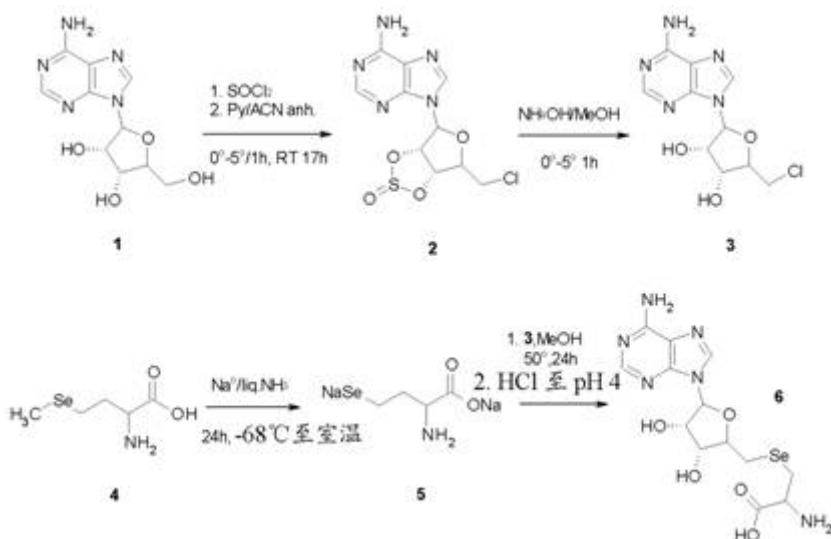
[0399] 合成N-Boc-(0-tBu)-L-Glu-L-Secys-OH二聚体 (639-39)

使硒代胱氨酸 (1.5g, 4.49mM) 溶于/悬浮于水 (25mL) 中。磁力搅拌并在冰浴中冷却混合物, 然后加入到混合物三乙胺 (1.324mL, 0.961g, 9.5mM) 中。制备并将N-Boc-(0-tBu)-L-Glu-OSu (3.6g, 8.99mM) 在50mL 1,4-二氧六环中的溶液滴加入到搅拌和冷却的反应混合物中。使反应混合物在室温下搅拌过夜。从溶液分离一些黄色沉淀物并过滤出来。在真空下蒸发滤液并在高真空下干燥, 得到白色固体 (5.388g)。使这种物质溶于8mL甲醇并经使用2:1→1:2 /AcOEt:MeOH + 0.5% AcOH在SiO₂上的色谱法。N-Boc-(0-tBu)-L-Glu-L-Secys-OH二聚体 (1.212g, 在KOH /高真空干燥后) 作为单一部分 (R_f=0.32, 1:1 /AcOEt:MeOH + 0.5% AcOH) 分离。MS (M+H⁺) = 909.11; NMR 400MHz Varian, DMSO d⁶, ppm: 7.658 1H, d, J=6.4Hz, NH; 7.206 1H, d, J=7.2Hz, NH; 4.20 1H, m; 3.759 1H, m; 3.455 1H, ABX2的部分A; ABX2的3.404部分B; 2.18 2H, br pent; 1.877 1H, m; 1.75 1H, m; 1.391 9H, s; 1.379 9H, s。

[0400] 合成L-Glu-Secys-OH二聚体 (639-46)

于室温下, 将TFA:CH₂Cl₂:茴香硫醚 :H₂O / 47:47:3:3的混合物 (25mL) 加入到固体N-Boc-(0-tBu)-L-Glu-L-Secys-OH二聚体 (1.21g) 中。于室温下搅拌生成的溶液3.5h并倾入水 (50mL) 中。分离水 (上) 层并用5 x 50mL乙醚洗涤。在低于40℃的温度下真空蒸发水层并经NaOH颗粒在高真空下干燥。L-Glu -Se-Cys-OH二聚体 (0.717g, 99.8 %得率)。MS (M+H⁺) = 592.92。

[0401] (#11) 硒代腺苷同型半胱氨酸 (C₁₄H₂₀N₆O₅Se)。合成方案和方法是:



5'-氯-5'-脱氧腺苷 (639-62)

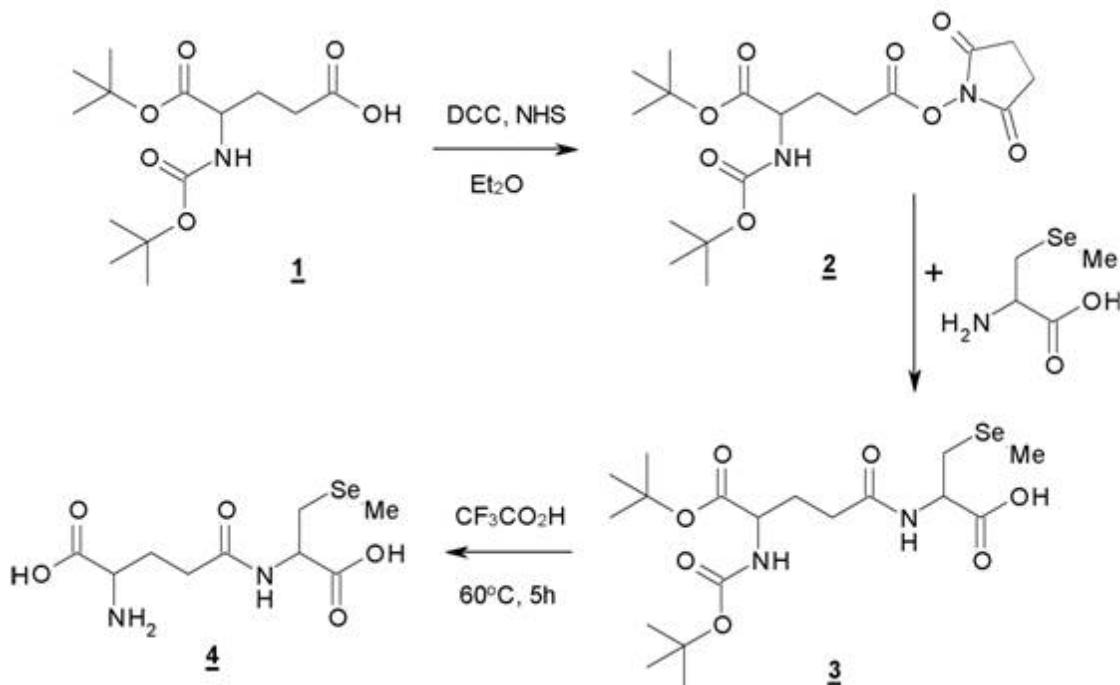
将89G (0.366mole, 1eq.) 腺苷、59.3ML (58G, 1.833mole, 2eq.) 无水吡啶和1L 无水乙腈放入一经烘箱干燥的、2L、4颈烧瓶中, 该烧瓶装备有滴液漏斗、搅拌器、气体入口/出口和温度计。将反应装置置于冰/盐浴中。开始搅拌, 当溶液的温度降到3℃以下时, 开始极其缓慢地加入亚硫酰氯 (强烈放热!)。在加入亚硫酰氯期间, 反应混合物的温度需要维持

在5°C以下并持续4h以上(在这段时间溶液在底部呈带白色-黄色沉淀的黄色。然后使反应物在环境温度下放置过夜。次日早晨,使用烧结玻璃滤器滤出大部分沉淀并用3份100ML体积的干燥乙腈在滤器上洗涤,在此期间沉淀物的颜色转变成白色。然后将湿的沉淀物转移回到2L的反应烧瓶中,该烧瓶已含有800ML甲醇和160ML水的混合物,在机械搅拌下向其中滴加入80ML浓氢氧化铵溶液并用水浴冷却。在环境温度下搅拌混合物45min并经真空过滤从液相分离形成的白色沉淀。使用真空旋转蒸发器浓缩滤液至干,同时从~560ML热水结晶沉淀,在冰-水浴中冷却,过滤掉第一次收获的结晶并冷冻干燥。然后使用这种滤液作为从旋转蒸发第一滤液获得的固体结晶的溶剂,以获得第二次收获的也经冷冻干燥(2天)的产物。将两次收获的晶体在真空干燥器中经五氧化二磷最终干燥2天。获得84G白色晶体,80.5%产率。MS (286-M+H), mp. 187°C。

[0402] 硒代腺苷基同型半胱氨酸(655-40)

将9.806G (50mM, 1 eq.) L-硒代甲硫氨酸装入配备有温度计、大的冷却指(cooling finger) (具有在出口处的气泡计)、氨气入口(达到烧瓶底部)和磁力搅拌棒的2L的3颈烧瓶中,并置于含有CO₂-丙酮冷却浴的2.5L duar容器中。使Ar°通过烧瓶,然后加入固体CO₂至丙酮浴中并冷却指。当烧瓶内的温度降至-35°C以下时,开启无水氨(气)流,当液氨水平达到800ML的体积时,停止气流。此时加入小片金属钠至充分搅拌的溶液中,直至蓝-紫溶液持续~30秒钟。在45分钟内加入总共2.645G (115mM, 2.3 eq.)的钠。维持搅拌和冷却30分钟以上。此时所有的成分均在溶液中。以单份加入14.856G (52mM, 1.04 eq.)无水5'-氯-5'-脱氧腺苷,使反应混合物持续搅拌并在极低的Ar°流下过夜。次日早晨(如果所有的氨气消失),将350ML无水甲醇加入到存在于烧瓶中的白色固体中。将烧瓶置于油浴中,安装回流冷凝器,维持Ar°气流并将油浴加热至50°C持续随后的24h。此时,用几滴0.1N HCl,将1ML溶液酸化至pH 3.5,使用质谱法分析样品中底物的存在。如果它们低于5%,则该混合物可用1N HCl酸化至pH 3.5,自盐过滤,使用真空旋转蒸发器浓缩至干,粗产物可通过从水-乙醇混合物中结晶来纯化。第一次收获的15.98G (74%产率) 硒代腺苷基同型半胱氨酸晶体是~95%纯的,并可用于生物学研究而无需进一步纯化。

[0403] (#39) γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸(C₉H₁₆N₂O₅Se)。合成方案和方法是:



合成N-Boc- (0-tBu) -L-Glu-0Su (655-90)

使N-Boc- (0-tBu) -L-Glu-OH (303mg, 1.0Mmol)、N-羟基琥珀酰胺 (121mg, 1.05Mmol) 和二环己基碳二亚胺 (227mg, 1.1Mmol) 悬浮于/溶于15mL无水乙醚中, 将10uL二甲基乙基苄基胺从注射器中加入到反应混合物中。在环境温度 (22°C) 下维持搅拌48h。过滤混合物并用10 x 10mL乙醚洗涤沉淀物。浓缩滤液并在高真空下干燥, 得到白色结晶产物 (570mg, ~90%产率)。MS (M+Na⁺) = 423.17;

合成N-Boc- (0-tBu) -L-Glu-MeSe-Cys-OH (655-90)

将N-Boc- (0-tBu) -L-Glu-0Su (570mg, 0.9Mmol)、甲基硒代半胱氨酸 (175mg, 0.8Mmol)、三乙胺 (152mg, 209μL, 1.5Mmol) 加入到6mL 1,4-二氧六环和2mL水的混合物中。维持磁力搅拌反应混合物100h。此后, 加入1.21N HCl (1.65mL) 并在反应后, 用3x 20mL乙醚提取混合物, 使用真空旋转蒸发器将提取物浓缩至干, 得到649mg蜡样产物, 其经受制备型HPLC。收集283mg产物 (75.6%得率)。质谱证实产物的分子量和其中单一Se原子的存在。对C₁₈H₃₂N₂O₇Se的计算值Ms=468.42; 实测值: 69.24 m/e (M+H⁺) 和491.24 m/e (M+Na⁺)。

[0404] 合成γ-谷氨酰基-甲基硒代半胱氨酸 (655-92)

将283mg (0.6Mmol) N-Boc- (0-tBu) -L-Glu-MeSe-Cys-OH、2mL硫代苯甲醚和5mL三氟乙酸的混合物在油浴中, 伴随机械搅拌下于63°C 加热6h并在环境温度 (22°C) 放置过夜。此后将反应混合物加入 (逐滴) 到剧烈搅拌的乙醚 (20mL) 中。用2x 20mL乙醚洗涤形成的沉淀, 得到38.3mg乳脂状沉淀物, 然后将其经制备型HPLC纯化。

[0405] (#25) 如在美国专利公布号20120164234A1中所述在pH 6.0下制备的非-富硒酵母的提取物。#28) (3X) 谷胱甘肽, 氧化的。从Sigma Aldrich获得。

[0406] (#30) 谷氨酰基半胱氨酸。从Sigma Aldrich获得。

[0407] 含硒化合物通过下面图40和表7的编号鉴定。

[0408] 为确定各个含硒化合物对线粒体生物能量的潜在影响 (如果有任何影响的话), 使

用分离的线粒体直接测试含硒化合物。为这一目的,为许多理由,选择从大鼠脑分离的线粒体,包括a) 从软组织,如脑可分离线粒体的容易性和b) 脑组织对葡萄糖和氧有很高的需求的事实。

[0409] 如下进行实验:测试从低(50 ppb)、中(500 ppb)和高(1 ppm)范围的各种浓度的含硒化合物。根据在中等范围未能观察到的针对线粒体的毒性,采用浓度500 ppb (5 μM)以进行筛选/活性分析,使用线粒体生物能量作为主要的测量结果。分离成年大鼠脑聚蔗糖(ficoll)纯化的线粒体并与各个含硒化合物于37°C一起培养30分钟,然后按一式三份装载到Seahorse Biosciences流量分析仪中。OCR (氧消耗速率)参数在3种呼吸状态下测量,包括ATP合成(状态III)、复合物I依赖性(NADH-驱动)最大呼吸能力(状态V_{FCCP})和复合物II(FADH-驱动)依赖性最大呼吸能力(状态V_{succ})。如所描述的进行海马测定(见例如, Sauerbeck等, J Neurosci Methods. 2011 May 15;198(1): 36-43; Seahorse XF, Seahorse Bioscience Inc)。

[0410] 线粒体生物动能学结果在图40中提供。已观察到9个化合物中的两个(含硒肽LVSe-MR (C₂₂H₄₄N₇O₅Se) (#6) 和甲基硒代腺苷 (C₁₁H₁₅N₅O₃Se) (#9)) 在所有3种状态的呼吸和增加的线粒体生物能量曲线图(见图40A, 等量的分离的线粒体(在没有含硒化合物的情况下温育)用作对照)显示正增加。特别是, LVSe-MR (C₂₂H₄₄N₇O₅Se) 增加与对照组比较的状态III (10.3%), 状态V_{FCCP} (21.2%) 和状态V_{succ} (7.6%)。与对照组比较, 甲基硒代腺苷增加状态III (17.3%)、状态V_{FCCP} (15.6%) 和状态V_{succ} (25%)。

[0411] 含硒肽LVSe-MR (C₂₂H₄₄N₇O₅Se) (#6) 和甲基硒代腺苷 (C₁₁H₁₅N₅O₃Se) (#9) 的生物活性利用液相氧电极(Clark-型电极)分析(见例如, Chance和Williams, J Biol Chem, 1955, 217, 383-393; Sullivan et al., J. Bioenerg. Biomembr. 36, 353-356.)。液相氧电极分析允许测定氧吸收或跨越宽范围的应用(包括线粒体和细胞呼吸)的演化测量。对于这种实验, 将60 mg线粒体蛋白与或者化合物LVSe-MR (C₂₂H₄₄N₇O₅Se) 或者甲基硒代腺苷(500 ppb) 或其对应的当量浓度的各自的对照品(分别为LVMR和甲基硫基腺苷)共同温育30分钟, 然后注射到液相氧电极室中。在各化合物的存在下测定线粒体活性(测量并表示为观察的线粒体呼吸速率, 作为nmol sO₂/min/mg线粒体蛋白的%变化)。如在图40B所提出的, 与对照组比较, 含硒肽LVSe-MR增加状态III (7.7%)、状态V_{FCCP} (13.3%) 和状态V_{succ} (9.6%)。与对照组比较, 甲基硒代腺苷 (C₁₁H₁₅N₅O₃Se) (#9) 增加状态III (29.9%)、状态V_{FCCP} (17.3%) 和状态V_{succ} (15.3%)。

[0412] 因此, 本申请提供含硒化合物(例如, LVSe-MR (C₂₂H₄₄N₇O₅Se)、甲基硒代腺苷 (C₁₁H₁₅N₅O₃Se) 和在以上实施例1中鉴定的其它化合物)和包含所述含硒化合物的组合物, 其用于在受试者中(例如, 有此需要的受试者(例如, 2型糖尿病受试者))调节线粒体活性/生物能量。

[0413] 在开发本申请的实施方案期间生成的数据和信息是独特的和新奇的发现。特别是, 本申请提供治疗(例如, 预防性和/或疗效性治疗)线粒体功能障碍或不全(例如, 涉及糖尿病(例如, II型糖尿病)、肥胖症、胰岛素抵抗、糖尿病心肌病等)的新组合物和方法。

	状态 III	%变化	状态 V	%变化	状态 Vsucc	%变化
CTRL	432.6		182.1		350.1	
#5 ²	445.9	3.0	187.8	3.2	292.5	-16.4
#6 ¹	477.51	10.31	220.61	21.21	376.41	7.61
#7 ³	372.5	-14.0	147.1	-19.2	288.0	-17.7
#8 ⁴	424.0	-2.1	192.3	5.7	371.0	6.0
#9 ¹	507.81	17.31	210.31	15.61	437.11	24.91
#10 ³	352.1	-18.7	112.7	-38.1	254.4	-27.3
#25 ³	419.0	-3.2	136.2	-25.2	309.3	-11.6
#28 ²	451.6	4.3	149.6	-17.8	319.3	-8.8
#30 ²	423.2	-2.3	153.8	-15.5	305.4	-12.7

阳性趋势¹

阳性/阴性趋势²

阴性趋势³

无变化⁴

[0414] 表7. 含硒化合物对线粒体生物能量(大鼠脑纯化线粒体5mg/孔)的作用。

[0415] 另一个令人惊奇发现是这样的事实,即虽然某些含硒化合物(例如, LVSe-MR ($C_{22}H_{44}N_7O_5Se$) (#6) 和甲基硒代腺苷 ($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9)) 在与线粒体一起温育时具有线粒体活性-提高特性,这不是许多鉴定和表征的其它含硒化合物的情况。例如,如在表7中所示,当使用Seahorse设备评价,3种含硒化合物(例如, LTGSe-MAFR ($C_{35}H_{59}N_{10}O_9Se$) (#7); 谷氨酰基硒代半胱氨酸 ($C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$) (#10); 和酵母pH 6.0 (#25) 显示对线粒体活性的负性作用。

[0416] 特别是,令人惊奇地发现分享整个结构的某些相似性的几种含硒化合物显示有关激活线粒体活性的截然不同结果。例如,谷氨酰基硒代半胱氨酸 ($C_{16}H_{26}N_{24}O_{10}Se_2$) (#10) 降低ATP合成(状态III)达几乎19%,甚至其整体结构类似于/不明显不同于增加ATP合成达17.3%的甲基硒代腺苷 ($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9);在这两个存在于富硒酵母(见表7)的含硒化合物之间对线粒体活性的作用大于约36%。因此,在一些实施方案中,本申请提供包含两种或更多种含硒化合物(例如,水溶性部分的富硒酵母,非水溶性部分的富硒酵母,存在于富硒酵母和/或从中衍生的含硒化合物)的组合物,其合并以生成包含所需特异性线粒体活性提高能力的组合物。

[0417] 实施例8

存在于含有2%或更少无机硒的富硒酵母中的分离的含硒化合物显著增加丙酮酸脱氢酶复合物活性和线粒体复合物I活性

在开发本申请的实施方案期间进行的实验发现和表征(例如,使用线粒体生物能量)存在于富硒酵母中的含硒化合物,其在分离时,显示能够正性调节能量代谢(例如,增加线粒体呼吸和/或线粒体ATP生产)的生物学活性(见实施例1和7)。例如,如本文所述的,两种含硒化合物LVSe-MR ($C_{22}H_{44}N_7O_5Se$) (#6) 和甲基硒代腺苷 ($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9),在浓度为

500ppb时,可显著增加线粒体生物能量特性。

[0418] 因此,在开发本申请的实施方案期间进行额外的实验以进一步表征从富硒酵母分离的和/或衍生的含硒化合物改变线粒体活性的能力。例如,使用甲基硒代腺苷($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9)的进一步的实验在下文描述。

[0419] 为测量丙酮酸脱氢酶复合物(PDHC)活性以及线粒体复合物I活性,使用聚蔗糖密度梯度方法从成年SD大鼠分离皮层线粒体。以4个浓度范围(0、50、500和1000 PPB)测试甲基硒代腺苷。各个化合物与线粒体(60mg线粒体蛋白/孔)的共同温育按一式三份,在100ml测定系统中,使用标准技术在96-孔荧光板读出仪进行所有的分析。

[0420] 在0、50、500和1000份/每1,000,000,000 (PPB)的或者甲基硒代腺苷($C_{11}H_{15}N_5O_3Se$) (#9),或者对照化合物甲基硫基腺苷 (#31)的存在下,线粒体酶活性显示于图41中。与在甲基硒代腺苷的不存在下无PDHC酶活性比较,化合物#9 (0-1000 PPB)显著地提高PDHC酶活性~ 30-57%,这取决于浓度(在1000PPB的浓度下, $p < 0.05$)。用测试的浓度未检测出复合物IV酶活性的变化。甲基硫基腺苷不改变PDHC、复合物I或复合物IV活性。

[0421] 这些实验已证明甲基硒代腺苷增加线粒体复合物I和PDHC活性。因此,在一些实施方案中,本申请提供包含含硒化合物(例如,在实施例1中鉴定)的组合物(例如,药用组合物)。在一些实施方案中,本申请提供在受试者中增加PDHC酶活性和/或增加线粒体复合物I活性的方法,其包括给予有此需要的受试者(例如,II型糖尿病受试者)有效量的组合物(例如,药用组合物),所述组合物包含给予受试者含硒化合物(例如,在实施例1中描述的),以便在受试者(例如,在骨骼肌和或肝)中增加线粒体复合物I和/或PDHC活性(例如,由此增加线粒体呼吸)。

[0422] 实施例9

存在于含有2%或更少无机硒的富硒酵母中的分离的含硒化合物显著地增加抗氧化效力和线粒体活性

在开发本申请的实施方案期间进行的实验发现,某些分离的、存在于富硒酵母内或从中衍生的含硒化合物升高线粒体活性(例如,增加ATP生产,增加线粒体复合物I活性和/或PDHC活性)(见实施例1、6-8)。因此,进行额外的实验以进一步表征本文公开的和所述的含硒化合物(例如,以鉴定所述化合物的生物活性(如果有任何活性的话)(例如,刺激活性、抑制活性、协同活性、拮抗活性等(例如,以鉴定显示对线粒体活性的所需作用的含硒化合物)))。

[0423] 由于几种本申请的含硒组合物显示出增强线粒体复合物I活性的能力的事实,进行实验以确定线粒体刺激是否可通过用含硒化合物除去损害的活性氧(ROS)而发生。因此,实验在开发本申请的实施方案期间进行,以评价含硒化合物的抗氧化剂效力。

[0424] 因此,基于药剂盒的抗氧化测定(利用氧自由基吸收能力(ORAC)以鉴定具有/显示抗氧化效力的本申请的含硒化合物。在所用的ORAC测定药剂盒(BioTek , VT, USA)中, Trolox的抗氧化特性是涉及一系列物质的抗氧化能力的标准。因此,ORAC结果通常称为Trolox等价物(Trolox Equivalents) (TE),如从与Trolox校正曲线比较中计算的。在进行的分析中,栎精(一种已知的强效抗氧化剂)作为内部参考标准品被包括在内。

[0425] 简言之,使用Trolox测定药剂盒,根据生产商的指示,分析含硒化合物的样品(例如,在实施例1中鉴定的)。化合物可单独或组合(在范围从0.05至5 μ M的浓度下)测试以检测

潜在的协同作用、拮抗或纯粹的相加作用。代表性的结果示于表8中。

化合物	TE 值	标精 TE	理论 相加作用	协同比 Exp/Theor
#3 L-甲基硒代半胱氨酸	1.075	6.451	4.014	1.72
#26 硒代腺苷基同型半胱氨酸	2.939			
#3 + #26	6.899			
#9 甲基硒代腺苷	0.722	3.87	1.95	1.2
#4 硒代甲硫氨酸	1.228			
#9 + #4	2.332			
#26 硒代腺苷基同型半胱氨酸	2.012	3.222	2.961	-1.14
#39 γ 谷氨酰基甲基半胱氨酸	0.949			
#26 + #39	2.592			

[0426] 表8:各种含硒化合物的抗氧化活性

如在表8中的数据所指出的,已发现一些含硒化合物具有/显示抗氧化能力(例如,阳性TE值)。此外,一些含硒化合物具有/显示相加或轻度协同的抗氧化能力(例如,#9和#4组合);轻度拮抗的抗氧化能力(#26和#39组合)或协同的抗氧化能力(#3和#26组合)(例如,关于氧自由基-清除能力)。在#3和#26组合的情况下,增加为大于这些化合物仅仅相加作用的约70%。

[0427] 本申请提及的所有的出版物和专利通过引用结合到本文中。本申请描述的方法和组合物在不背离本申请的范围和精神的各种修饰和变化的情况下对本领域技术人员而言将是显而易见的。虽然本申请已结合具体优选的实施方案得到描述,应该理解如所要求的本申请不应受这样的具体实施方案的过分限制。事实上,进行本申请描述的所述模式的对相关领域技术人员是显而易见的各种修饰意欲落入随附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 全技术公司

<120> 含硒组合物及其治疗和预防与线粒体功能障碍有关的疾病或病症的应用

<130> 00076.0008WOU1

<140> PCT/US2014/029328

<141> 2014-03-14

<150> US 61/788,133

<151> 2013-03-15

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 1

Met Val Ala Glu Ala Glu Lys

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 2

Asp Tyr Met Gly Ala Ala Lys

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 3

Tyr Met Gly Ala Ala Lys

1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 4

Glu Leu Gln Asp Ile Ala Asn Pro Ile Met Ser Lys

1 5 10

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 5

Asn Gln Ala Ala Met Asn Pro Ser Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys

1 5 10 15

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 6

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

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 7

Met Val Ser Glu Ala Glu Lys

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 8

Pro Glu Val Gln Gly Asp Met Lys

1 5

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 9

Glu Leu Gln Asp Ile Ala Asn Pro Ile Met Ser Lys

1 5 10

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 10

Ala Met Ser Ser Arg

1 5

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 11

Val Gln Gly Ser Val Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Ala

1 5 10 15

Val Ala Ile Met Glu Gly Lys

20

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 12

Ala Ala Ala Glu Gly Pro Met Lys

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 13

Leu Thr Gly Met Ala Phe Arg

1 5

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 14

Pro Phe Val Ser Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Val Lys

1 5 10

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 15

Ala Phe Gly Ile Glu Glu Gly Leu Met Thr Thr Val His Ser Leu Thr

1	5	10	15
Ala Thr Gln Lys			
20			
<210> 16			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 酵母			
<400> 16			
Pro Phe Ile Thr Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys			
1	5	10	
<210> 17			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 酵母			
<400> 17			
Pro Gly Met Val Val Thr Phe Ala Pro Ala Gly Val Thr Thr Glu Val			
1	5	10	15
Lys			
<210> 18			
<211> 24			
<212> PRT			
<213> 酵母			
<400> 18			
Val Glu Thr Gly Val Ile Lys Pro Gly Met Val Val Thr Phe Ala Pro			
1	5	10	15
Ala Gly Val Thr Thr Glu Val Lys			
20			
<210> 19			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 酵母			
<400> 19			
Ala Ala Ala Thr Ala Ala Met Thr Lys			
1	5		
<210> 20			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 酵母			
<400> 20			

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

Met Arg

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 21

Trp Met Gly Lys

1

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 22

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

Met Arg

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 23

Ala Met Pro Gln Lys

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 24

Ala Ala Met Ala Lys

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 25

His Val Gly Asp Met Glu Ile Arg

1 5

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 26

Val Ile Glu Glu Pro Ile Thr Ser Glu Thr Ala Met Lys

1 5 10

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 27

Val Leu Gln Ala Leu Glu Glu Ile Gly Ile Val Glu Ile Ser Pro Lys

1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 28

Leu Pro Ala Ala Ser Leu Gly Asp Met Val Met Ala Thr Val Lys

1 5 10 15

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 29

Ala Gly Met Thr Thr Ile Val Arg

1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 30

Met Leu Met Pro Lys

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> 酵母

<400> 31
Thr Met Gly Ala Lys
1 5
<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 酵母
<400> 32
Met Asn Ala Gly Arg
1 5
<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 酵母
<400> 33
Thr Tyr Glu Asn Met Lys
1 5
<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 酵母
<400> 34
Met Gly His Asp Gln Ser Gly Thr Lys
1 5
<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 酵母
<400> 35
Gly Glu Ala Ile Met Ala Pro Lys
1 5
<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 酵母
<400> 36
Met Asn Val Phe Gly Lys
1 5
<210> 37

<211> 9
<212> PRT
<213> 酵母
<400> 37
Ala Met Glu Val Val Ala Ser Glu Arg
1 5
<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> 酵母
<400> 38
Ile Val Met Arg
1
<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> 酵母
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> X=I or L
<400> 39
Met Ala Xaa Arg
1
<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 酵母
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> X should be any amino acid
<400> 40
Ala Met Xaa Ala Lys
1 5
<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 酵母

<400> 41
 Asp Leu Glu Thr Leu Thr Met His Thr Lys
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 酵母
 <400> 42
 Leu Val Met Arg
 1
 <210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 酵母
 <400> 43
 Leu Thr Gly Met Ala Phe Arg
 1 5
 <210> 44
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 酵母
 <400> 44
 Ser Arg Pro Asn Val Glu Val Val Ala Leu Asn Asp Pro Phe Ile Thr
 1 5 10 15
 Asn Asp Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys
 20 25
 <210> 45
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 酵母
 <400> 45
 Val Ile Asn Asp Ala Phe Gly Ile Glu Glu Gly Leu Met Thr Thr Val
 1 5 10 15
 His Ser Leu Thr Ala Thr Gln Lys
 20
 <210> 46
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 酵母

<400> 46

Met Arg Phe Ala

1

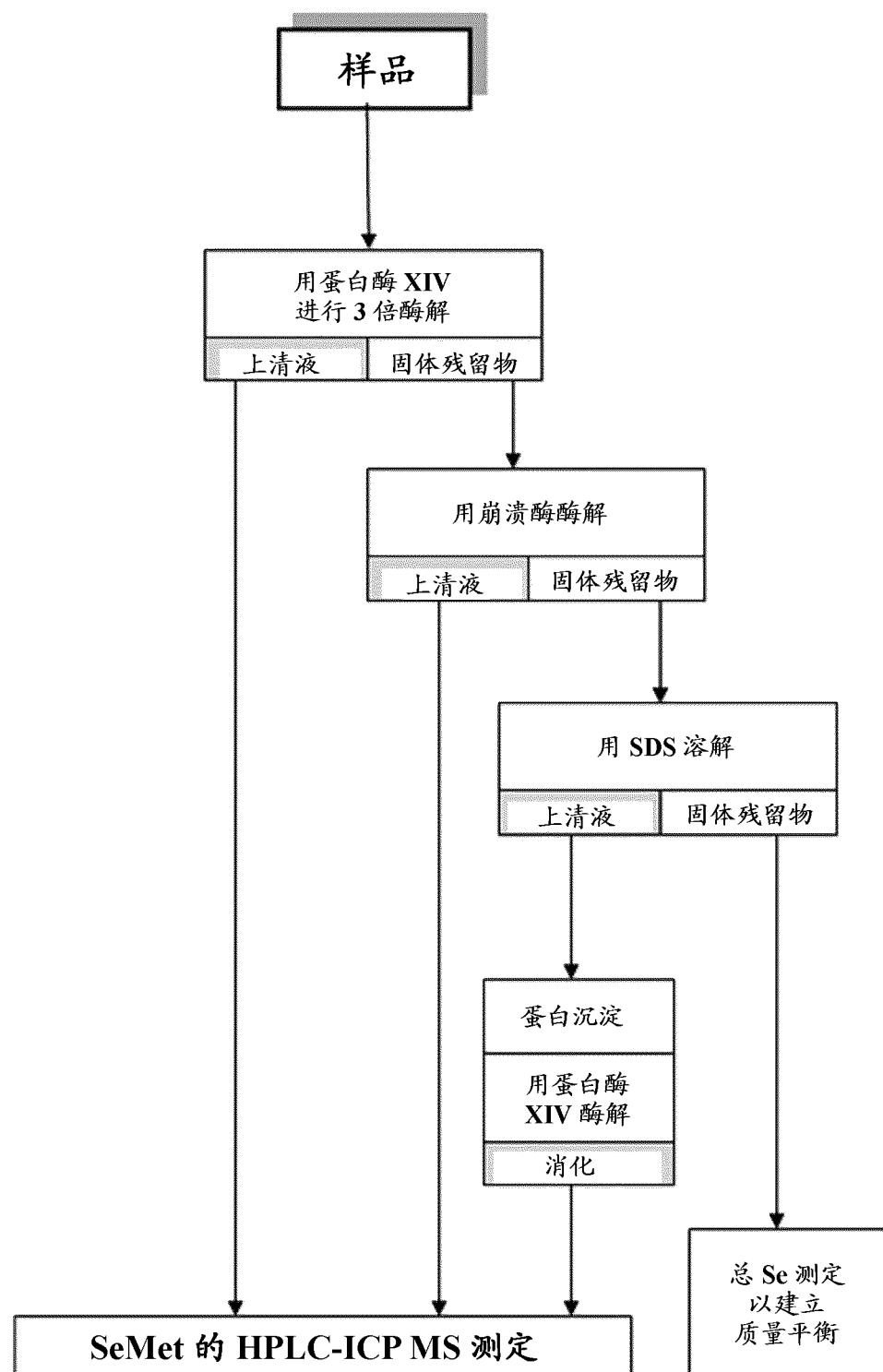
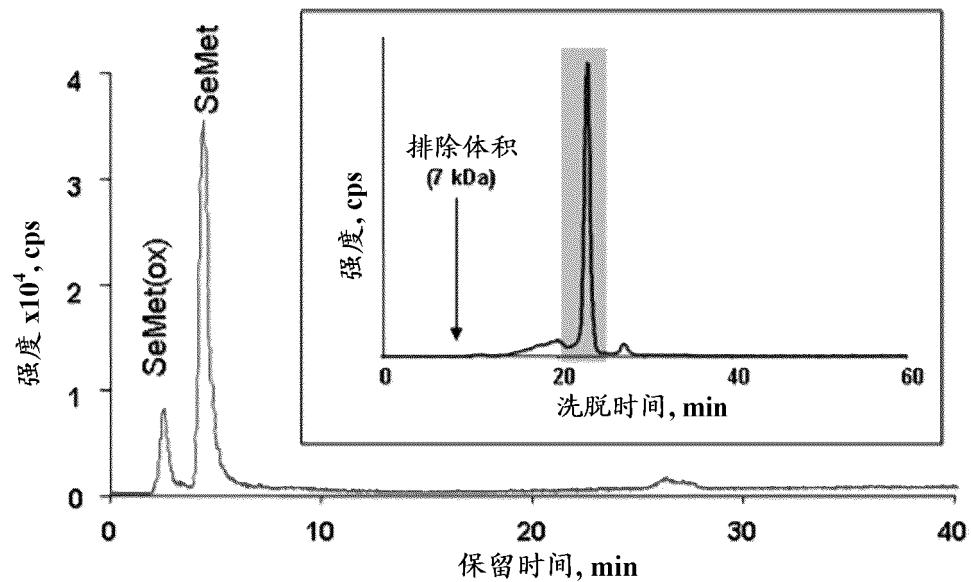


图 1



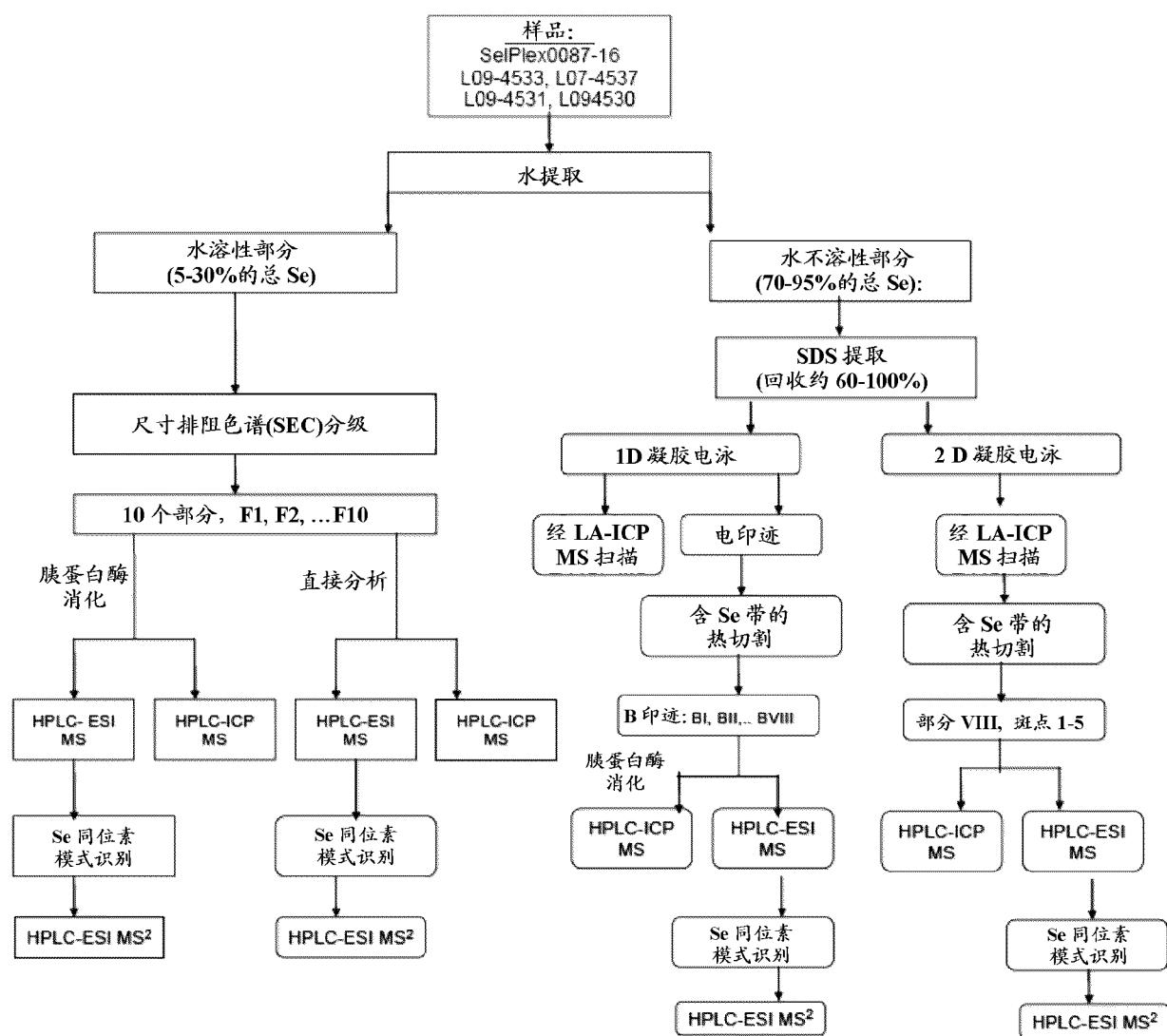


图 3

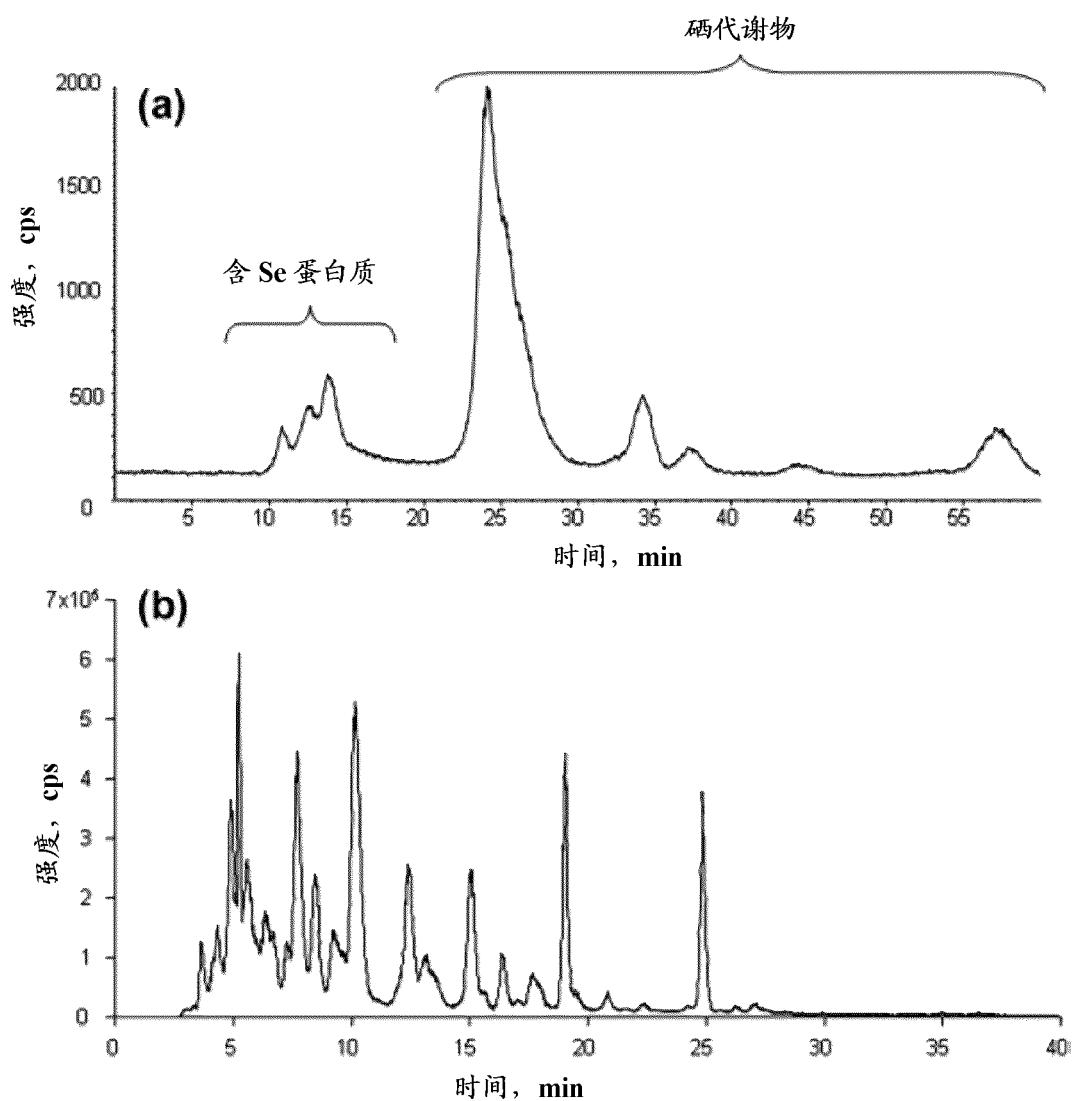


图 4

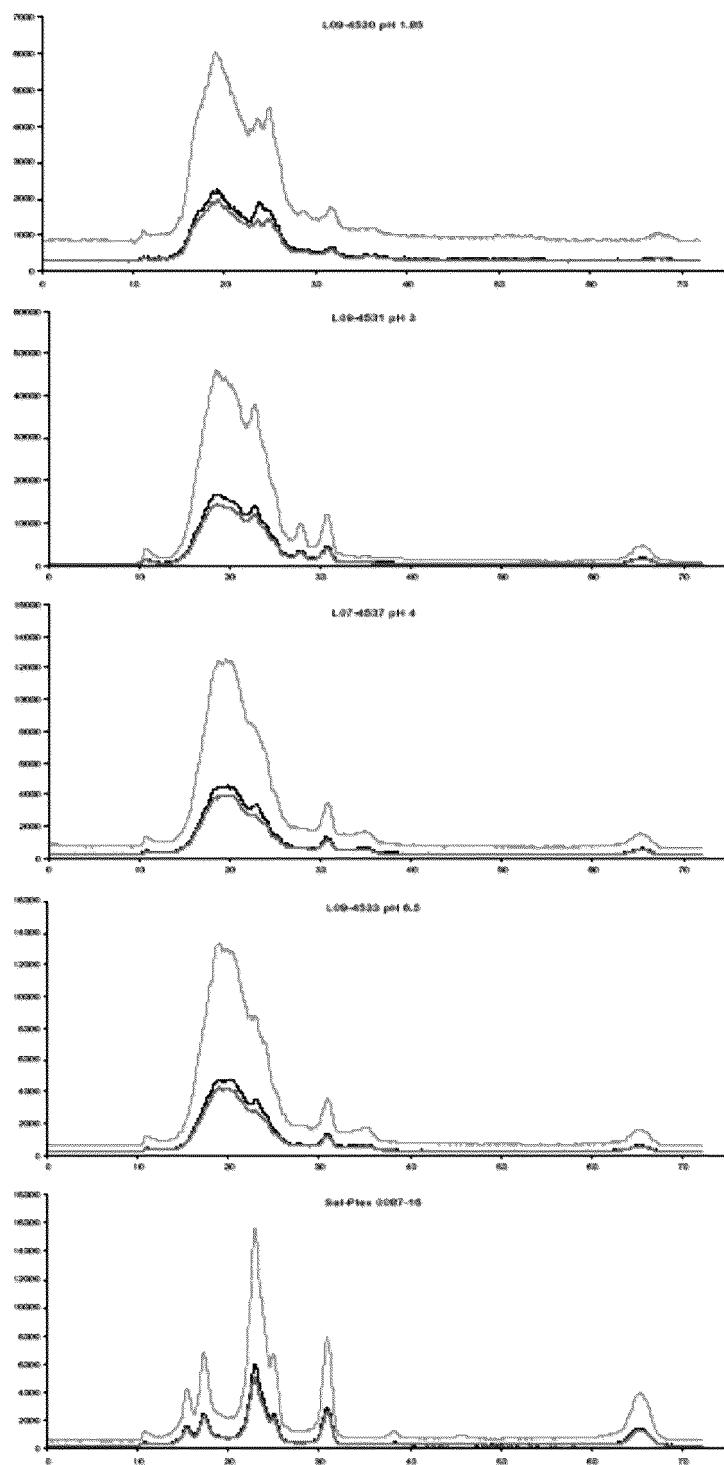


图 5

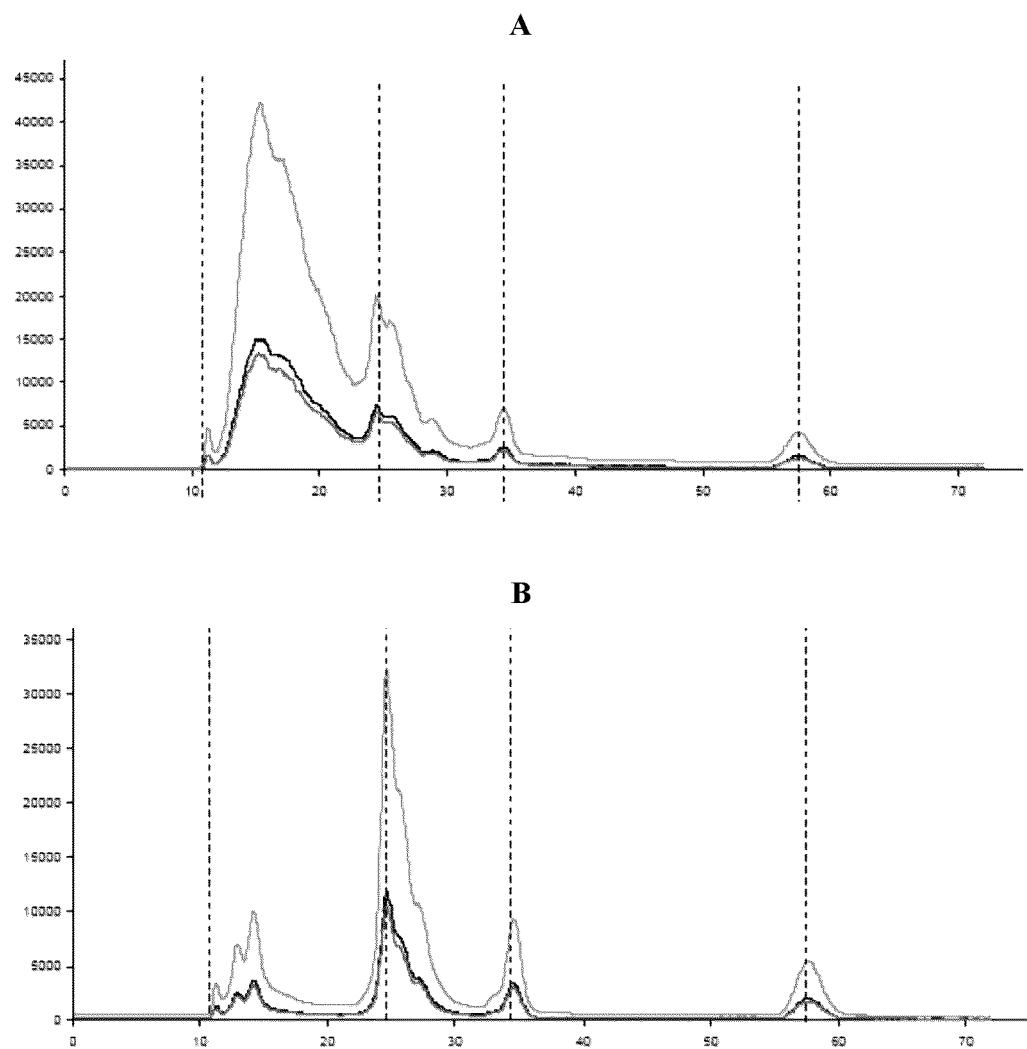


图 6

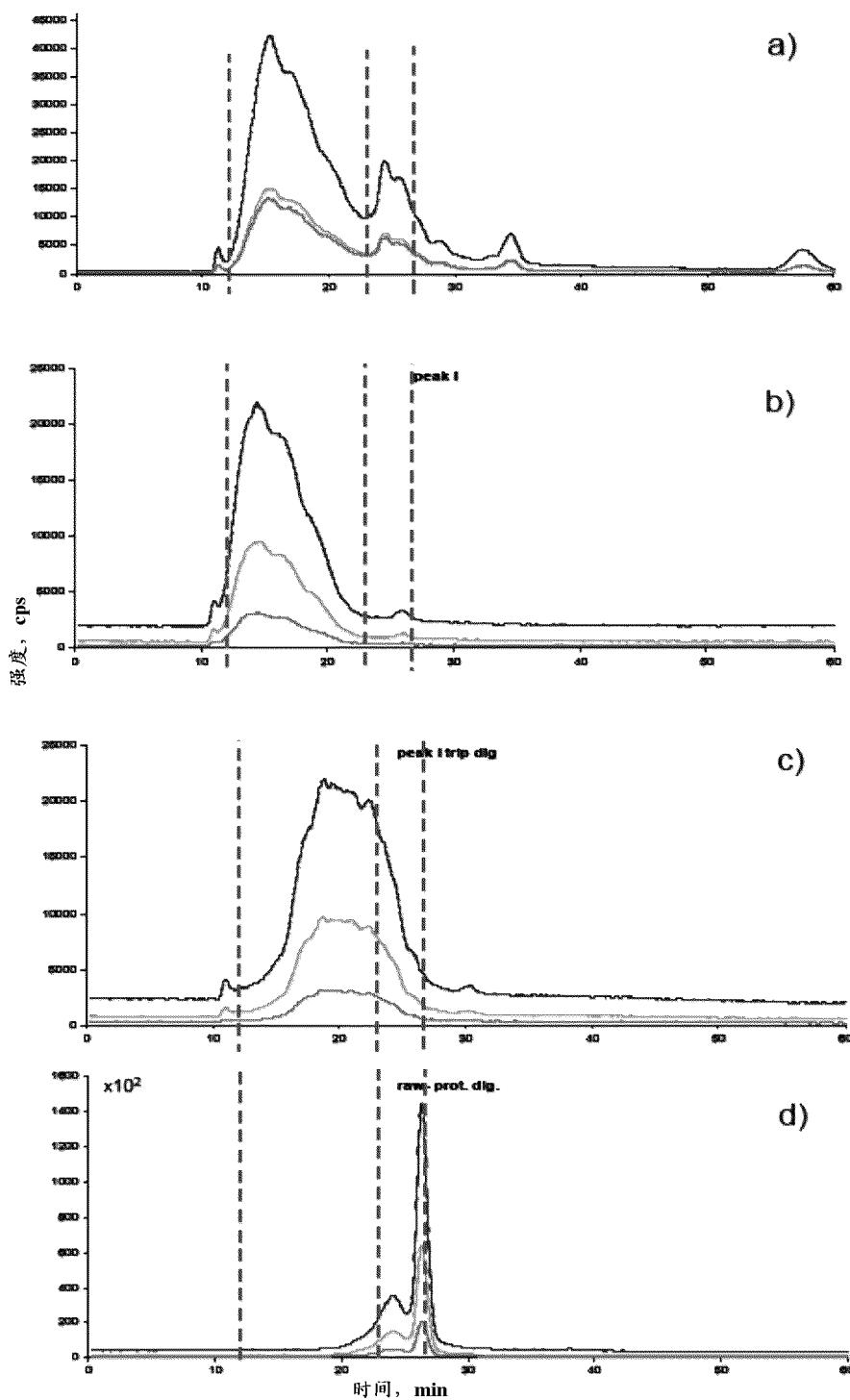


图 7

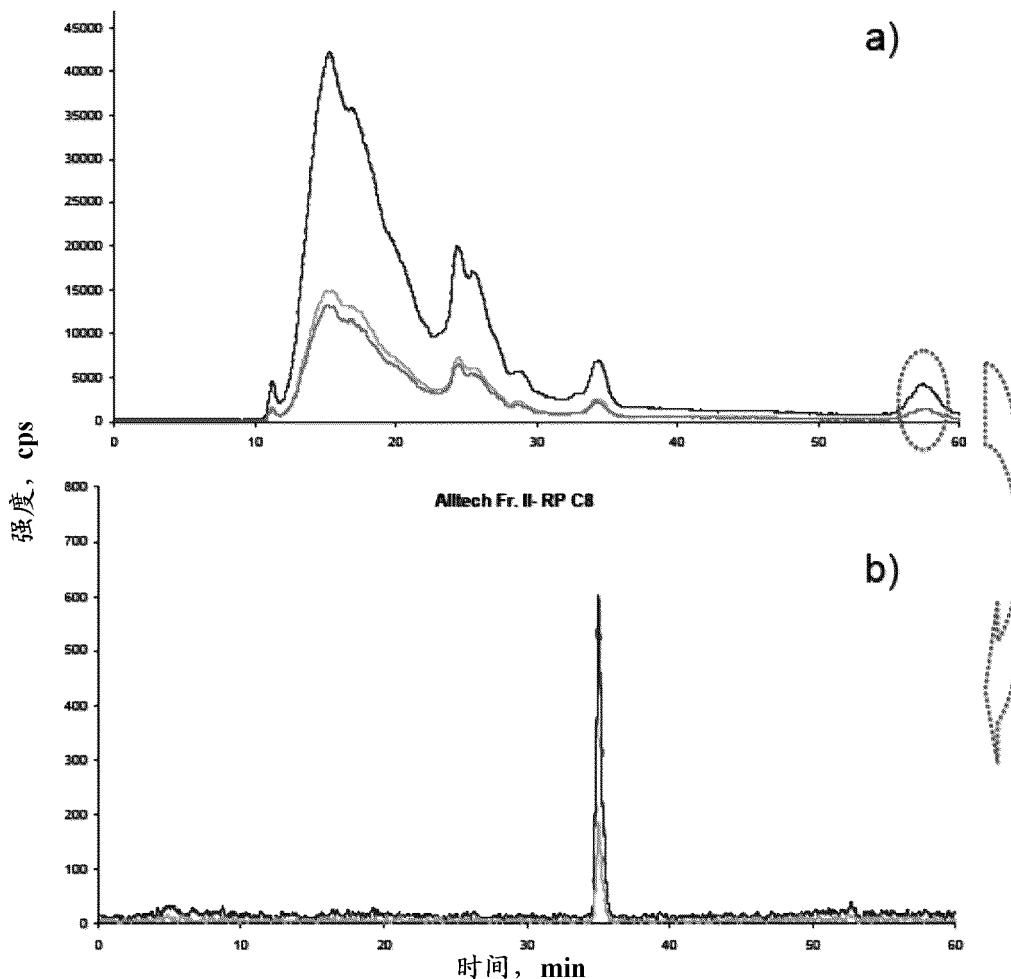


图 8

图 9

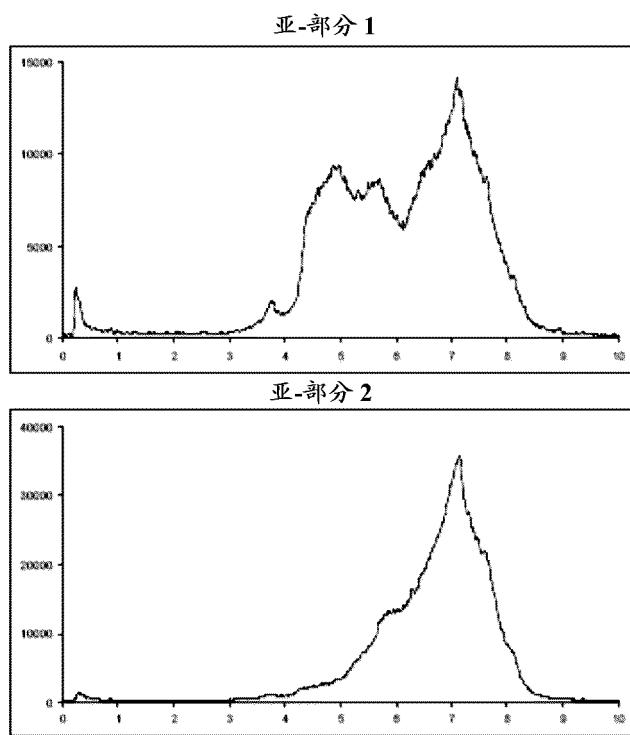
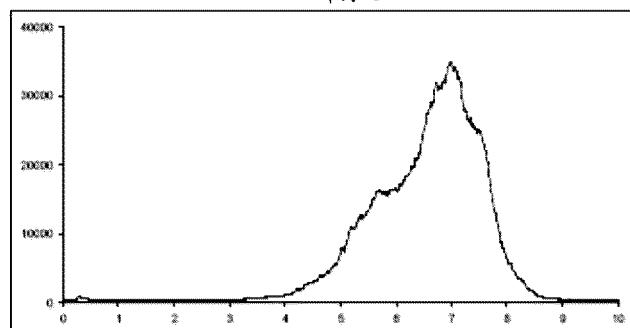
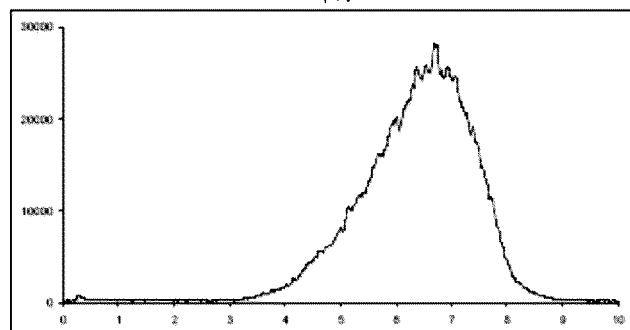


图 10

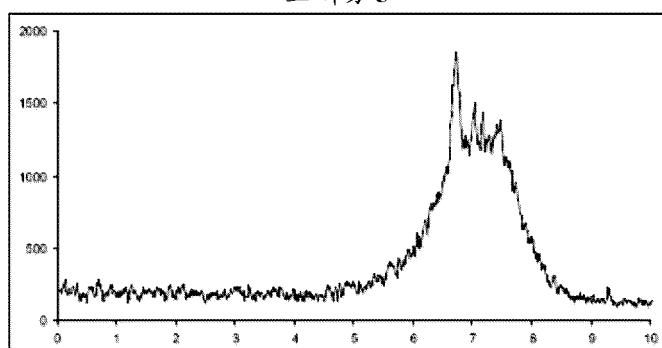
亚-部分 3



亚-部分 4



亚-部分 5



亚-部分 6

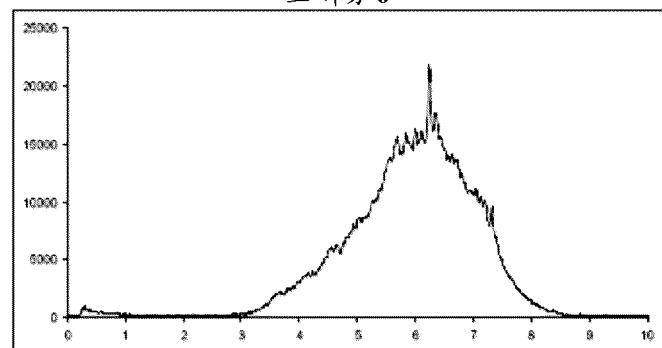


图 10续

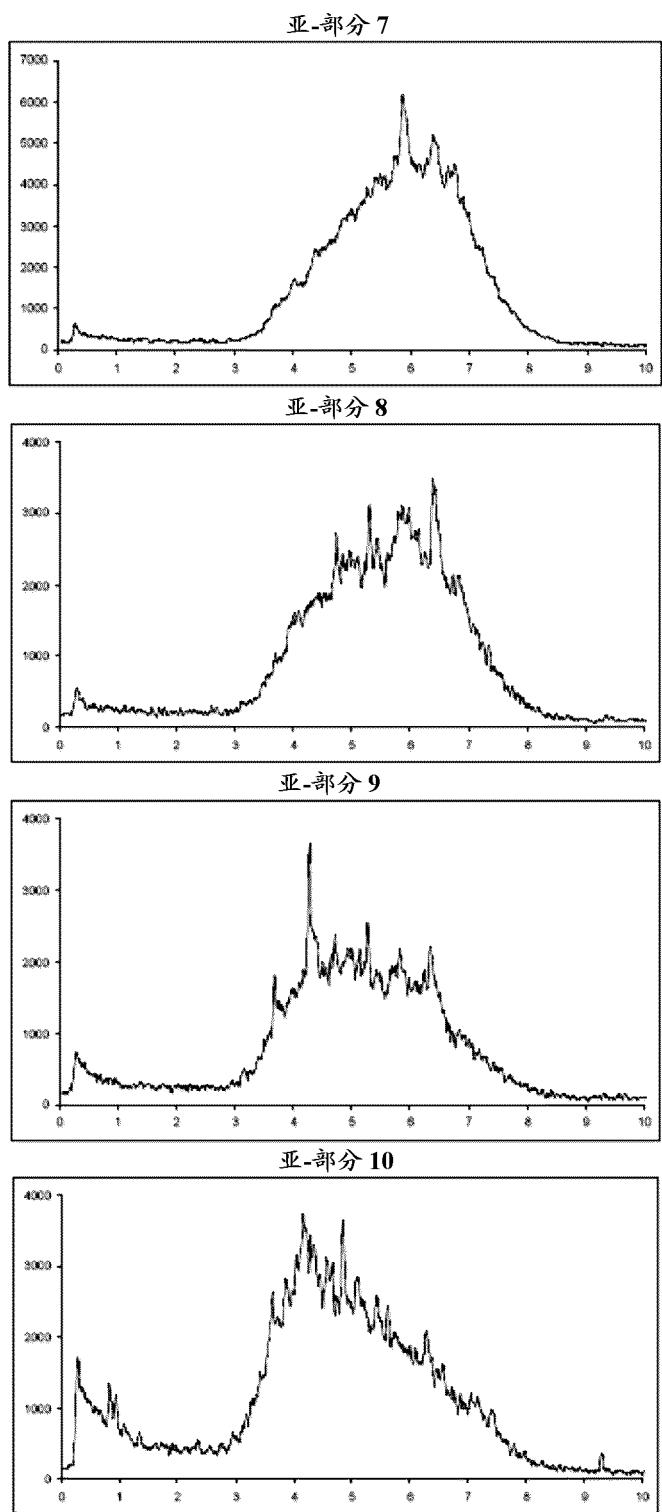


图 10续

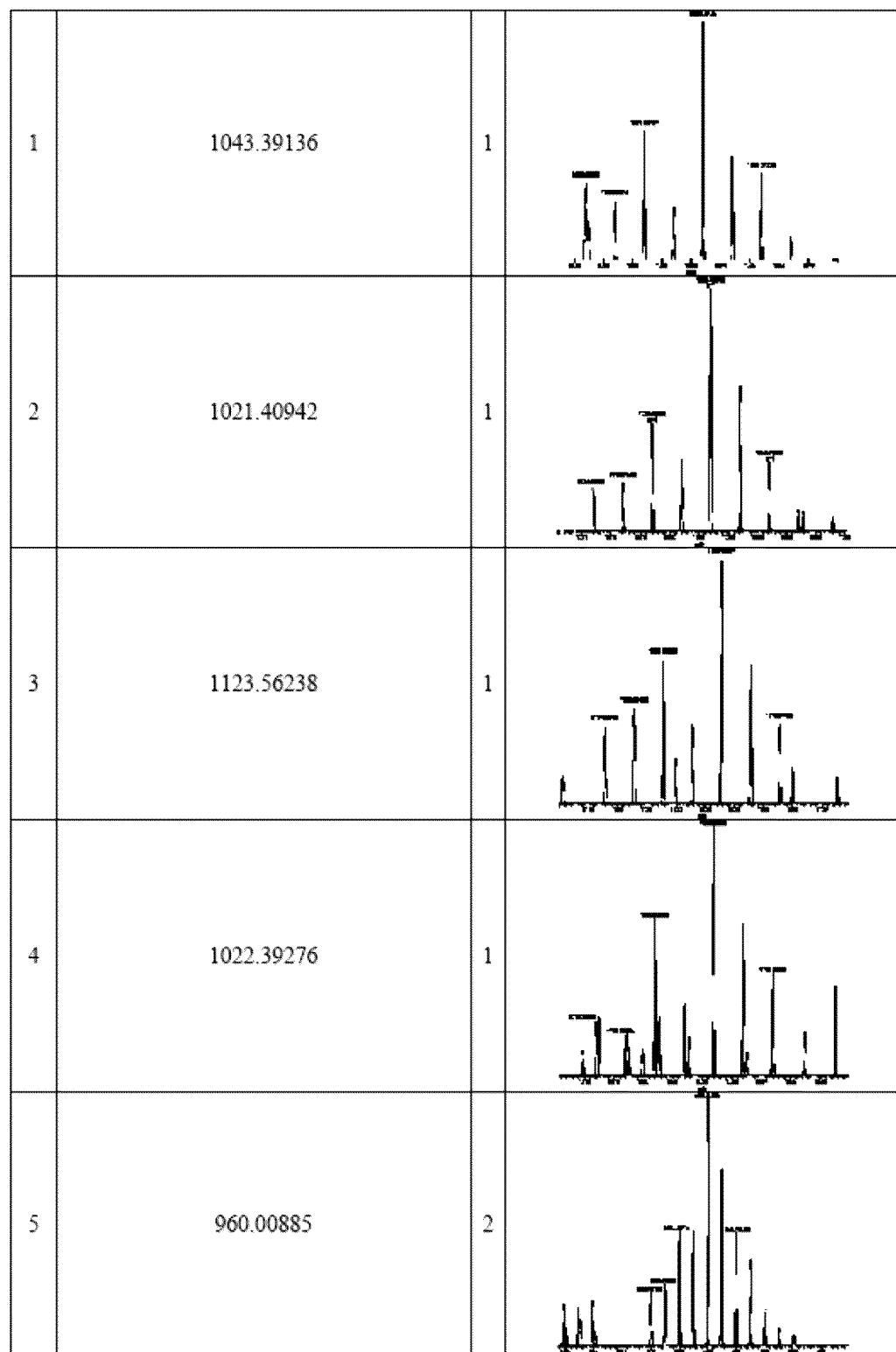


图 11

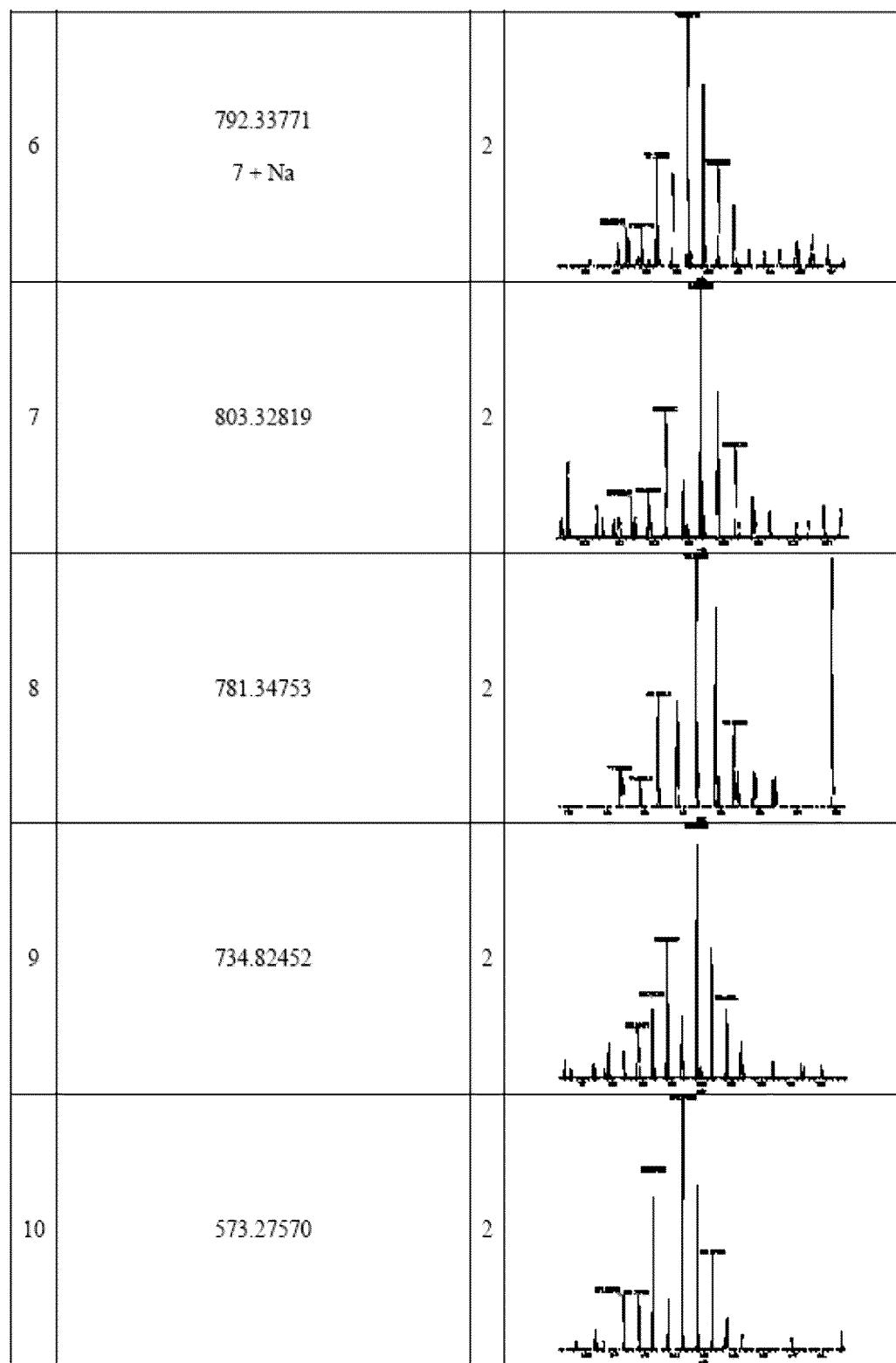


图 11续

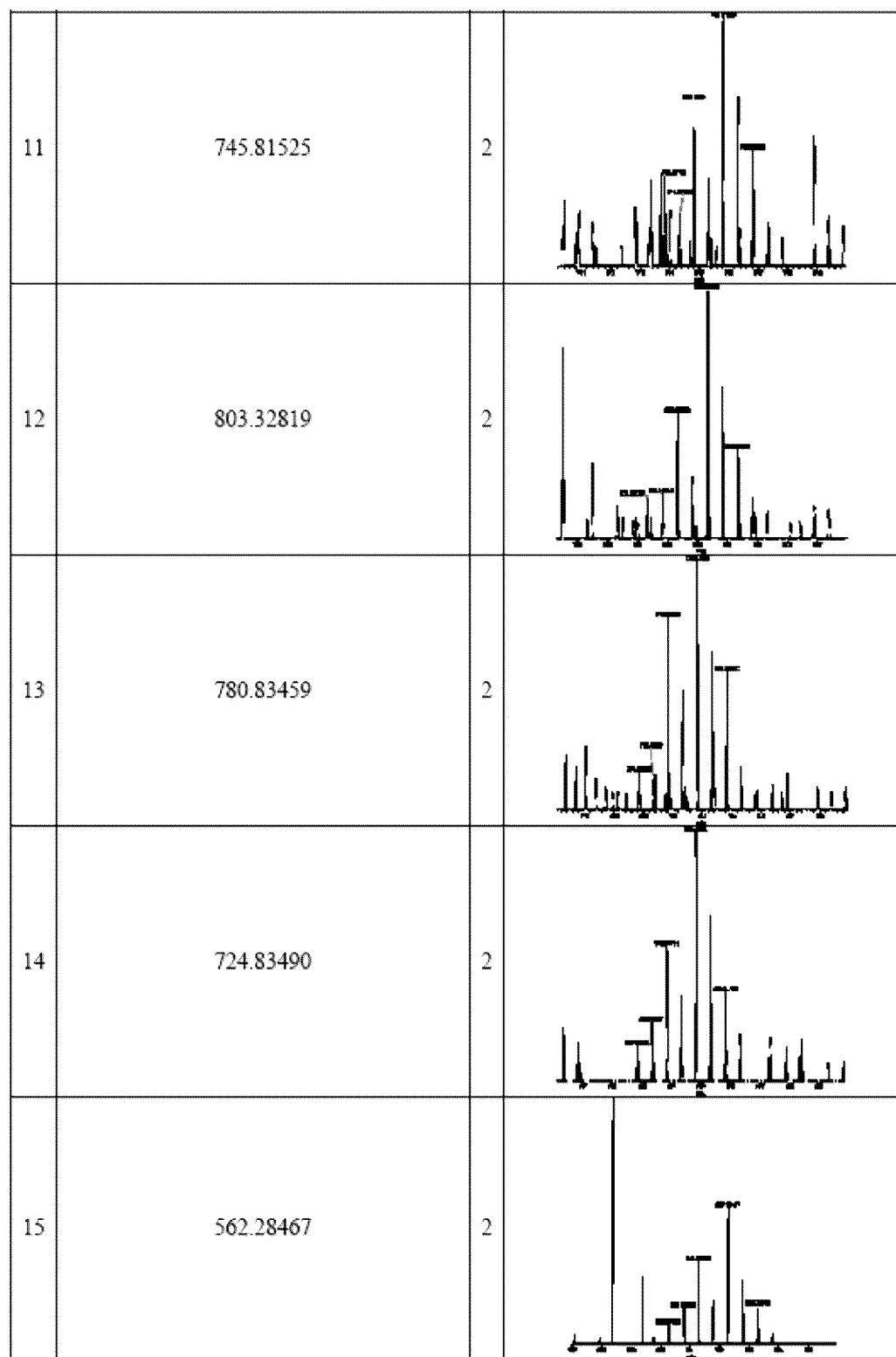


图 11续

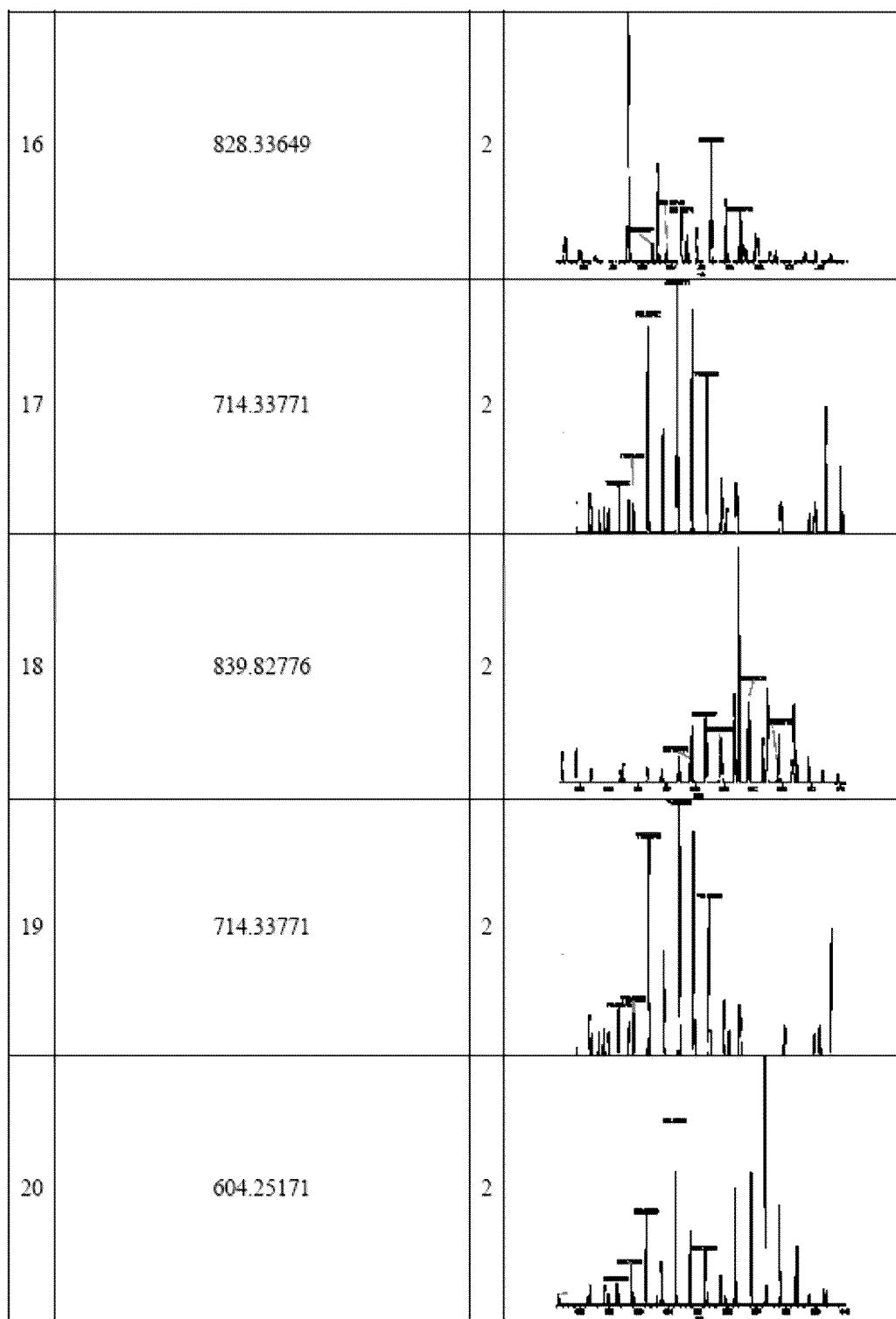


图 11续

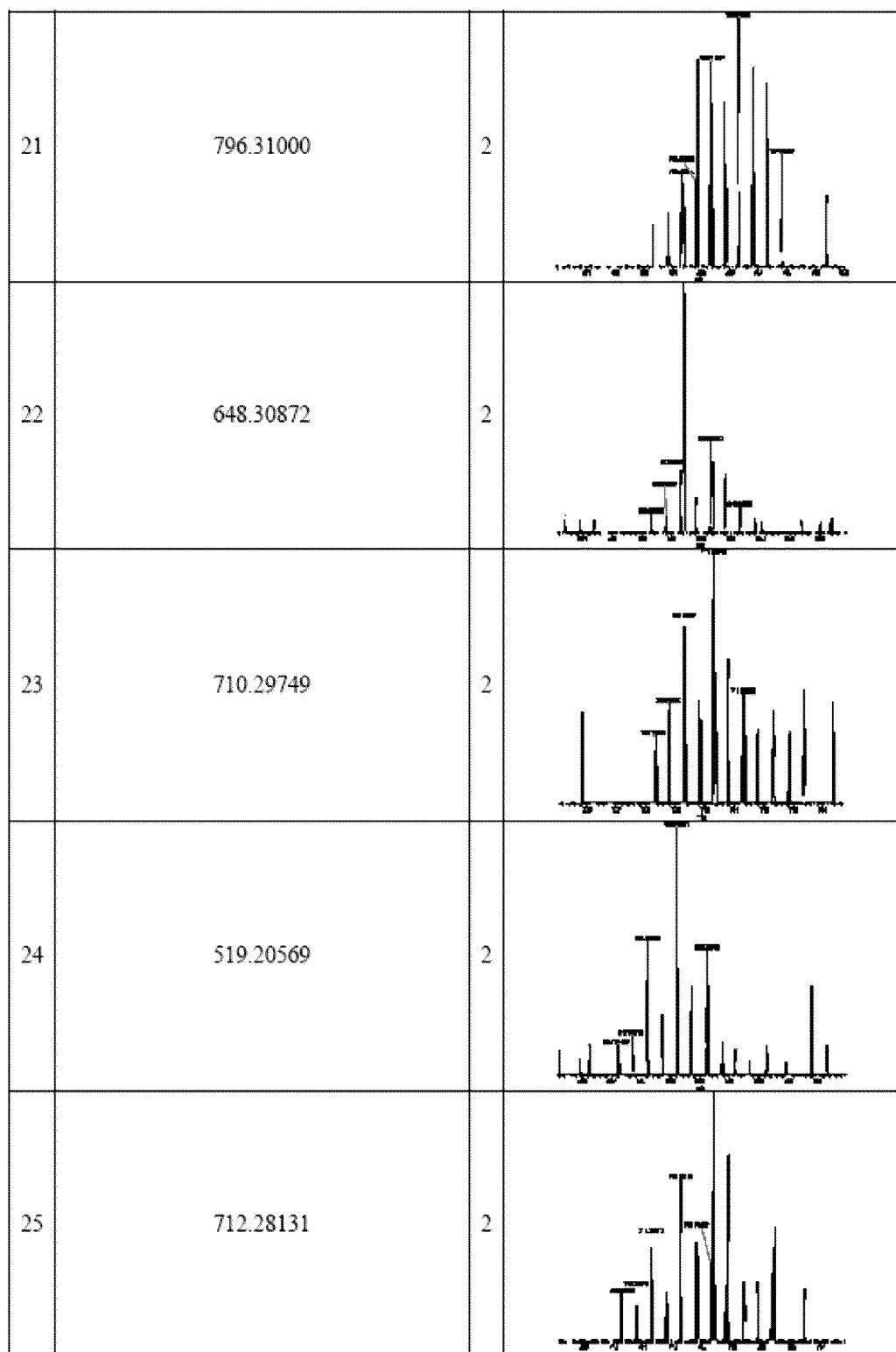


图 11续

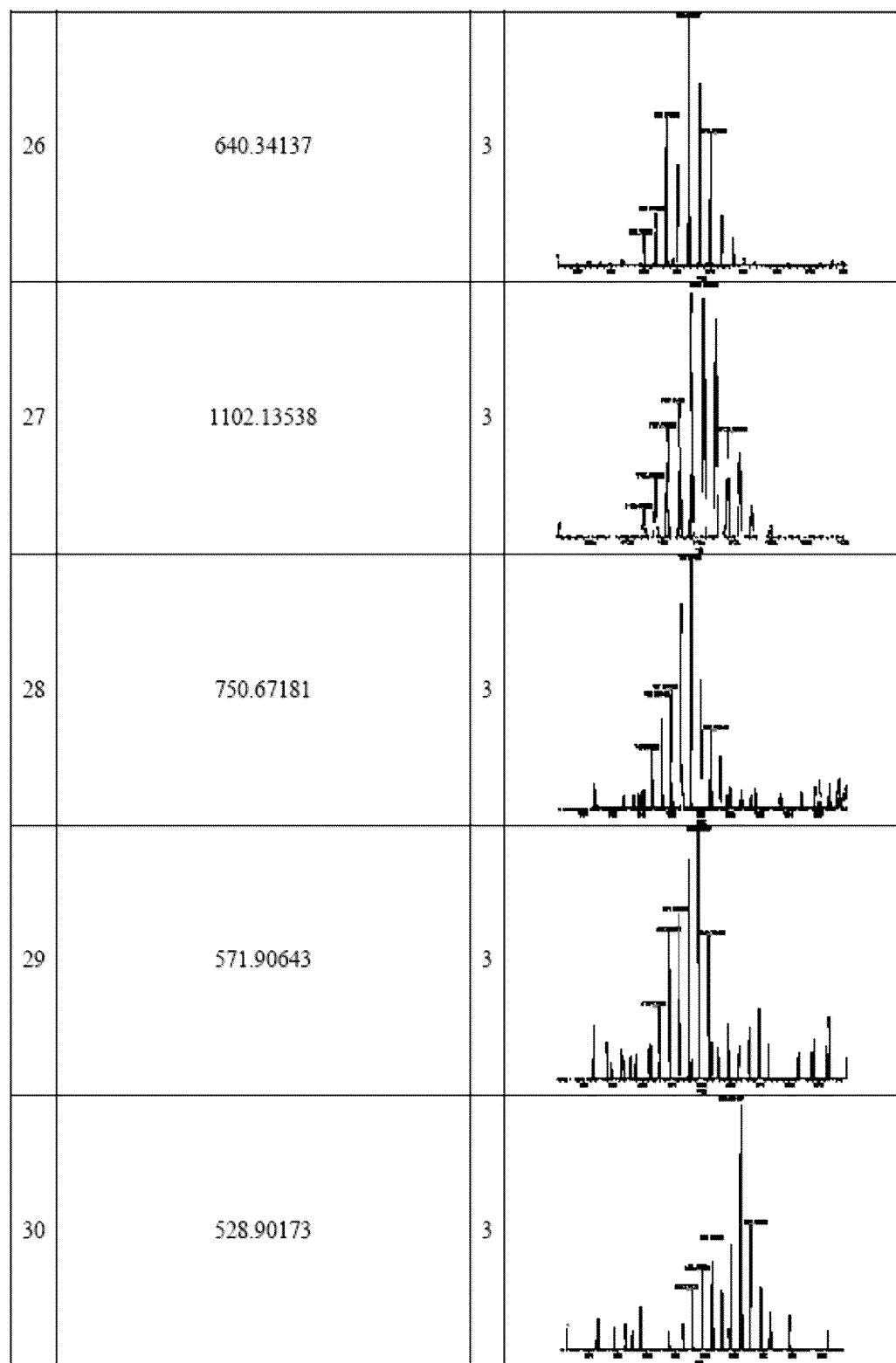


图 11续

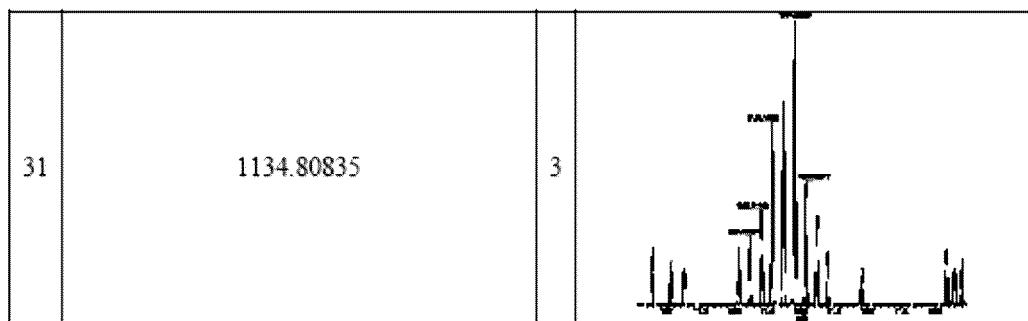
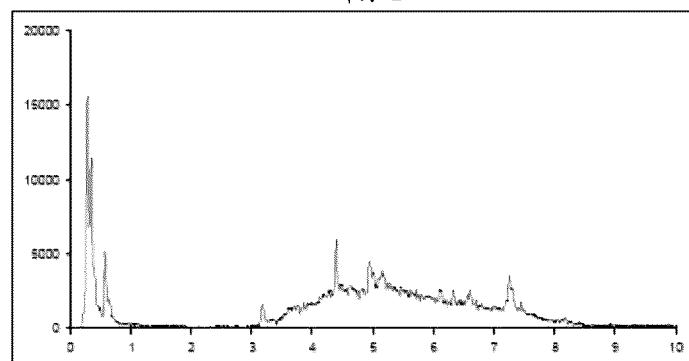
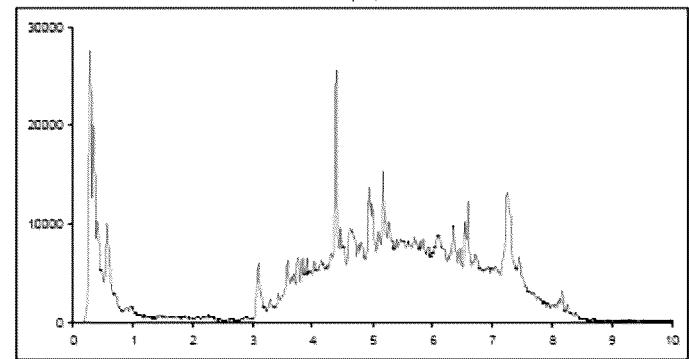


图 11续

亚-部分 1



亚-部分 2



亚-部分 3

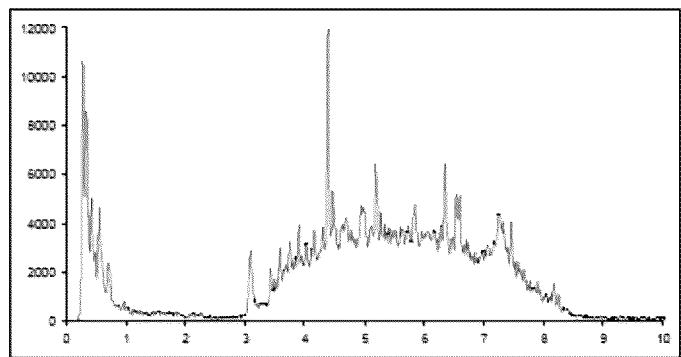


图 12

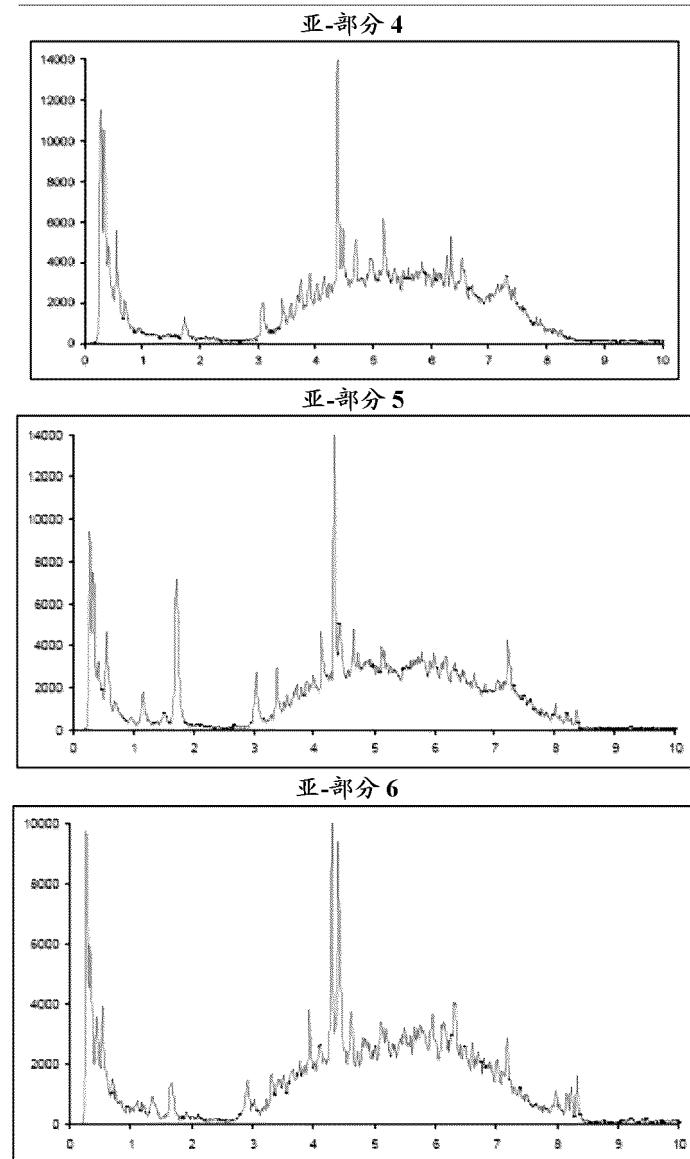
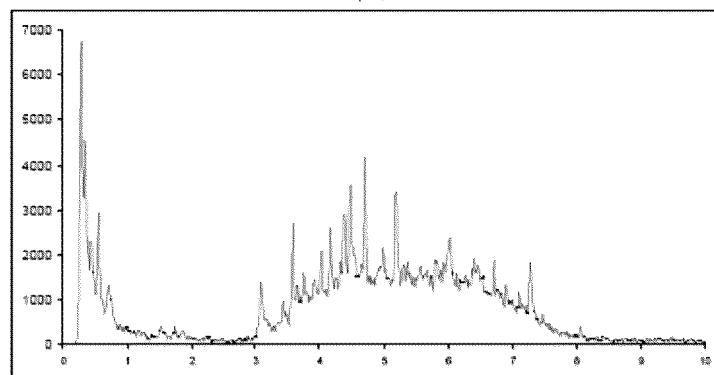
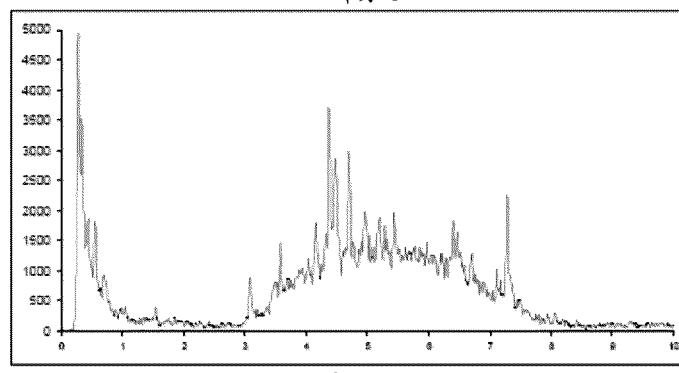


图 12续

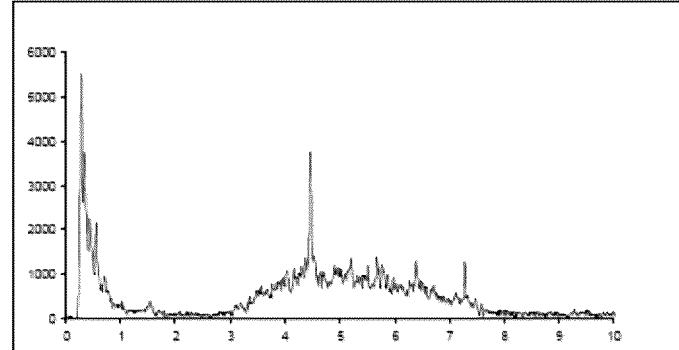
亚-部分 7



亚-部分 8



亚-部分 9



亚-部分 10

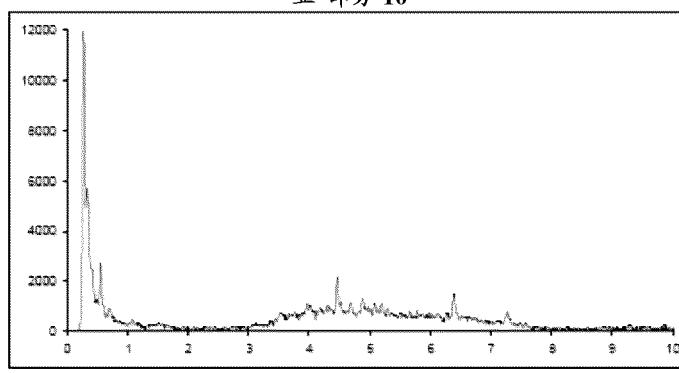


图 12续

	MW (理论值)	MW (实测值)	肽序列	Z	蛋白鉴定	存在于亚-部分的化合物
1	825.32400	825.32611	MVAEEAK	1	HSP70 (热休克蛋白 70)	T2, T3, T5, T6
2	803.28210	803.28448	DYMGAAK	1	HSP12 (热休克蛋白 12)	T2, T3, T4, T5, T6
3	688.25520	688.25653	YMGAAK	1	HSP12	T5, T6
4	703.82559	703.82629	ELQDIANPIMSK	2	HSP70 Ss1p (热休克蛋白 70)	T2, T5,
5	1655.6931	1655.6972	NQAAAMNPSNTVFDAK	2	HSP70 Ss1p (热休克蛋白 70)	T6
6	799.8695	799.87097	NFTPEQISSMVLGK	2	HSP SSA1 (热休克蛋白 SSA1)	T2, T5,
7	1598.7332	1598.7338	NFTPEQISSMVLGK	2	HSP SSA1 (热休克蛋白 SSA1)	T2, T3, T4
8	841.31890	841.32074	MVSEAEK	1	HSP SSA2 (热休克蛋白 SSA2)	T2, T5,
9	951.36690	951.36835	PEVQGDMK	1	SSA1 or SSA2	T2, T3
10	1406.6433	1406.6450	ELQDIANPIMSK		Ss1p	T2, T3
11	599.20350	599.20422	AMSSR	1	Ss2p	T5
12	770.04864	770.04810	VQGSVIGIDLGTTNSAVAIMEGK	3	Ss1p	T2
13	822.32430	822.32599	AAAEGPMK	1	TDH1(甘油醛-3-磷酸脱氢酶 1)	T2, T3, T4, T5
14	843.36100	843.36316	LTGMAFR	1	TDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)	T2, T3, T4,
15	1552.6590	1552.6589	PFVSNDYAAVMVK	2	TDH1(甘油醛-3-磷酸脱氢酶 1)	T6

图 13

16	1091.51880	1091.52002	AFGIEEGLMTTVHSLTA TQK	2	GPD3(甘油醛-3- 磷酸脱氢酶)	T5, T6
17	1628.6903	1628.6921	PFITNDYAAAYMFK	2	GPD3(甘油醛-3- 磷酸脱氢酶)	T6
18	1239.64200	1239.64514	PGMVVTFAPAGVTTE K	2	EF1 α (翻译延伸 因子 1- α)	T2
19	2478.2761	2478.2824	VETGVVIKPGMVTFA PAGVTTE VK	2	EF1 α (翻译延伸 因子 1- α)	T2, T3
20	883.37710	883.37915	AAATAAMTK	1	延伸因子 3A	T5
21	944.93745	944.93878	SIVPSGASTGVHEALEM R	2	Enolp (烯醇酶 1)	T2, T5
22	569.1990	569.1997	WMGK	1	Enolp (烯醇酶 1)	T3, T6
23	1888.8670	1888.8690	SIVPSGASTGVHEALEM R	2	Enolp (烯醇酶 1)	T2, T3, T4, T6
24	622.24460	622.24628	AMPQK	1	Yralp	T2
25	539.20750	539.20911	AAMAK	1	Yralp	T2
26	502.70729	502.70691	HVGDMIEIR*	2	Nop4p*	T2
27	748.34379	748.34375	VIEEPITSETAMK	2	60S RP L25(核糖体蛋白)	T2
28	956.43449	956.43091	VLQALEEIGIVEISPK+ iodine	2	Rps19ap	T2
29	776.37185	776.37103	LPAASLGDMVMATVK	2	Rpl23ap	T2
30	896.41077	896.40948	AGMTTIVR	1	RPL3(核糖体蛋白 L3)	T5
31	896.4107	896.4087	AGMTTIVR	1	RPL3(核糖体蛋白 L3)	T2, T4
32	667.27350	667.27521	MLMPK	1	40S 核糖体蛋白 S10-A	T5
33	555.20447	555.20270	TMGAK	1	Fbalp	T2, T3, T4, T5, T6
34	596.20380	596.20404	MNAGR	1	SIP18	T2, T4, T6

35	833.29270	833.29449	TYENMK	1	SIP18	T5
36	504.68551	504.68597	MGHDQSGTK	2	SIP18	T5
37	864.37337	864.37231	GEAIMAPK	1	Hrd3p	T2, T5
38	785.30790	785.30902	Ac-MNVFGK	1	Ctt1p	T5
39	1039.4326	1039.43225	AMEVVASER	1	Lsp1p	T3
40		955.92926		2	待鉴定	
41	566.25480	566.25519	IVMR	1	待鉴定	
42	538.22350	538.22510	MA(NL)R	1	待鉴定	T2, T3, T4
43	581.2564	581.2565	AMXAK	1	Bio2p	T3
44	1236.5378	1236.5374	DLETLMHTK	2	Rpl32p	T3

图 13续

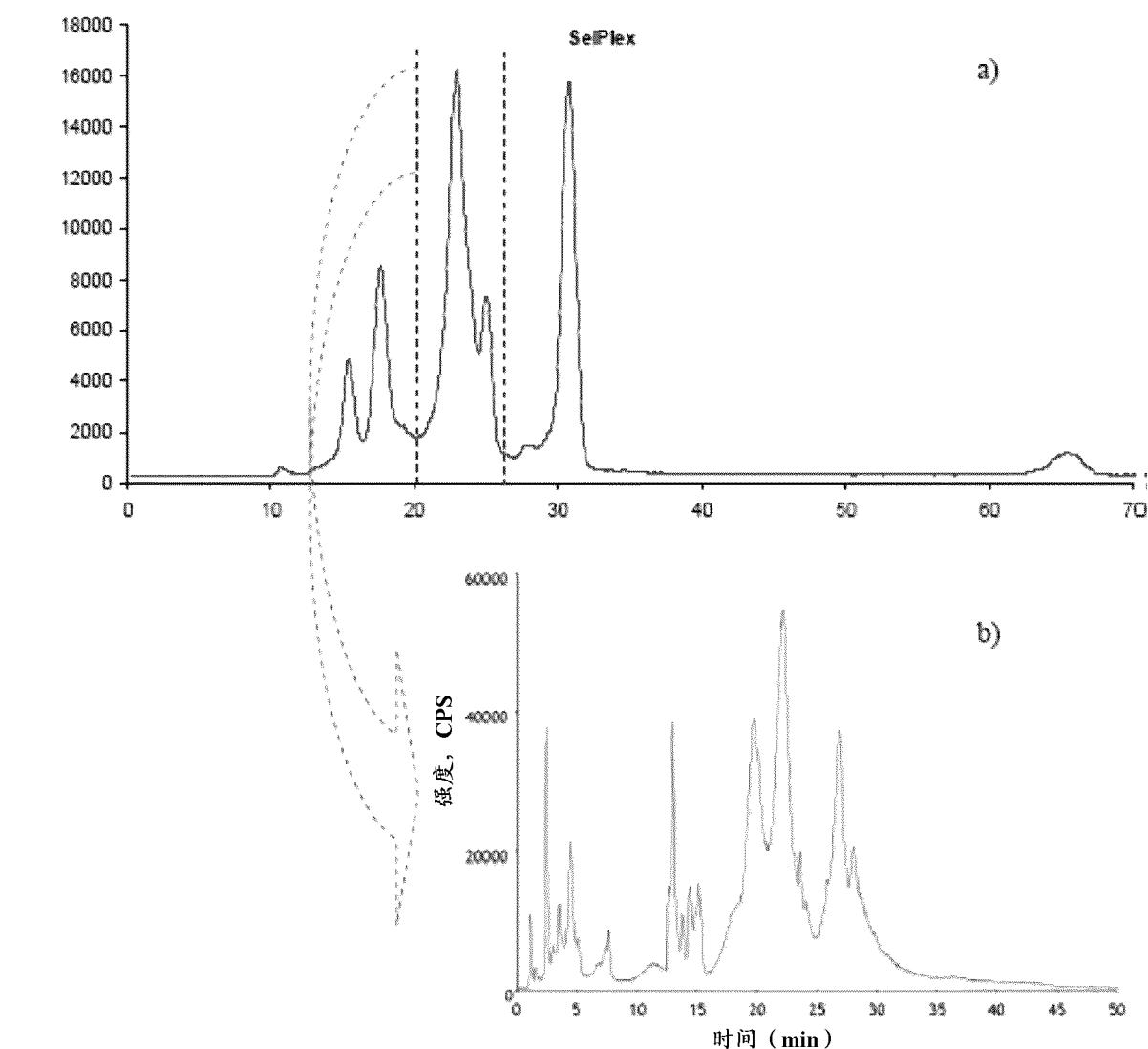


图 14

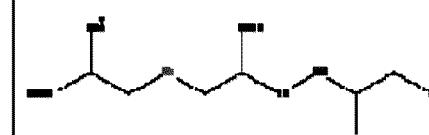
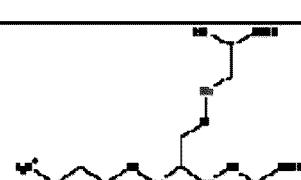
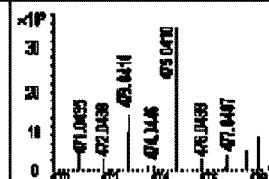
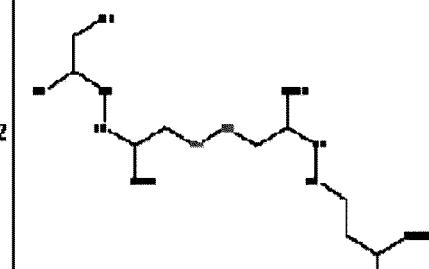
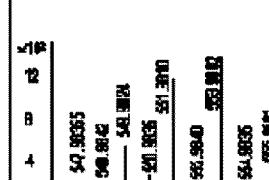
	式	理论质量: [M+H] ⁺	实测质量: [M+H] ⁺	结构	同位素模式
	$C_9H_{17}N_2O_7S_2e^+$	345.0196	345.0204		
	$C_{15}H_{23}N_4O_8S_2e^+$	475.0396	475.0410		
	$C_{14}H_{24}N_4O_{10}S_2e^+$	553.9787	553.9802		

图 15

式	理论质量: [M+H] ⁺	实测质量: [M+H] ⁺	结构	同位素模式
$C_{12}H_{22}N_3O_7S_6^{+}$	400.0618	400.0606		
$C_{11}H_{20}N_3O_5S_6^{+}$	402.0233	402.0265		
$C_{16}H_{27}N_4O_11S_6^{+}$	563.0557	563.0567		

图 15续

式	理论质量: [M+H] ⁺	实测质量: [M+H] ⁺	结构	同位素模式
$C_{18}H_{30}N_6O_{11}SSe^+$	604.0823	604.0842		
$C_{20}H_{32}N_6O_{12}SSe^+$	661.1038	661.1053		
$C_{15}H_{26}N_5O_5Se^+$	532.0611	532.0620		

图 15续

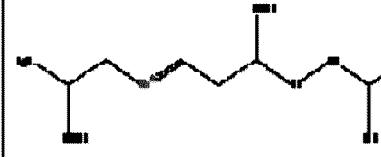
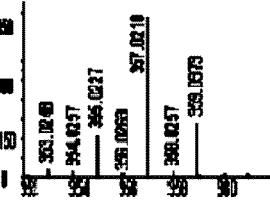
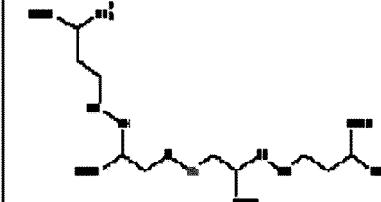
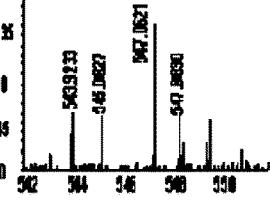
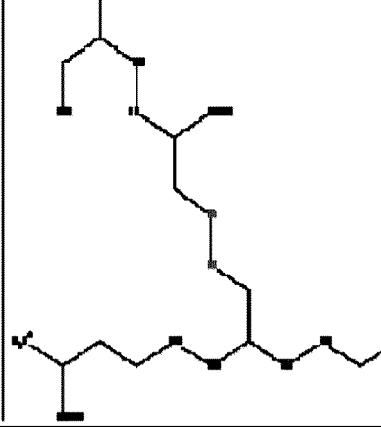
式	理论质量: [M+H] ⁺	实测质量: [M+H] ⁺	结构	同位素模式
$C_{10}H_{17}N_2O_7Se^{+}$	357.0196	357.0218 (359-2H ⁺)		
$C_{16}H_{27}N_4O_10SSe^{+}$	547.0608	547.0621		
$C_{16}H_{27}N_4O_{11}Se_2^{+}$	611.0005	611.0023		34

图 15续

式	理论质量: [M+H] ⁺	实测质量: [M+H] ⁺	结构	同位素模式
$C_{18}H_{20}N_6O_4Se_2^+$	632.0271	632.0288		
$C_{11}H_{20}N_6O_2Se_2^+$	434.0131	434.0152		
$C_{20}H_{33}N_6O_2Se_2^+$	709.0486	709.0503		

图 15续

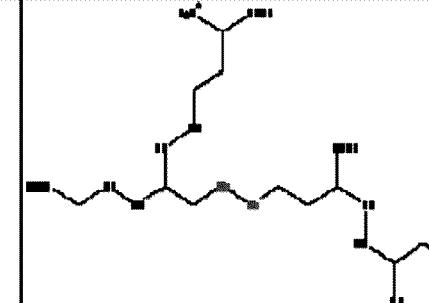
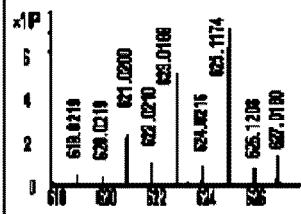
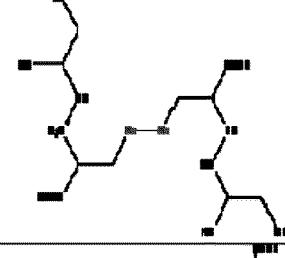
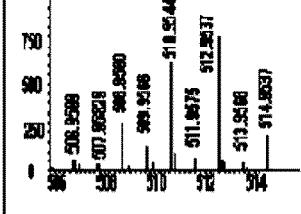
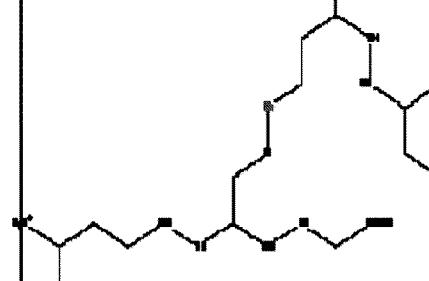
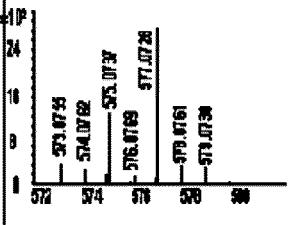
式	理论质量: [M+H] ⁺	实测质量: [M+H] ⁺	结构	同位素模式
$C_{17}H_{23}N_4D_1Se_2^+$	625.0162	625.1174		
$C_{12}H_{21}N_2D_{10}Se_2^+$	512.9521	512.9537		
$C_{17}H_{29}N_4O_1SSe^+$	577.0714	577.0728		

图 15续

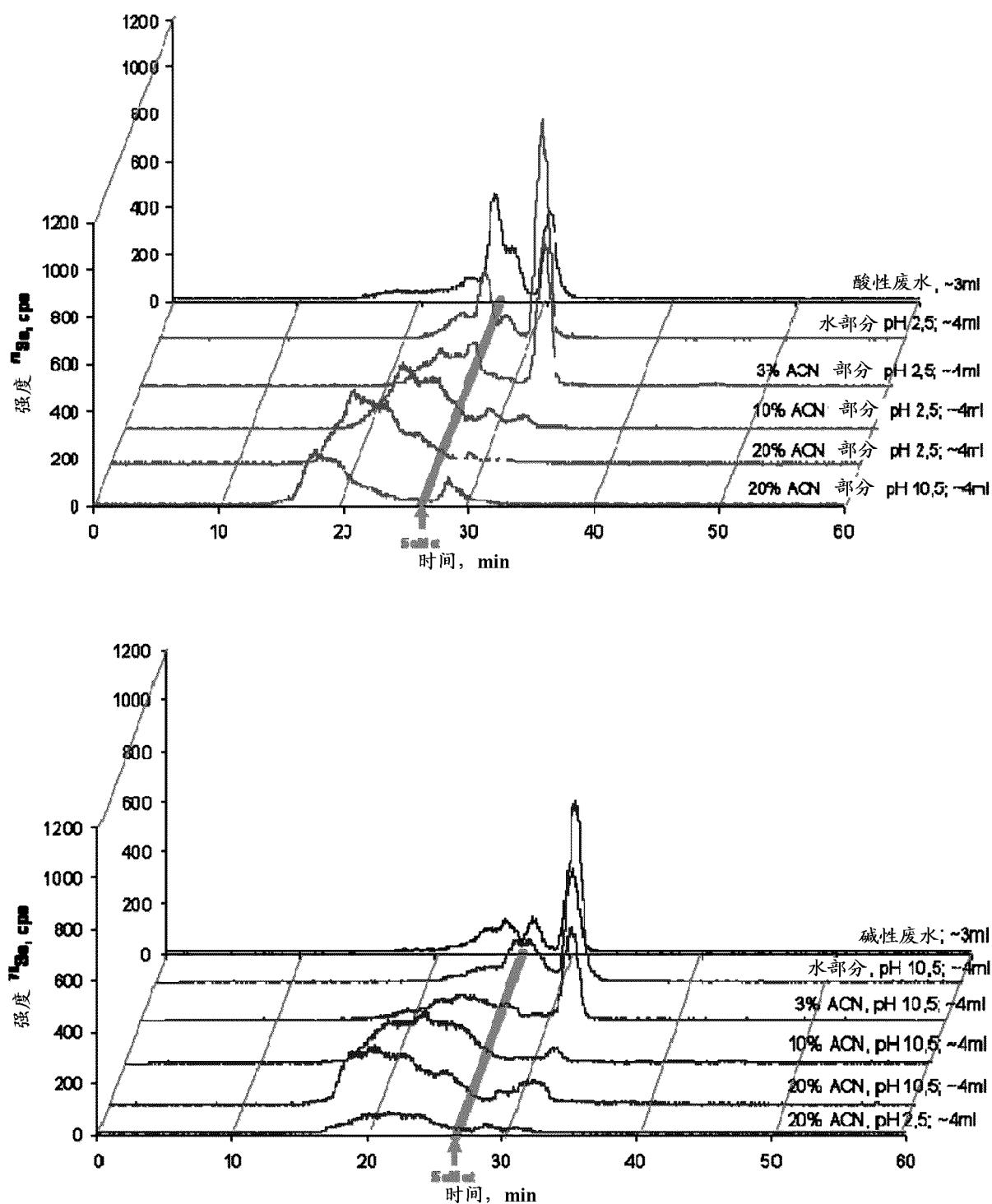


图 16

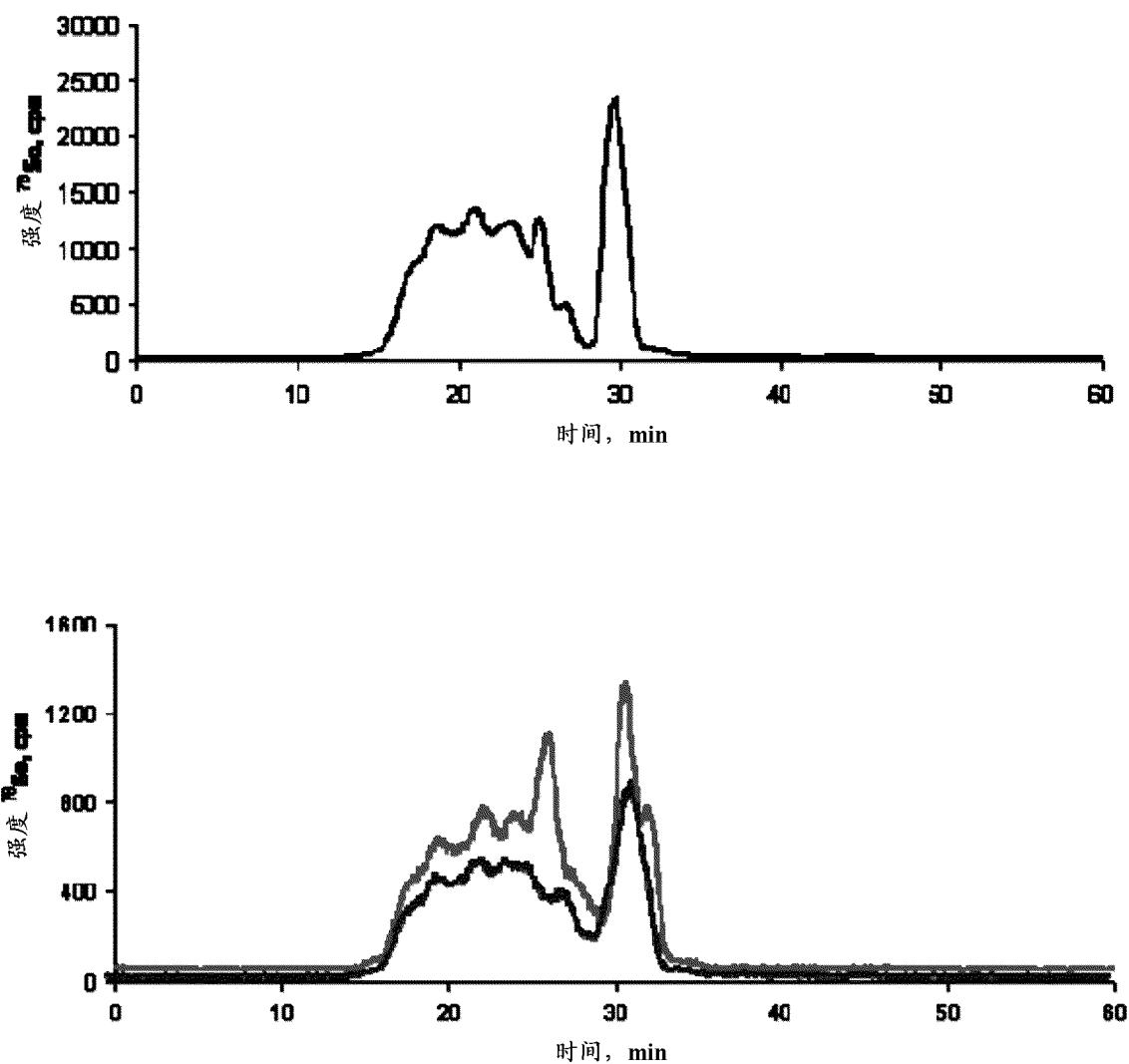
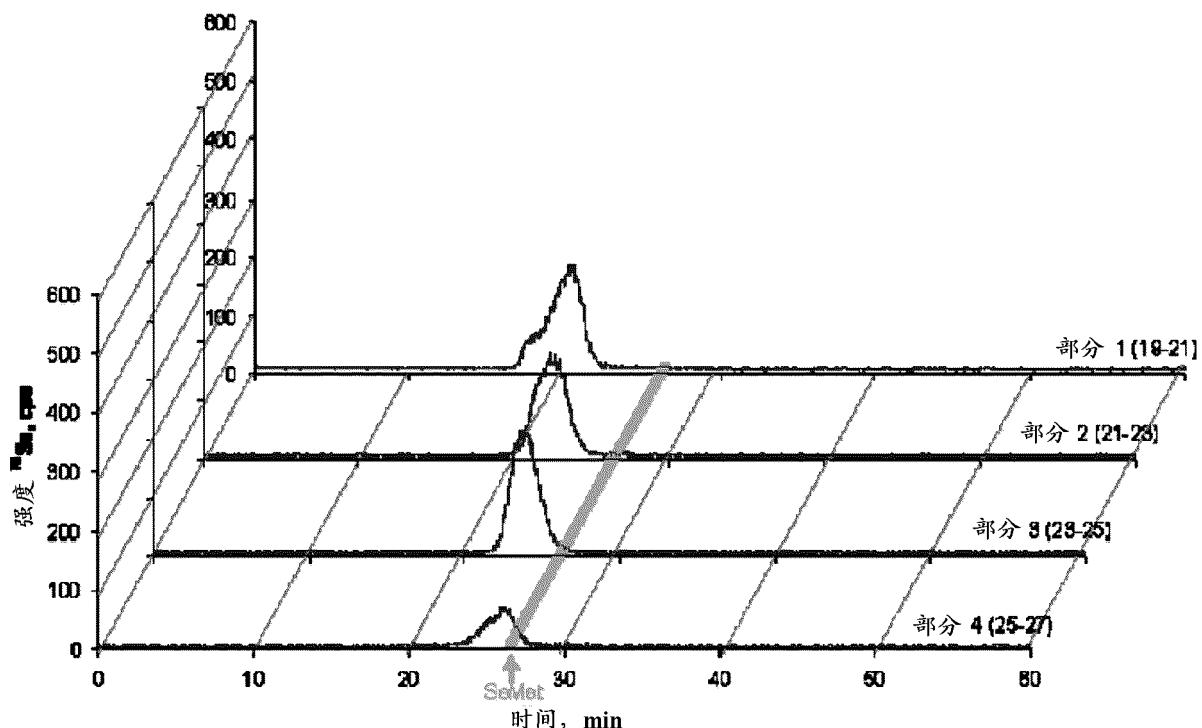


图 17



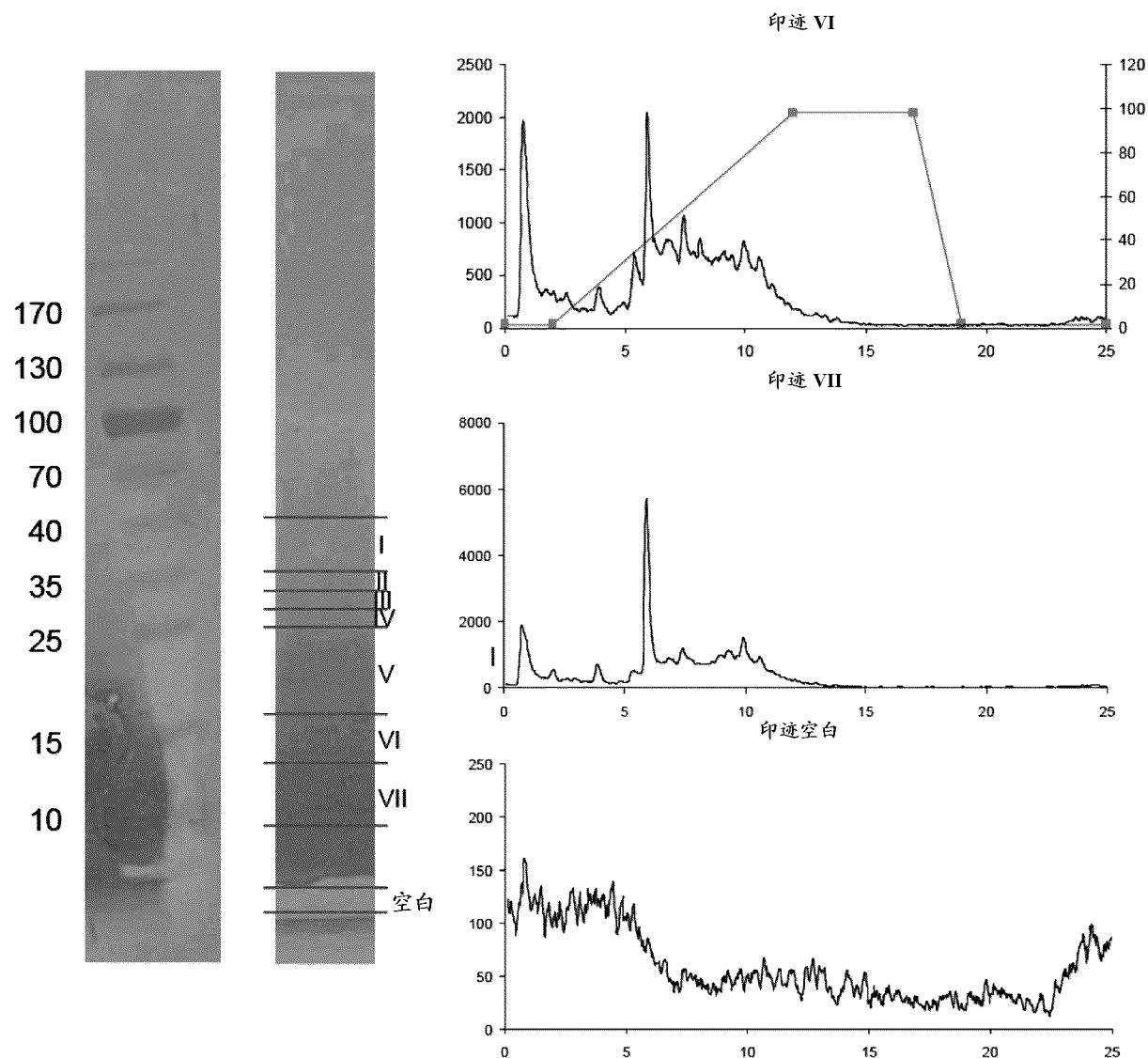


图 19

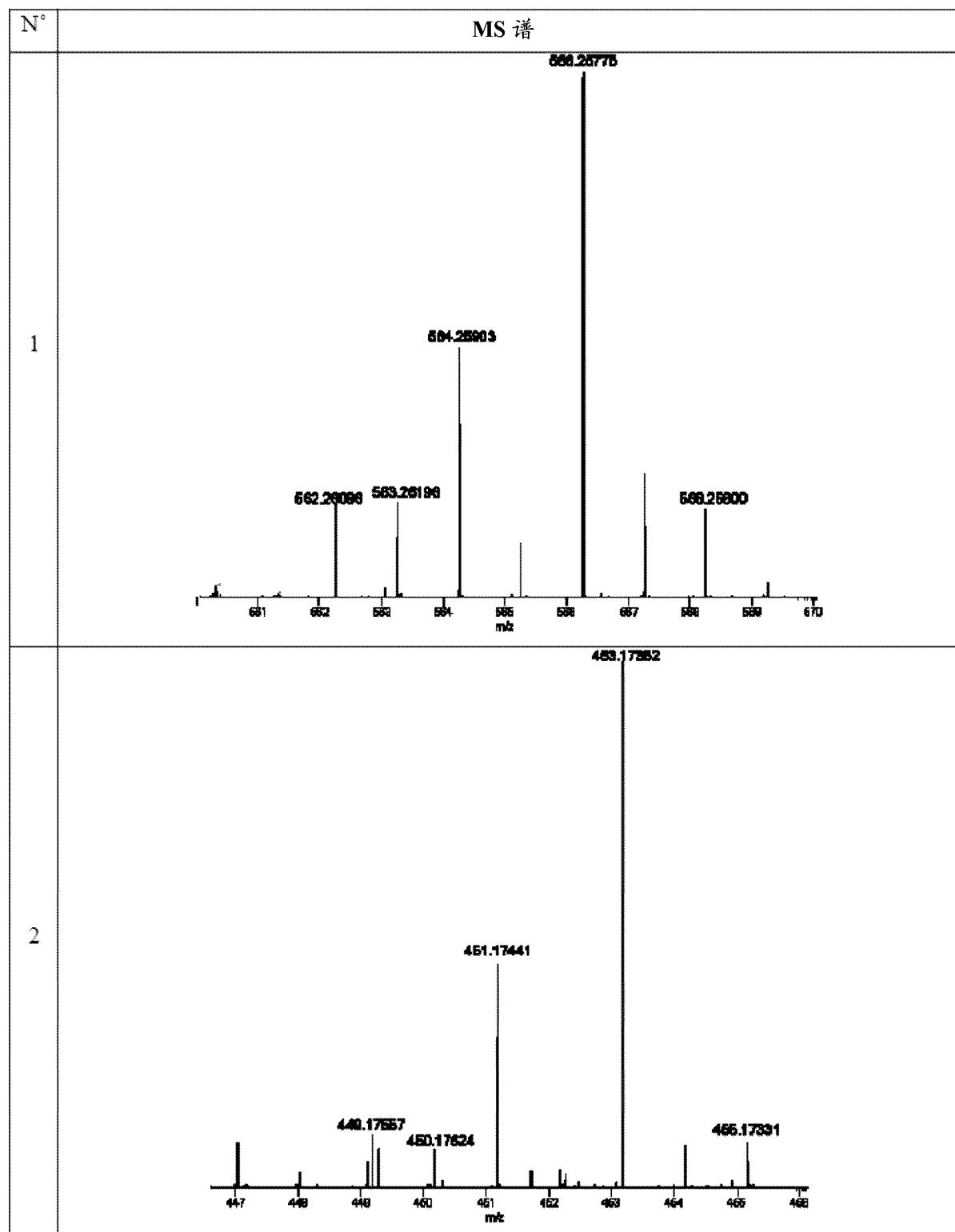


图 20

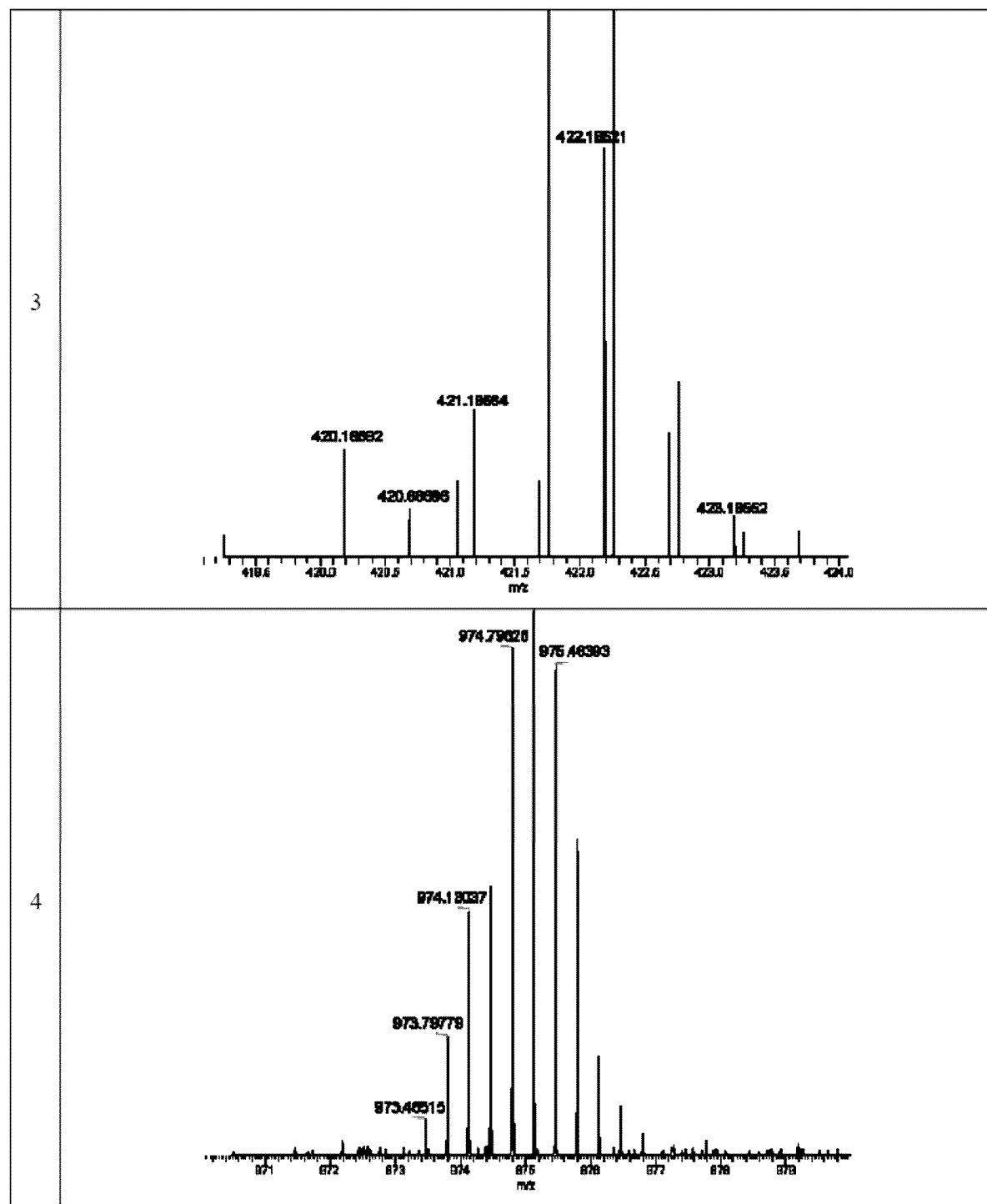


图 20续

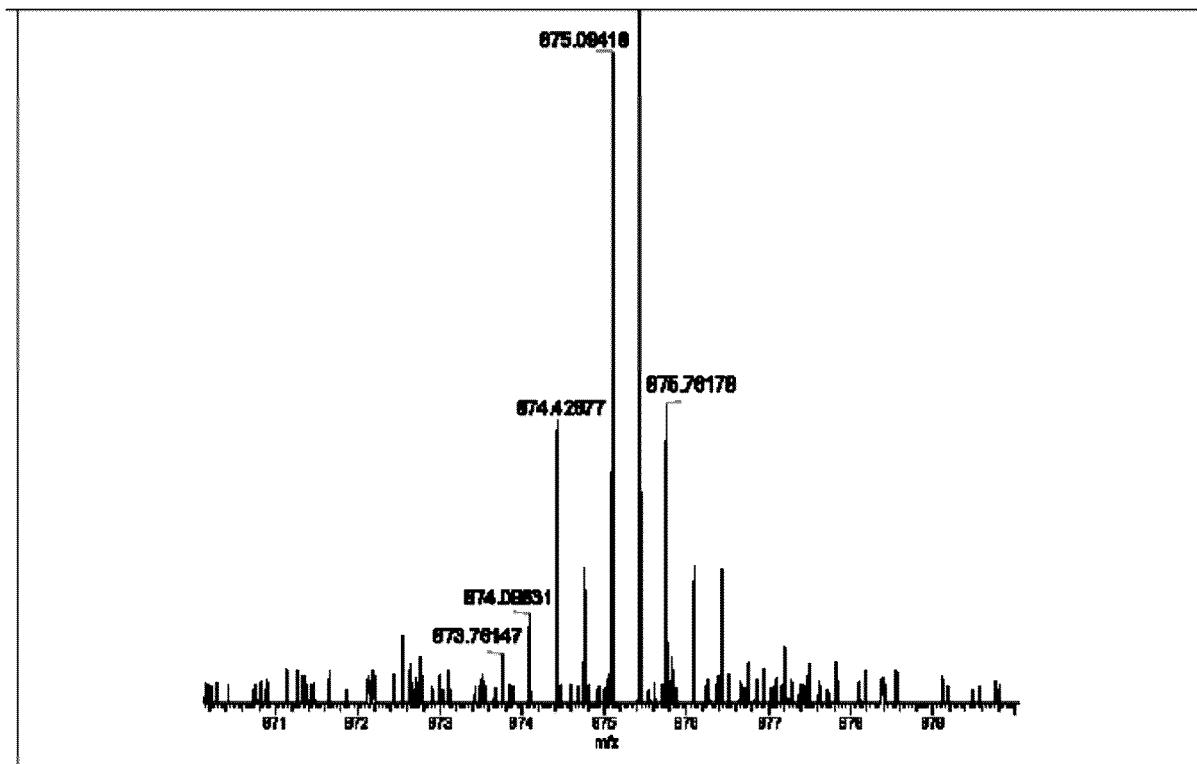


图 20续

	序列	电荷	实测质量	理论质量	蛋白质
1	LVMR	1	566.25800	566.2568	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 3; (GAPDH3)
2	VMR	1	453.17352	453.1727	
3	LTGMAFR	2	422.18521	422.18545	
4	SRPNVEVVALNDPFIT NDYAAAYMFK	3	974.79626	974.7912	
5	VINDAFGIEEGLMTT VHSLTATQK	3	875.09418	875.08923	

图 21

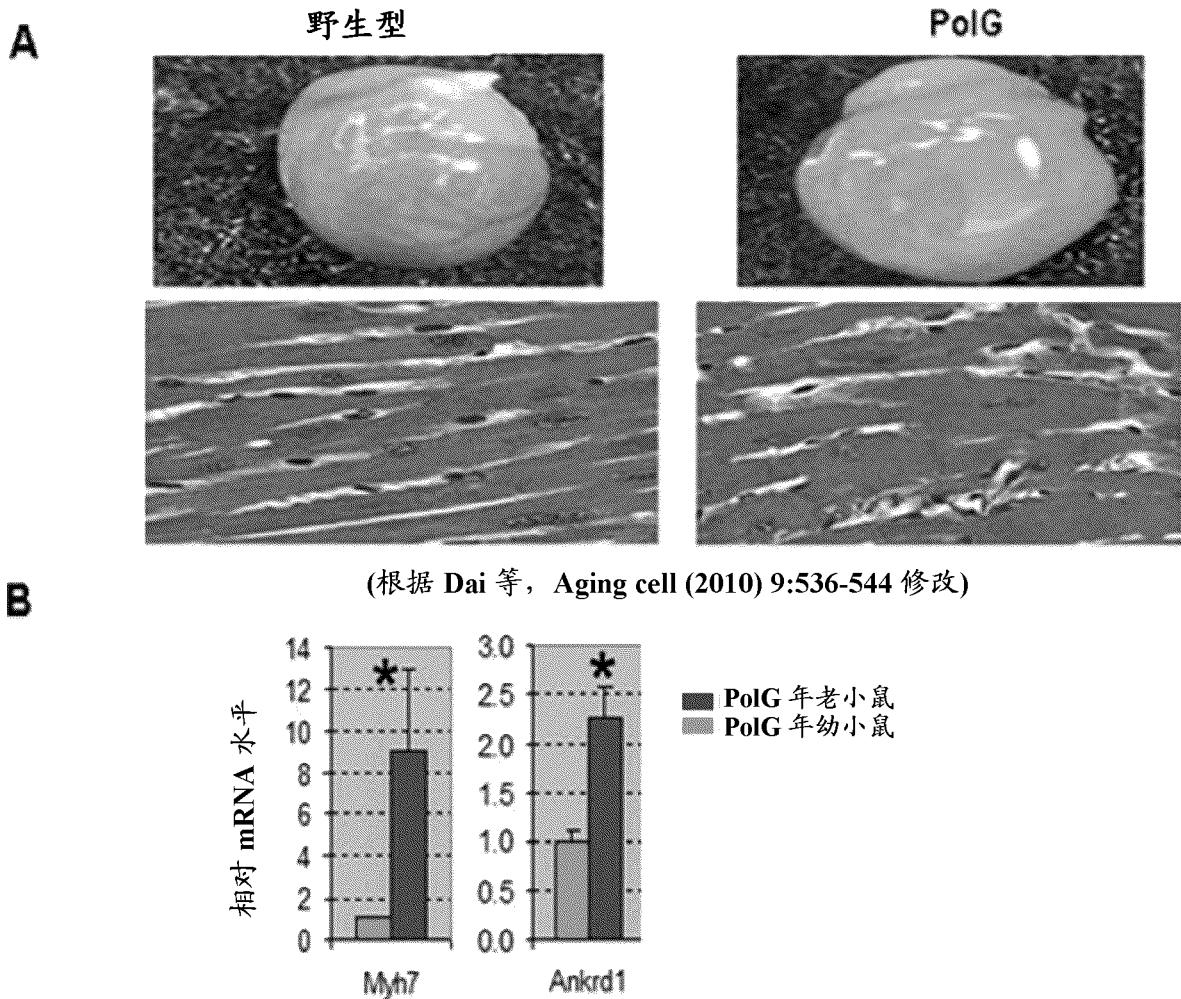


图 22

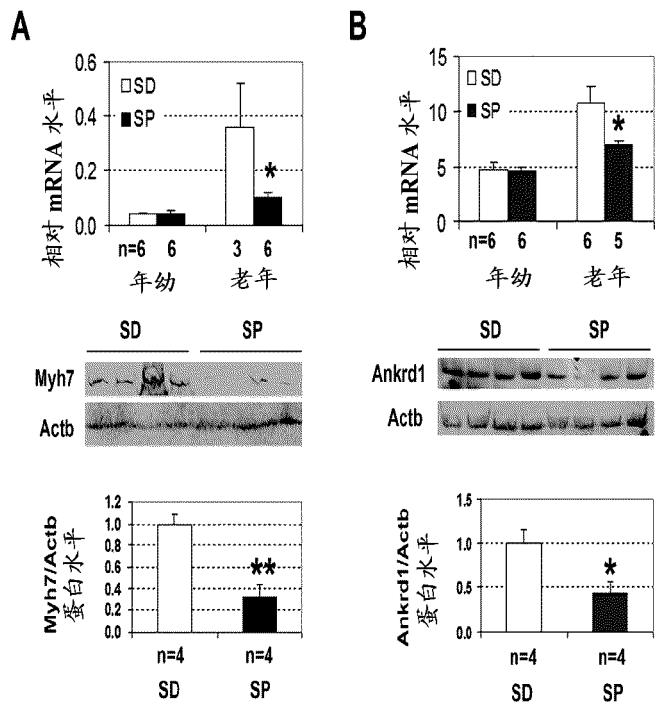


图 23

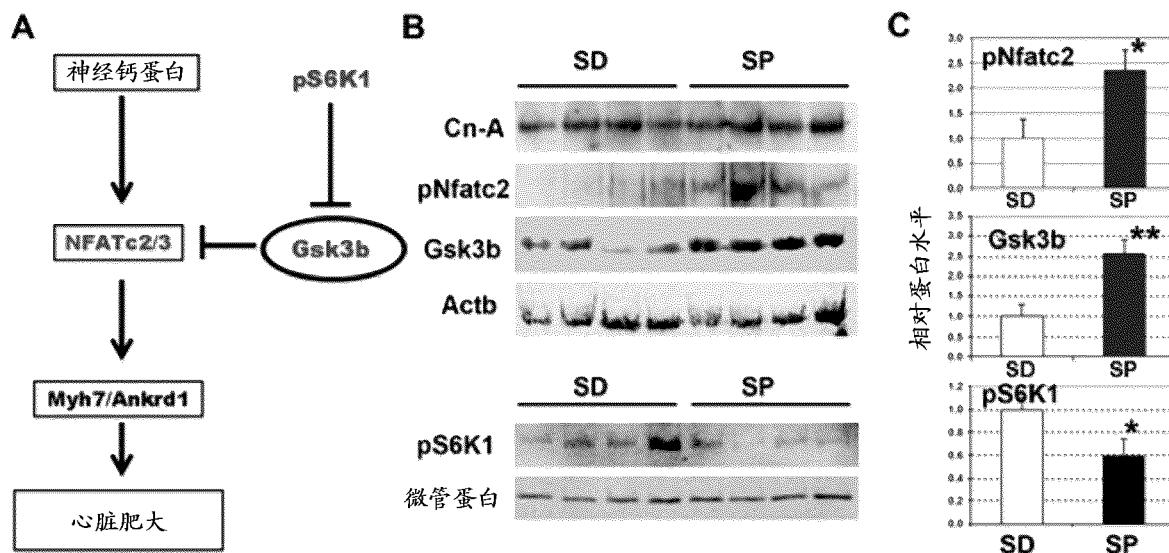


图 24

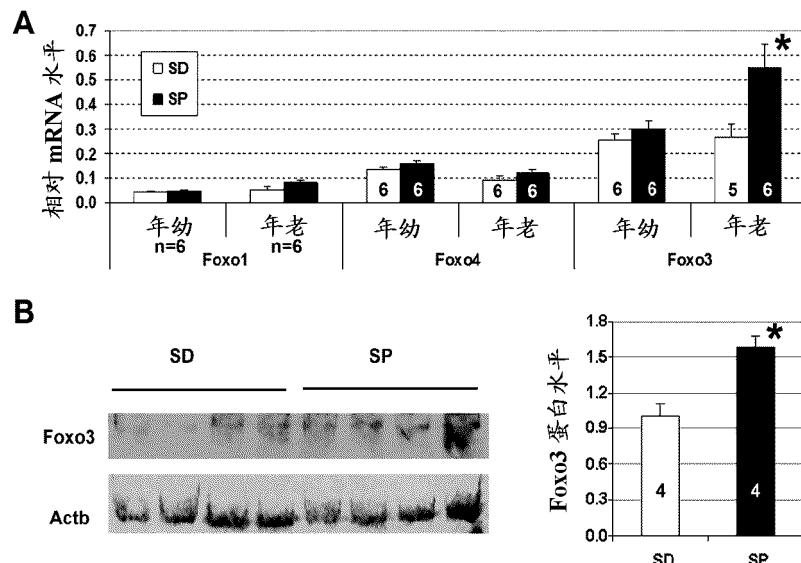


图 25

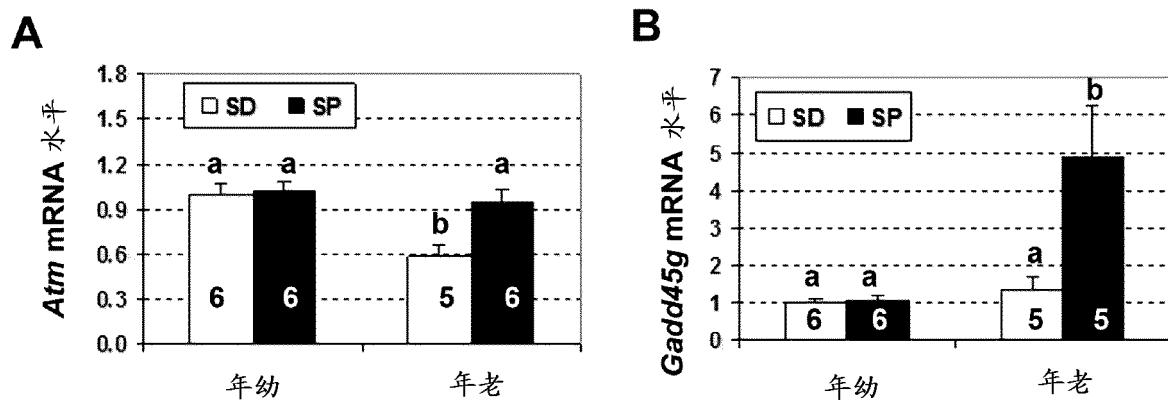


图 26

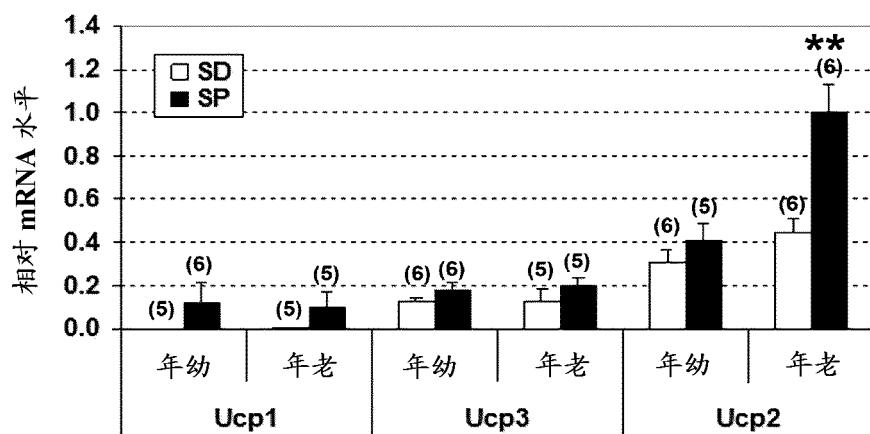


图 27

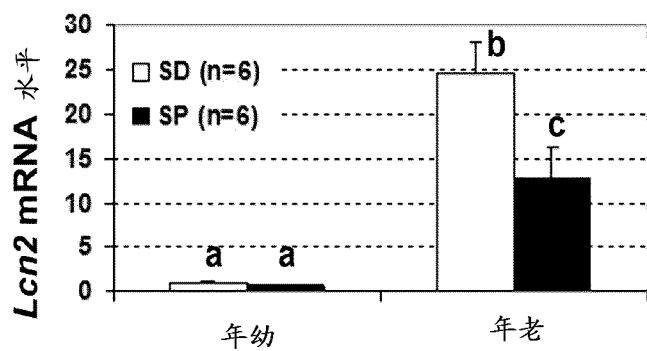


图 28

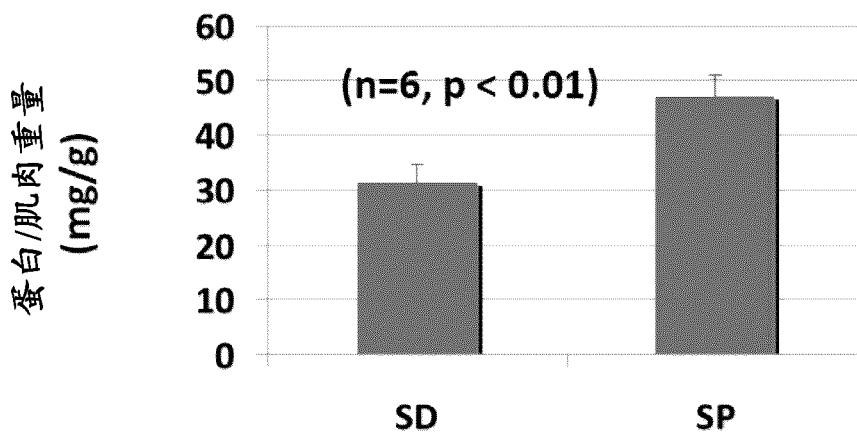


图 29

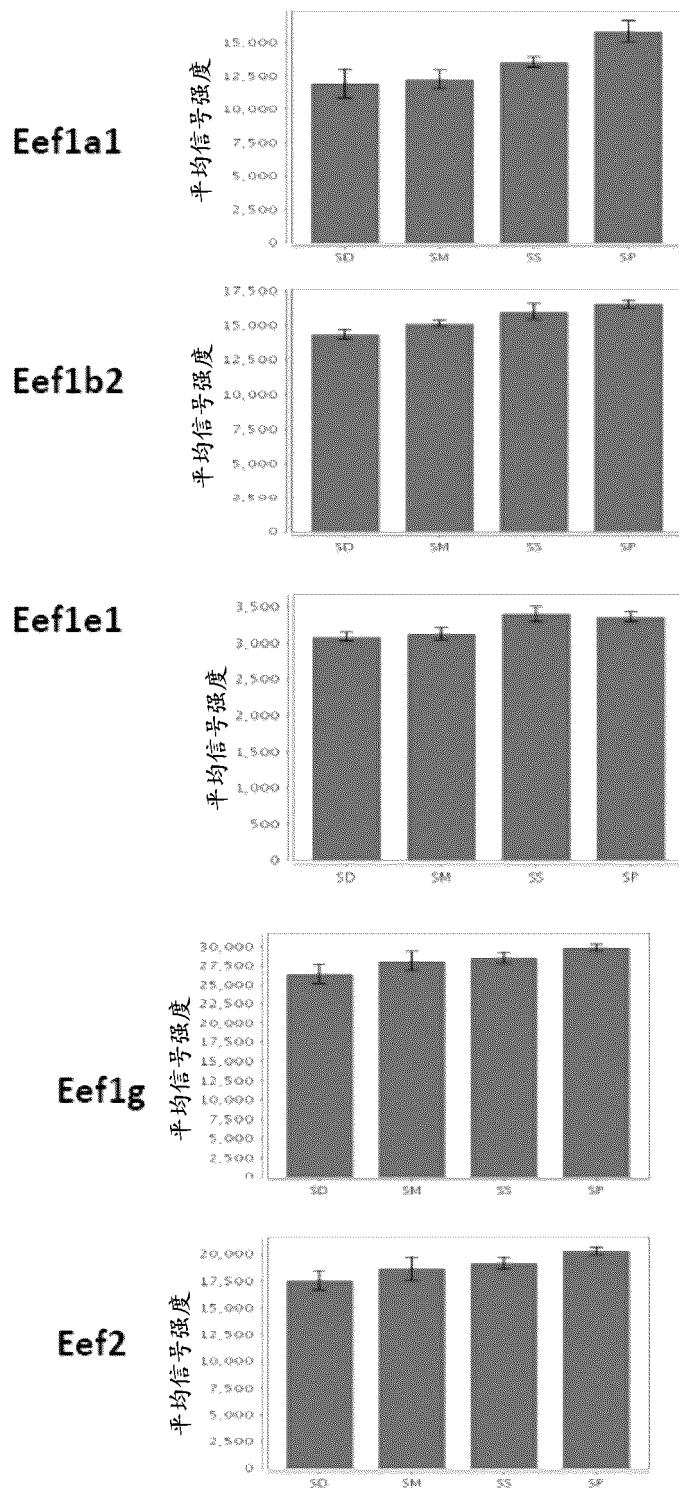


图 30

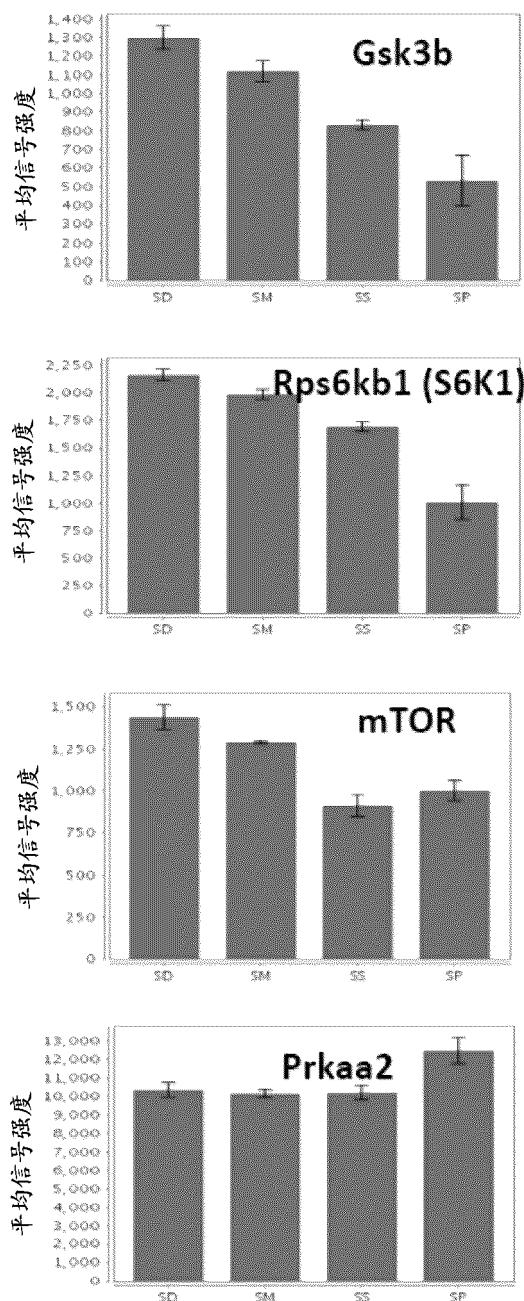


图 31

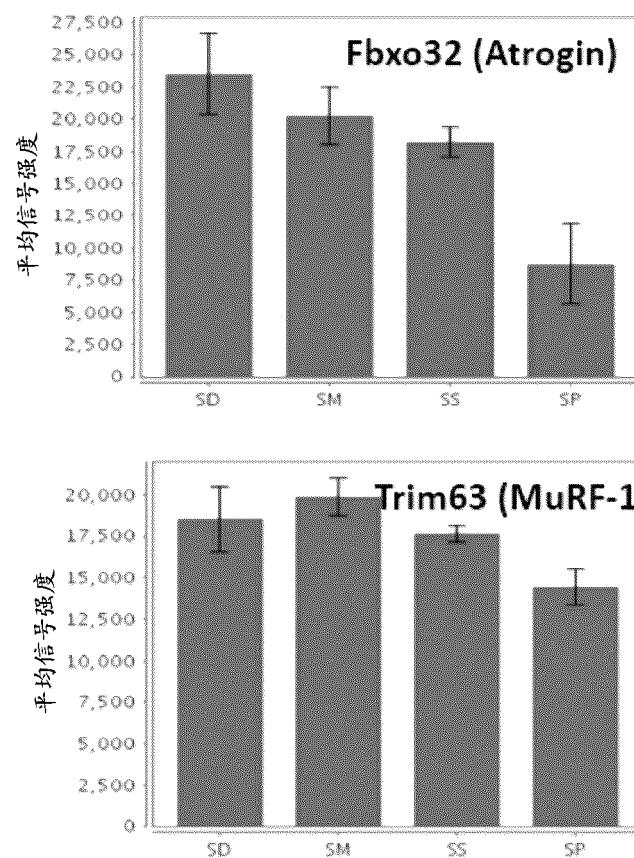


图 32

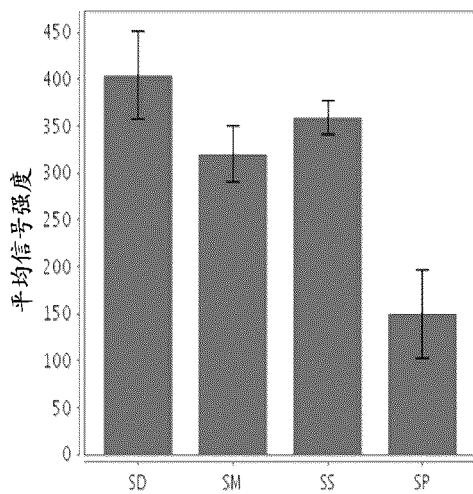


图 33

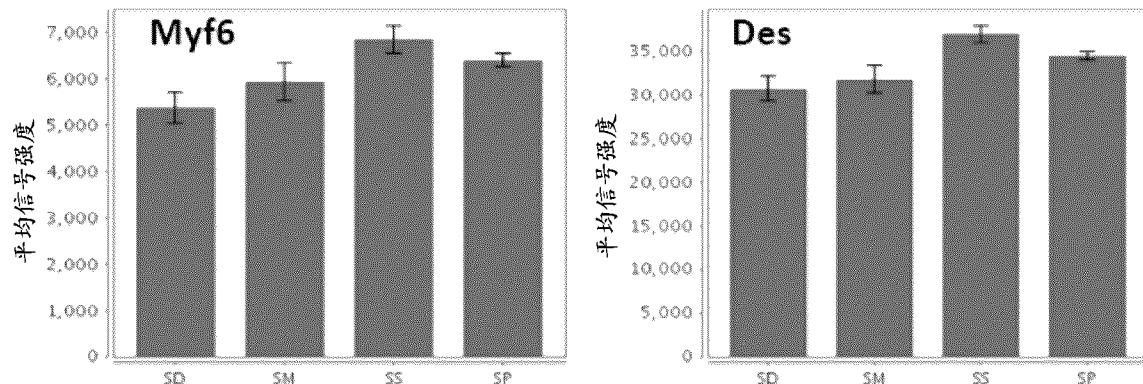


图 34

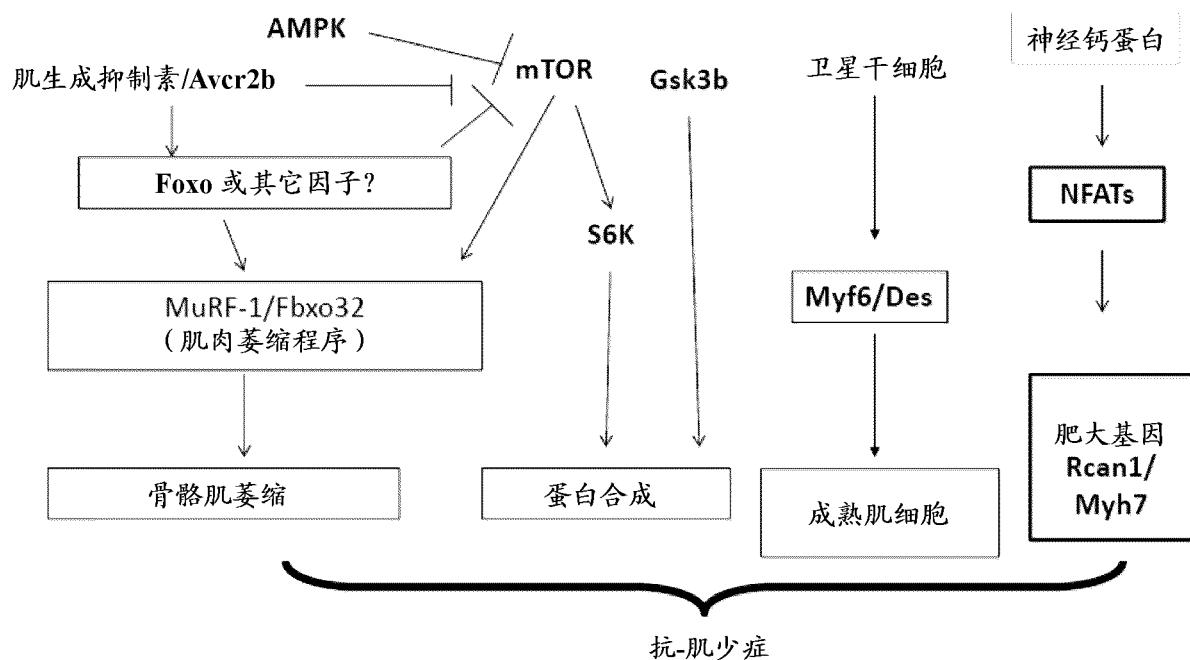


图 35

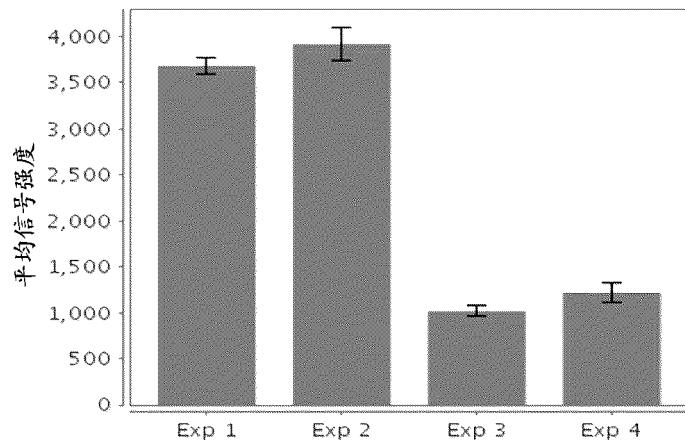


图 36

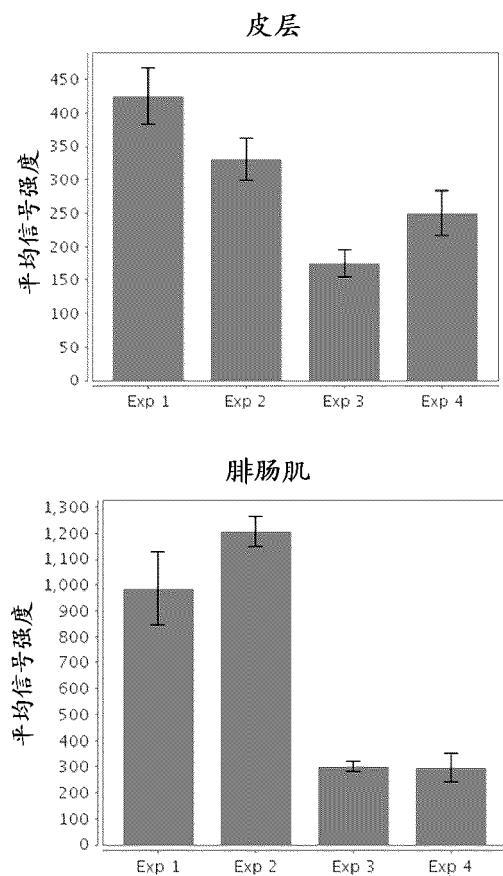
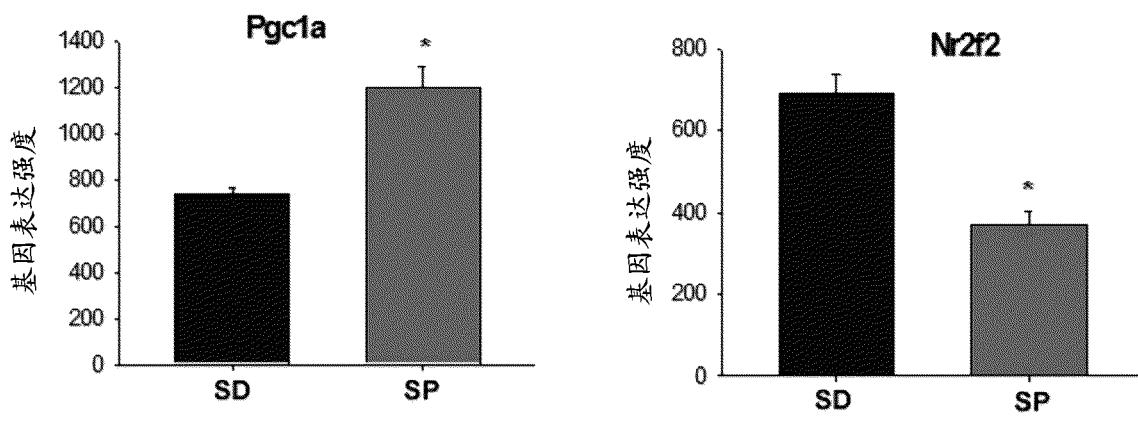


图 37

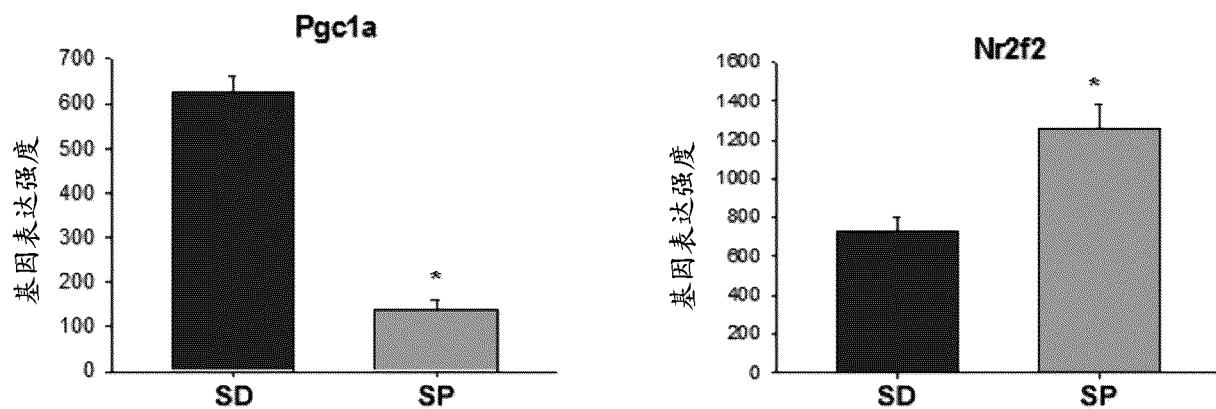
骨骼肌



*p<0.05

图 38

肝

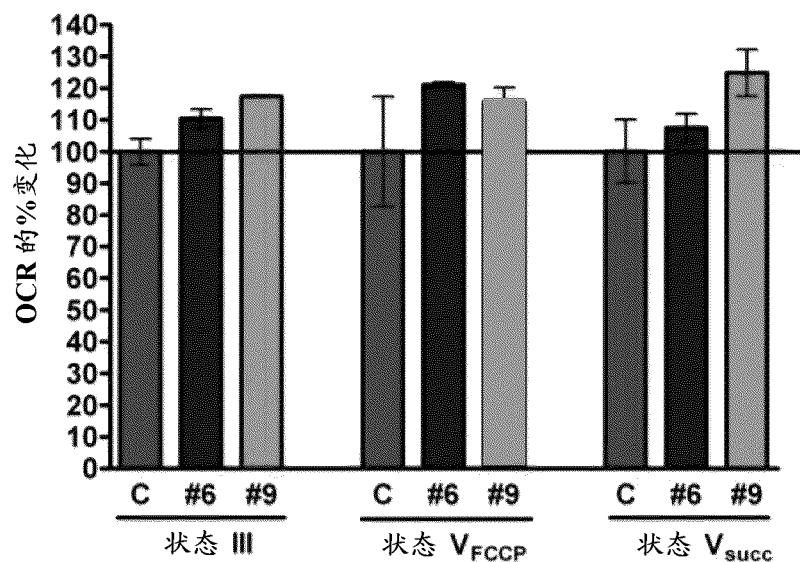


*p<0.05

图 39

A

硒海马数据



B

硒液相氧电极数据

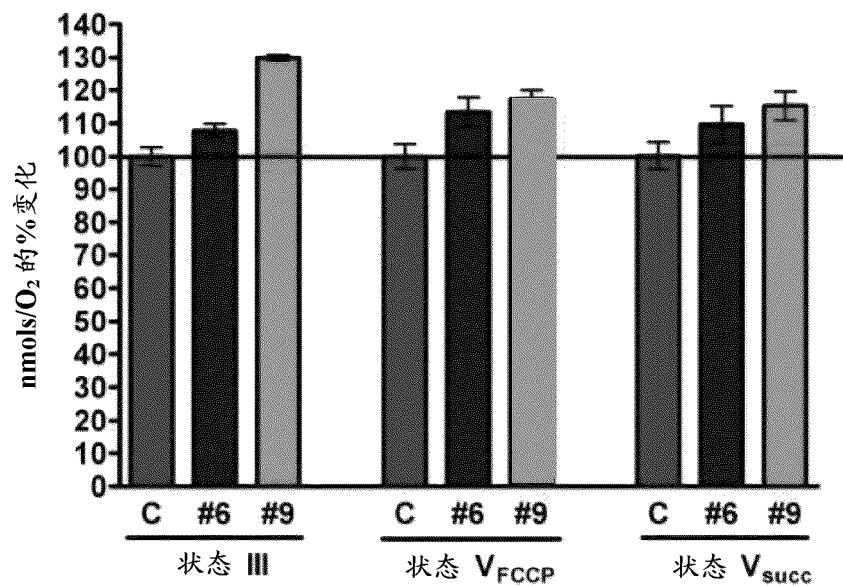


图 40

#9- 酶活性

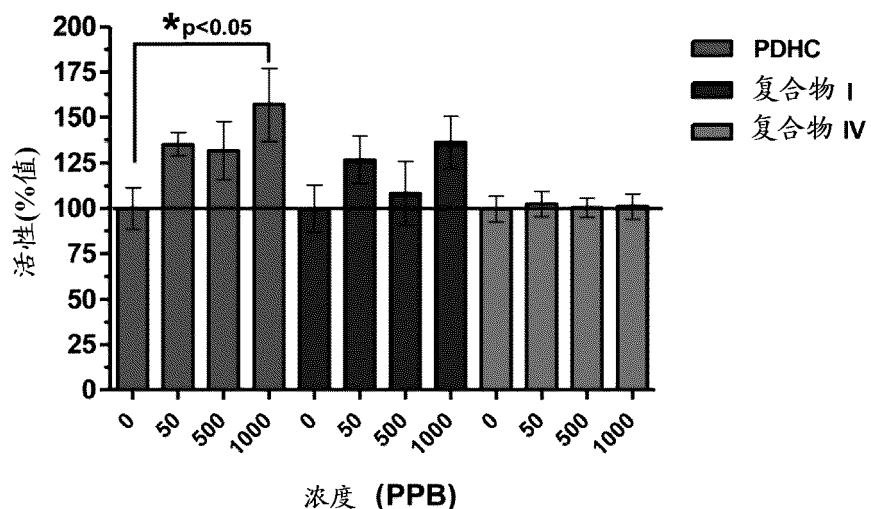


图 41