

COMPOSICIONES DE COMPUESTOS SELENOÓRGANICOS Y MÉTODOS DE USO
DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud de patente es una continuación en parte de la Solicitud de Patente Internacional No. de Serie No. PCT/US2014/029542, presentada el 14 de marzo de 2014, cuya solicitud se incorpora mediante referencia aquí.

10 **CAMPO DE LA PRESENTE SOLICITUD**

La presente solicitud se relaciona con composiciones de composiciones y compuestos selenoórganicos y métodos para su uso para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el
15 metabolismo de glucosa en diversas rutas biológicas.

ANTECEDENTES

El selenio (Se) es un oligoelemento esencial que cumple
20 una función fundamental en muchos procesos biológicos, tales como reproducción, metabolismo hormonal de la tiroides, síntesis de ADN, y protección contra el daño oxidativo e infección. El selenio se incorpora en el sitio catalítico de diversas enzimas dependientes de selenio, tales como
25 glutatión peroxidasa (GPx), tiorredoxina reductasa, y una metionina-sulfoxidoreductasa. Estas selenoenzimas contribuyen a la regulación de actividad metabólica, función inmunitaria,

defensa antioxidante, regulación redox intracelular, y función mitocondrial.

Adicionalmente, los resultados en la bibliografía
5 indican que las diferentes formas químicas de selenio tienen diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, una selenozolidina fue más efectiva en la reducción del número de tumores de pulmón de selenometionina (Poerschke et al, J Biochem Molecular Toxicology 2012 26: 344). Barger et al.
10 mostraron que los ratones alimentados con diferentes fuentes de selenio, por ejemplo, metionina de selenio, selenito de sodio y levadura selenizada, tuvieron efectos diferenciales sobre la expresión de genes y sobre las rutas funcionales específicas de la estructura y función mitocondrial. (Barger
15 et al, Genes and Nutrition 2012 7: 155). La levadura selenizada contiene muchos compuestos de selenio y azufre pero no todos los compuestos de selenio en los procesos biológicos de impacto de levadura selenizada. Adicionalmente, se ha mostrado que una mezcla de compuestos de selenio y
20 azufre en la levadura selenizada es inhibidora de otra, para impactar negativamente procesos biológicos, o ser tóxico para las células.

La Diabetes Mellitus (DM) no dependiente de insulina
25 (Tipo II) es una enfermedad caracterizada por la resistencia a insulina en el músculo esquelético, hígado y grasa, en combinación con defectos en la secreción de insulina debido a

la función de las células β de páncreas. La resistencia a la insulina es una característica central de la diabetes tipo II. En el hígado, los miembros de la familia de factor de transcripción de gen Clase O Forkhead Box (FOXO) se activan
5 en su estado no fosforilado y residen en el núcleo de la célula. En el núcleo, los factores de transcripción de FOXO se unen a la región promotora de genes, tales como Glucosa 6-Fosfatasa (*G6PC*). Junto con otros factores de transcripción, tales como PGC-1 α , ocurren aumentos de transcripción de *G6PC*,
10 aumentando de esta manera la tasa de producción de glucosa. La glucosa 6-fosfatasa también cataliza la última etapa en la gluconeogénesis y glucogenolisis provocando la liberación de glucosa del hígado. Por lo tanto, la *G6PC* es importante en el control de homeostasis de glucosa, en particular en los
15 sujetos diabéticos.

La diferencia aparente en bioactividad y disponibilidad de formas químicas distintas de selenio requiere la identificación de compuestos que contienen selenio que
20 impactan positivamente los procesos biológicos. En particular, subsiste la necesidad de caracterizar los efectos de selenio en el reemplazo de insulina, actividad de insulina mejorada, inhibición de la producción de glucosa, o modulación del metabolismo de glucosa en diversas rutas
25 biológicas. Adicionalmente, subsiste la necesidad de determinar el efecto de los compuestos de selenio y su eficacia como terapias de reemplazo de insulina para las

personas que sufren de diabetes tipo I o tipo II.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente descripción proporciona un método para
5 reemplazar insulina en un sujeto. El método para reemplazar
insulina comprende administrar una composición al sujeto, la
composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos
seleccionados del grupo que consiste de 5'-
Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-
10 glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula
(I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la
Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. La composición
del método también puede comprender un portador.

15 La presente descripción también proporciona un método
para mejorar la actividad de insulina en un sujeto. El método
para mejorar la actividad de insulina comprende administrar
una composición al sujeto, la composición comprende por lo
menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que
20 consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-
homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un
compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II),
un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los
mismos. La composición del método también puede comprender un
25 portador. El método para mejorar la actividad de insulina
puede comprender adicionalmente administrar insulina o un
análogo o derivado de la misma.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para inhibir la producción de glucosa en un sujeto. El método para inhibir la producción de glucosa comprende
5 administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula
10 (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. La composición del método también puede comprender un portador.

La presente descripción proporciona adicionalmente un
15 método para modular el metabolismo de glucosa en un sujeto. El método para modular el metabolismo de glucosa comprende: administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-
20 Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. La composición del método también puede comprender un portador.

25

En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la

producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la composición puede comprender 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína y Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína. En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la composición puede comprender por lo menos 0.1% (p/v) de 5'-Metilselenoadenosina. En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la composición puede tener una forma seca o de cápsula.

En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, o inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la composición puede comprender adicionalmente insulina o un análogo o derivado de la misma. En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la composición puede comprender adicionalmente un sensibilizador de insulina, un secretagogo de insulina, o un imitador de incretina. En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en

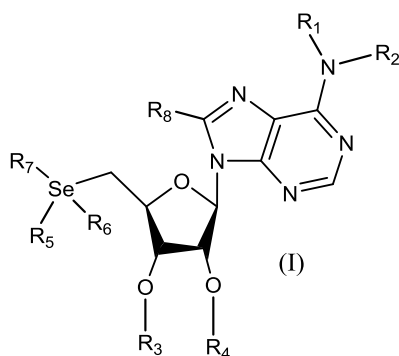
un sujeto, la composición puede excluir una o más de 5'-Metiltioadenosina, S-Adenosil-L-homocisteína o Gama-glutamil-metil-cisteína.

5 En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la composición se puede administrar por vía oral. En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina,
10 mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la 5'-Metilselenoadenosina o el compuesto de la Fórmula (I) es un selenoglucósido. En uno cualquiera de los métodos para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina,
15 inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en un sujeto, la composición se puede administrar a las células de hígado del sujeto.

La presente descripción proporciona una composición que
20 comprende por lo menos dos compuestos diferentes seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II) y un compuesto de la
25 Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. La composición también puede comprender un portador.

La presente descripción proporciona adicionalmente una composición que comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, y Gama-glutamil-metilseleno-cisteína. La composición también puede comprender un portador.

La presente descripción proporciona una composición que comprende por lo menos 0.1% (p/v) de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I):



o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

R_1 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclico; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

20

R₂ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C (O)R', C(O)OR', en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclico; o R₁ junto con R₂ forman un anillo
 5 heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R₃ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R₃ junto con
 10 R₄ y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R₄ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R₃ junto con
 15 R₄ y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

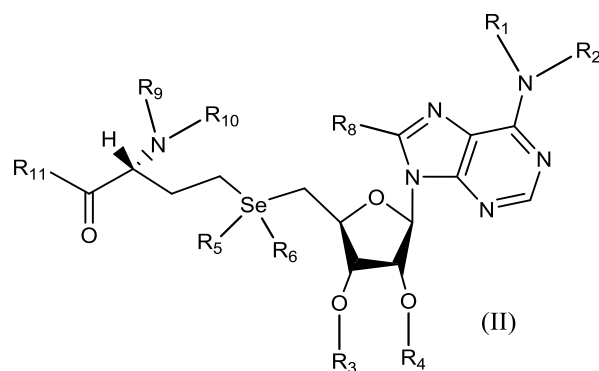
20 R₅ es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

25 R₆ es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

R₇ es un alquilo C₃-C₁₆, en el que el alquilo C₃-C₁₆ no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alquenilo, alquinilo, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de
 5 arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', S- R', en el que R' para OR' se
 10 selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el que R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H,
 15 alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo.

R₈ es hidrógeno, azido, alquilo, alquenilo, alquinilo. La composición de la Fórmula I también puede comprender un
 20 portador. Adicionalmente, la 5'-Metilselenoadenosina o el compuesto de la Fórmula (I) de la composición puede ser un selenoglucósido. La composición de la Fórmula I también se puede administrar a las células de hígado del sujeto.

25 La presente descripción también proporciona una composición que comprende por lo menos 0.1% (p/v) de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II):



o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

R₁ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C(O)R', C(O)OR', en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R₁ junto con R₂ forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

10

R₂ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C(O)R', C(O)OR', en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R₁ junto con R₂ forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

15

R₃ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R₃ junto con R₄ y los átomos al cual se adhieren forman un anillo

20

heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

5 R_4 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

10 R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

15 R_6 es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

R_8 es hidrógeno, azido, alquilo, alqueno, alquino.

20 R_9 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' es alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterocíclico; o R_9 junto con R_{10} forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo
25 seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R_{10} es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino,

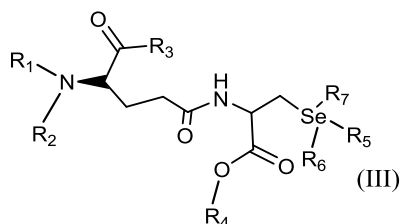
aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_9 junto con R_{10} forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R_{11} es OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna.

La composición de la Fórmula (II) puede comprender un portador. La composición de la Fórmula (II) también se puede administrar a las células de hígado del sujeto.

15

Por último, la presente descripción proporciona una composición que comprende por lo menos 0.1% (p/v) de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III):



20

o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

R_1 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo,

aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R_3 es OH, OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna.

R_4 es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna.

R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

R_6 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo,

OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

R₇ es un alquilo C₃-C₁₆, en el que el alquilo C₃-C₁₆ no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alqueno, alquino, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', S- R', en el que R' para OR' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el que R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo.

20

La composición de la Fórmula (III) puede comprender un portador. La composición de la Fórmula (III) también se puede administrar a las células de hígado del sujeto.

25

Las composiciones descritas aquí puede comprender por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) de la composición de cada uno de dos compuestos o por lo menos aproximadamente

0.033%(p/v) de la composición de cada uno de tres compuestos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Una breve descripción de los dibujos es como sigue.
Cuando se indica una mezcla de compuestos de selenio, la
cantidad en ppb indica la cantidad de ppb de selenio en cada
compuesto de selenio en la mezcla. Cuando se indica una
mezcla de compuestos de azufre, la cantidad en ppb indica la
10 cantidad de ppb de azufre cada compuesto de azufre en la
mezcla. Por ejemplo, 150 ppb de los Compuestos CDE contiene
150 ppb de selenio en el Compuesto C, 150 ppb de selenio en
el Compuesto D, y 150 ppb de selenio en el Compuesto E en
combinación para una concentración de selenio total de 450
15 ppb. Por ejemplo, 150 ppb de los Compuestos HIJ contiene 150
ppb de azufre en el Compuesto H, 150 ppb de azufre en el
Compuesto I, y 150 ppb de azufre en el Compuesto J en
combinación para una concentración de azufre total de 450
ppb.

20

La figura 1 es una gráfica que muestra el efecto de 150
ppb de cada uno de los compuestos individuales y diversas
combinaciones del Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E,
Compuesto H, Compuesto I, y Compuesto J sobre la viabilidad
25 celular en células de hígado AML-12 como se indica por OD490.

Las figuras 2A-2B muestran el efecto de diversas

combinaciones del Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, Compuesto H, Compuesto I y Compuesto J y los compuestos individuales sobre los niveles de expresión de mRNA del gen *G6PC* en células de hígado AML-12.

5

La figura 2A es una gráfica de barras que muestra niveles de mRNA en *G6PC* relativos en células AML-12 tratadas con un control y 150 ppb de los Compuestos CDE y Compuestos HIJ durante 48 horas.

10

La figura 2B es una gráfica de barras que muestra expresión de mRNA en *G6PC* relativa en células AML-12 tratadas con Compuesto C individual, Compuesto D, Compuesto E, Compuesto H, Compuesto I y Compuesto J durante 48 horas.

15

La figura 3 es una gráfica de barras que muestra los efectos de la insulina, los Compuestos CDE, y combinaciones de tanto insulina como Compuestos CDE sobre niveles de expresión de mRNA en *G6PC* relativos en células AML-12. *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ cuando se compara con el grupo de control (sin grupo de tratamiento de insulina y Compuestos CDE).

20

25

La figura 4 es una gráfica de barras que muestra los efectos de la insulina, los Compuestos CDE, y combinaciones de tanto insulina como Compuestos CDE sobre niveles de expresión de mRNA en *G6PC* relativos en células AML-12 cotratadas con 8-CPT/Dex. La figura de inserción es una

gráfica de barras con una alta magnificación que muestra niveles de expresión de mRNA en *G6PC* relativos en células AML-12 tratadas con solo agua (control), una combinación de 8-CPT/Dex e insulina, y combinaciones de 8-CPT/Dex, insulina, y Compuestos CDE.

Las figuras 5A-5D muestran el efecto del Compuestos CDE y Compuestos HIJ sobre niveles de expresión de mRNA relativos de genes *Insr* e *Igf1r* en células de hígado AML-12.

10

La figura 5A es una gráfica de barras que muestra niveles de expresión de mRNA en *Insr* relativos en células AML-12 tratadas con 150 ppb de los Compuestos CDE y 150 ppb de los Compuestos HIJ durante 24 horas. ** $P < 0.01$ cuando se compara con el grupo de control (vehículo tratado con agua).

La figura 5B es una gráfica de barras que muestra niveles de expresión de mRNA en *Igf1r* relativos en células AML-12 tratadas con 150 ppb de los Compuestos CDE y 150 ppb de los Compuestos HIJ durante 24 horas. ** $P < 0.01$ cuando se compara con el grupo de control (vehículo tratado con agua).

La figura 5C es una gráfica de barras que muestra niveles de expresión de mRNA en *Insr* relativos en células AML-12 tratadas con control, insulina 10 o 100 nM, 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE, o cotratadas con 8-CPT/Dex, insulina y Compuestos CDE. *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ cuando se

compara con el grupo de control (no tratados con 8-CPT/Dex/insulina/Compuestos CDE).

La figura 5D es una gráfica de barras que muestra
5 niveles de expresión de mRNA en *Igfr1* relativos en células
AML-12 tratadas con control, insulina 10 o 100 nM, 150 ppb o
300 ppb de los Compuestos CDE, o cotratadas con 8-CPT/Dex,
insulina y Compuestos CDE. *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ cuando se
compara con grupo de control (no tratados con 8-
10 CPT/Dex/insulina/Compuesto CDE).

Las figuras 6A-6C muestran el efecto de los Compuestos
CDE y Compuestos HIJ sobre niveles de proteína de Foxo3
fosforilado en treonina 32 (pFoxo3T32) y Foxo4 fosforilado en
15 treonina 28 (pFoxo4T28) en células AML-12 cultivadas en medio
que contiene suero.

La figura 6A es una transferencia Western que muestra
expresión de proteínas de diversas moléculas de señalización,
20 que incluyen pFoxo3T32 y pFoxo4T28, en respuesta al
tratamiento de células AML-12 con un control de agua o 150
ppb de los Compuestos CDE y 150 ppb de los Compuestos HIJ
durante 6 horas.

25 La figura 6B es una gráfica de barras que muestra
análisis cuantitativo de niveles de proteína de pFoxo3T32 en
el gel de la figura 6A.

La figura 6C es una gráfica de barras que muestra análisis cuantitativo de niveles de proteína de pFoxo4T28 en el gel de la figura 6A.

5

Las figuras 7A-7C muestran el efecto de los Compuestos CDE, los Compuestos CE, y Compuestos DE sobre niveles de proteína de pFoxo3T32 y pFoxo4T28 en células AML-12 cultivadas en medio libre de suero.

10

La figura 7A es una transferencia Western que muestra expresión de proteínas de diversas moléculas de señalización, que incluyen pFoxo3T32 y pFoxo4T28, en respuesta al tratamiento de células AML-12 con un control de agua o 150 ppb de los Compuestos CDE, 150 ppb de los Compuestos CE, y 150 ppb de los Compuestos DE durante 6 horas.

15

La figura 7B es una gráfica de barras que muestra análisis cuantitativo de niveles de proteína de pFoxo3T32 en el gel de la figura 7A.

20

La figura 7C es una gráfica que muestra análisis cuantitativo de niveles de proteína de pFoxo4T28 en el gel de la figura 7A.

25

La figura 8 es una transferencia Western que muestra el efecto de un control o 150 ppb de los Compuestos CDE y 150

ppb de los Compuestos HIJ sobre niveles de proteína de pFOXO4T28, pFOXO4S193 y otras moléculas de señalización en células neuronales IMR-32 humanas.

5 Las figuras 9A-9C muestran el efecto de los Compuestos CDE sobre la producción de glucosa, expresión de mRNA en *G6PC*, y actividad de lactato deshidrogenasa extracelular (LDH) en hepatocitos de ratón primarios.

10 La figura 9A es una gráfica de barras que muestra niveles de glucosa relativos en el medio de cultivo de células de hepatocito de ratón tratadas con control, 8-CPT/Dex, insulina 10 o 100 nM, 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE, y combinaciones de insulina y Compuestos CDE.
15 * $P < 0.05$ vs grupo de tratamiento de vehículo (la primera barra en las gráficas).

La figura 9B es una gráfica de barras que muestra niveles de mRNA en *G6PC* relativos en células de hepatocito de
20 ratón tratadas con control, insulina 10 o 100 nM, 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE, y combinaciones de insulina y Compuestos CDE. * $P < 0.05$ vs grupo de tratamiento de vehículo (la primera barra en las gráficas).

25 La figura 9C es una gráfica de barras que muestra niveles de LDH relativos en el medio de cultivo de células de hepatocito de ratón tratadas con control, insulina 10 o 100

nM, 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE, y combinaciones de insulina y Compuestos CDE.

Las figuras 10A-10C muestran el efecto de los Compuestos CDE sobre la producción de glucosa, expresión de mRNA en *G6PC*, y actividad de LDH extracelular en hepatocitos de ratón primarios estimulados con 8-CPT/Dex.

La figura 10A es una gráfica de barras que muestra niveles de glucosa relativos en el medio de cultivo de células de hepatocito de ratón tratadas con control, 8-CPT/Dex, combinaciones de 8-CPT/Dex y insulina o Compuestos CDE, y combinaciones de 8-CPT/Dex, insulina y Compuestos CDE.

La figura 10B es una gráfica de barras que muestra niveles de mRNA en *G6PC* relativos en células de hepatocito de ratón tratadas con control, 8-CPT/Dex, combinaciones de 8-CPT/Dex y insulina o Compuestos CDE, y combinaciones de 8-CPT/Dex, insulina y Compuestos CDE.

La figura 10C es una gráfica de barras que muestra niveles de LDH relativos en el medio de cultivo de hepatocitos de ratón tratados con control, 8-CPT/Dex, combinaciones de 8-CPT/Dex y insulina o Compuestos CDE, y combinaciones de 8-CPT/Dex, insulina y Compuestos CDE. * $P < 0.05$ vs grupo de tratamiento de vehículo (la primera barra en la gráfica).

Las figuras 11A-11B muestran el efecto de los Compuestos CDE sobre la producción de glucosa y actividad de LDH extracelular en hepatocitos de ratón primarios cultivadas en medio libre de suero.

La figura 11A es una gráfica de barras que muestra niveles de glucosa relativos en el medio de cultivo de hepatocito de ratón tratado con control basal (vehículo agua), insulina 10 o 100 nM (Ins), 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE, y combinaciones de insulina y Compuestos CDE en la presencia o ausencia de 8-CPT/Dex durante 6 horas. # $P < 0.05$ vs grupo de control basal (la primera barra en la gráfica). * $P < 0.05$ vs el grupo de tratamiento de 8-CPT/Dex (la primera barra llena en la gráfica).

La figura 11B es una gráfica de barras que muestra niveles de LDH relativos en el medio de cultivo de células de hepatocito de ratón tratadas con control basal (vehículo agua), insulina 10 o 100 nM (Ins), 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE, y combinaciones de insulina y Compuestos CDE en la presencia o ausencia de 8-CPT/Dex durante 6 horas.

Las figuras 12A-12F muestran el efecto de los Compuestos CDE sobre los niveles de expresión de proteínas de Pdk1 fosforilado (pPdk1), Akt en serina 473 (pAktS473), Foxo1 en treonina 24 (pFoxo1T24), Foxo3 en treonina 32 (pFoxo3T32),

Foxo4 en treonina 28 (pFoxo4T28), y Gsk3b en serina 9 (pGsk3bS9) en hepatocitos de ratón primarios.

La figura 12A es una transferencia Western que muestra el efecto de un control, insulina, o 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE sobre niveles de proteína de pPdk1, pAktS473, pFoxo1T24, pFoxo3T32, pFoxo4T28, y pGsk3bS9 en hepatocitos de ratón primarios.

La figura 12B es una gráfica de barras que muestra los niveles de proteína pPdk1 relativos en hepatocitos de ratón tratados con un control, 100 nM de insulina, o 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE.

La figura 12C es una gráfica de barras que muestra los niveles de proteína pAktS473 relativos en hepatocitos de ratón tratados con un control, 100 nM de insulina, o 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE.

La figura 12D es una gráfica de barras que muestra los niveles de proteína pFoxo1T24 relativos en hepatocitos de ratón tratados con un control, 100 nM de insulina, o 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE.

La figura 12E es una gráfica de barras que muestra los niveles de proteína de pFoxo3T32 relativos en hepatocitos de ratón tratados con un control, 100 nM de insulina, o 150 ppb

o 300 ppb de los Compuestos CDE.

La figura 12F es una gráfica de barras que muestra los niveles de proteína de pGsk3bS9 relativos en hepatocitos de ratón tratados con un control, 100 nM de insulina, o 150 ppb o 300 ppb de los Compuestos CDE.

Las figuras 13A-13D muestran el efecto de tiempo del tratamiento de Compuestos CDE sobre los niveles de expresión de proteínas de Pdk1 fosforilado, Akt, Foxo1 y Foxo3 en hepatocitos de ratón primarios cultivados bajo condiciones libres de suero.

La figura 13A es una transferencia Western que muestra el efecto de los tratamiento de Compuestos CDE durante 0 minuto, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, y 3 horas sobre niveles de proteína de pPdk1, pAktT308, pFoxo1T24, pFoxo3T32, Akt, y Actb en hepatocitos de ratón primarios.

La figura 13B es una gráfica de barras que muestra los niveles de proteína pPdk1 relativos después del tratamiento de hepatocitos de ratón con Compuestos CDE durante 0 minuto, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, y 3 horas. * *P* por lo menos < 0.05 cuando se compara con tratamiento sin Compuestos CDE (grupo de 0 minuto).

La figura 13C es una gráfica de barras que muestra los

niveles de proteína pAktT308 relativos después del tratamiento de hepatocitos de ratón con Compuestos CDE durante 0 minuto, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, y 3 horas. # $P < 0.15$, * P por lo menos < 0.05 cuando se compara
5 con tratamiento sin Compuestos CDE (grupo de 0 minuto).

La figura 13D es una gráfica de barras que muestra los niveles de proteína de pFoxo1T24 y pFoxo3T32 combinados después del tratamiento de hepatocitos de ratón con
10 Compuestos CDE durante 0 minuto, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, y 3 horas. # $P < 0.15$, * P por lo menos < 0.05 cuando se compara con tratamiento sin Compuestos CDE (grupo de 0 minuto).

15 Las figuras 14A-14B muestran el efecto de los Compuestos CDE sobre los niveles de glucosa en sangre en ratones *Lepr*^{db/db}.

La figura 14A es una gráfica de barras que muestra los
20 niveles de glucosa en sangre en ratones *Lepr*^{db/db} después de ser inyectados por vía intraperitoneal con salina fisiológica o Compuestos CDE cada dos días en ratón con edad de 27 días a 3.5 meses.

25 La figura 14B es una gráfica de barras que muestra los niveles de glucosa en sangre en ratones *Lepr*^{db/db} después de ser inyectados por vía intraperitoneal con salina fisiológica

o Compuestos CDE a diario en ratón con edad de 38 días a 66 días.

Las figuras 15A-15B muestran el efecto de los Compuestos CDE sobre la tolerancia a la glucosa en ratones *Lepr^{db/db}* después de ser inyectados por vía intraperitoneal con salina fisiológica o Compuestos CDE cada dos días en ratón con edad de 27 días a 3.5 meses.

La figura 15A es una gráfica que muestra el efecto de los Compuestos CDE sobre los niveles de glucosa en sangre en ratones *Lepr^{db/db}* tratados con solución salina y Compuestos CDE en el punto de tiempo cero (determinado inmediatamente antes de la inyección de glucosa) y diversos puntos de tiempo (0.25 hora, 0.5 hora, 1 hora y 2 horas) después de las inyecciones de glucosa. * *P* se refiere a por lo menos < 0.05 cuando se compara con grupo tratado con solución salina en el mismo punto de tiempo.

La figura 15B es una gráfica que muestra el análisis cuantitativo del área bajo la curva (AUC) de la gráfica en la figura 15A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

Como se utiliza aquí, los términos "administración" y "administrar" se refieren al acto de dar un fármaco, profármaco, u otro agente, o tratamiento terapéutico (por ejemplo, las composiciones de la presente solicitud) a un sujeto in vivo, in vitro o ex vivo a células, tejidos y órganos. . Los compuestos y composiciones de la presente descripción se pueden proporcionar al sujeto por cualquier ruta de administración de ejemplo al cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (tópica o transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalación), mucosa oral (bucal), cerebro, oído, rectal, vaginal, por inyección. Las rutas de inyección se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, y similares.

15

El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, y preferiblemente, por lo menos tres átomos de carbono. En algunas realizaciones, un grupo "alquilo" contiene 1 a 16 átomos de carbono (es decir., alquilo C₁₋₁₆), específicamente, en otras realizaciones, el alquilo comprende 3 a 16 átomos (es decir., alquilo C₃₋₁₆). El grupo alquilo se puede sustituir opcionalmente con un grupo acilo, amino, amido, azido, carboxilo, alquilo, arilo, halo, guanidinilo, oxo, sulfanilo, sulfenilo, sulfonilo, heterociclilo o hidroxilo. Ejemplos adicionales de un grupo alquilo incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, propilo, iso-propilo,

25

butilo, iso-butilo, butilo secundario, butilo terciario, pentilo, iso-pentilo, neo-pentilo, hexilo, iso-hexilo, 3-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, neo-hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, y hexadecilo.

En una realización de un alquilo C_3-C_{16} , el alquilo es un alquilo no sustituido. En otras realizaciones, el alquilo sustituido no tiene un grupo carboxilo y un grupo amino. En realizaciones adicionales, el alquilo C_3-C_{16} no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino.

El término "metal alcalino" se refiere a sales metálicas que incluyen, pero no se limitan a, sales apropiadas de metales alcalinos (grupo IA), sales de metales alcalinotérreos (grupo IIA), y otros metales fisiológicamente aceptables. Dichas sales metálicas se pueden elaborar a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc o combinaciones de los mismos.

El término "alquenilo" se refiere a una cadena de carbono recta o ramificada que comprende por lo menos un enlace doble carbono a carbono. En algunas realizaciones, "alquenilo" se refiere a un hidrocarburo que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono (es decir., alquenilo C_{1-10}). Ejemplos de un grupo alquenilo incluyen, pero no se limitan a, eteno, propeno, buteno, penteno,

hexeno, hepteno, octeno, noveno y deceno. El grupo alquenilo se puede sustituir opcionalmente con un grupo amino, alquilo, halo, o hidroxilo.

5 El término "amido" se refiere a ya sea un grupo C-amido tal como una unidad estructural $--CONR'R''$ o un grupo N amido tal como una unidad estructural $--R'COR''$ en la que R' y R'' pueden ser independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, carbocíclico, heterocíclico, arilo, o
10 aralquilo. Un grupo "sulfoamido" incluye la unidad estructural $--NR'--SO_2--R''$, en la que R' y R'' pueden ser hidrógeno, alquilo, arilo, o aralquilo.

El término "alquinilo" se refiere a una cadena de
15 carbono recta o ramificada que comprende por lo menos un enlace triple carbono a carbono. En las realizaciones de ejemplo, "alquinilo" se refiere a un hidrocarburo que contiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono (es decir., alquinilo C_{2-10}). Ejemplos de un grupo alquinilo
20 incluyen, pero no se limitan a, etino, propino, butino, pentino, hexino, heptino, octino, nonino y decino. El grupo alquinilo se puede sustituir opcionalmente con un grupo amino, alquilo, halo, o hidroxilo.

25 El término "arilo" se refiere a un sistema aromático carbocíclico que comprende uno, dos o tres anillos. Los anillos se pueden adherir juntos en una forma pendiente o se

pueden fusionar. El término "arilo" abarca grupos aromáticos tales como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, tetralina, indano, indeno, y bifenilo. El grupo arilo opcionalmente se puede sustituir con un grupo amino, alquilo, halo, hidroxilo, 5 carbocíclico, heterocíclico, u otro grupo arilo.

Una "combinación" como se utiliza aquí se refiere a una pluralidad de componentes. La combinación puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en átomos, 10 compuestos, composiciones, componentes, constituyentes, elementos, unidades estructurales, moléculas, o mezclas. Una combinación incluye, pero no se limita a, una mezcla.

El término "fusionado" significa que un segundo anillo 15 está presente (es decir, adherido o formado) al tener dos átomos adyacentes en común (es decir, compartidos) con el primer anillo. El término "fusionado" es equivalente a los términos "condensado", "adherido" y "unido", que se puede utilizar de forma intercambiable.

20

El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo de carbono monocíclico saturado o parcialmente saturado, que comprende un número de átomos en el anillo. En algunas realizaciones, "cicloalquilo" se refiere a un anillo de 25 carbono que contiene 3 a 12 átomos en el anillo (es decir cicloalquilo C₃₋₁₂). Como se utiliza aquí, un cicloalquilo abarca estructuras de anillo monociclo, puenteada, espiro,

fusionada, biciclo y triciclo. Ejemplos de un grupo cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, cicloheptenilo, norbornilo, decalin, adamantilo, y ciclooctilo. El grupo cicloalquilo se puede sustituir opcionalmente con un grupo amino, alquilo, halo, o hidroxilo.

El término "aralquilo" se refiere a unidades estructurales de alquilo sustituido con arilo. Los grupos aralquilo pueden ser grupos "aralquilo inferior", donde los grupos arilo se adhieren a grupos alquilo que tienen uno a seis átomos de carbono. Ejemplos de grupo aralquilo incluyen bencilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, feniletilo, y difeniletilo. Los términos "bencilo" y "fenilmetilo" son intercambiables. En algunas realizaciones, el alquilo es un alquilo C_3-C_{16} . En otras realizaciones, el alquilo no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino.

20

El término "ariloxi" se refiere a un grupo arilo adherido a un átomo de oxígeno. El grupo ariloxi se puede sustituir opcionalmente con un grupo halo, hidroxilo, o alquilo. Ejemplos de dichos grupos incluyen, pero no se limitan a, fenoxi, 4-cloro-3-etilfenoxi, 4-cloro-3-metilfenoxi, 3-cloro-4-etilfenoxi, 3,4-diclorofenoxi, 4-metilfenoxi, 3-trifluorometoxifenoxi, 3-trifluorometilfenoxi,

25

4-fluorofenoxi, 3,4-dimetilfenoxi, 5-bromo-2-fluorofenoxi, 4-bromo-3-fluorofenoxi, 4-fluoro-3-metilfenoxi, 5,6,7,8-tetranhidronaftiloxi, 3-isopropilfenoxi, 3-ciclopropilfenoxi, 3-etilfenoxi, 4-tert-butilfenoxi, 3-pentafluoroetilfenoxi, y
 5 3-(1,1,2,2-tetrafluoroetoxi) fenoxi.

El término "alcoxi" se refiere a grupos que contienen oxi sustituidos con un grupo alquilo, o cicloalquilo. Ejemplos de un grupo alcoxi incluyen, sin limitación, metoxi, etoxi, tert-butoxi, y ciclohexiloxi. Los grupos "alcoxi inferior" tienen uno a seis átomos de carbono, e incluyen, pero no se limitan a, grupos metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, isopropoxi, y tert-butoxi.

15 El término "aralcoxi" se refiere a un grupo aralquilo que contiene oxi adherido a través de un átomo de oxígeno a otros grupos. Los grupos "aralcoxi inferior" son grupos fenilo adheridos al grupo alcoxi inferior. Ejemplos de un grupo aralcoxi inferior incluye, pero no se limita a,
 20 benciloxi, 1-feniletoxi, 3-trifluorometoxibenciloxi, 3-trifluorometilbenciloxi, 3,5-difluorobenciloxi, 3-bromobenciloxi, 4-propilbenciloxi, 2-fluoro-3-trifluorometilbenciloxi, y 2-feniletoxi.

25 El término "acilo" se refiere a una unidad estructural -C(=O)R, en la que R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico, heterocíclico, arilo, o aralquilo.

Preferiblemente, R es hidrógeno, alquilo, arilo, o aralquilo.

El término "carboxilo" se refiere a una unidad estructural $--R'C(=O)OR''$, en la que R' y R'' son
 5 independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, carbocíclico, heterocíclico, heterocicloalquilo, arilo, éter, o aralquilo. R' adicionalmente puede ser un enlace covalente. un "carboxilo" incluye ácidos carboxílicos, y ésteres de ácido carboxílico.

10

El término "ácido carboxílico" se refiere a un grupo carboxilo en el que R'' es hidrógeno o una sal. Los ácidos carboxílicos incluyen, pero no se limitan a, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido
 15 valérico, ácido 2-metil propiónico, ácido oxirano-carboxílico, y ácido ciclopropano carboxílico.

El término "éster de ácido carboxílico" o "éster" se refiere a un grupo carboxilo en el que R'' es alquilo, alqueno, alquino, carbocíclico, heterocíclico, arilo, o
 20 aralquilo. Ejemplos de ácidos carboxílicos incluyen, pero no se limitan a, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butanoico, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido
 25 decanoico, ácido ciclopropanocarboxílico, ácido ciclobutanocarboxílico, ácido ciclopentanocarboxílico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido cicloheptanocarboxílico, ácido

ciclooctanocarboxílico, o ácido ciclononanocarboxílico.

El término "carbonilo" se refiere a una unidad estructural a C=O, también conocida como un grupo "oxo".

5

El término "heterociclo" o "heterociclilo" o "anillo heterocíclico" se refiere a un hidrocarburo cíclico, aromático o no aromático, saturado o no saturado, con 3 a 12 átomos de carbono. En las realizaciones de ejemplo, "heterociclilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico que contiene 3, 4, 5, o 6 átomos en el anillo (es decir, heterociclilo C₃₋₆). El heterociclo puede ser opcionalmente sustituido, saturado o no saturado. Normalmente, por lo menos uno de los átomos en el anillo es un Oxígeno (O), Nitrógeno (N), Azufre (S), Fósforo (P), o Selenio (Se). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un átomo de N en el anillo del heterociclilo es el átomo de unión a una unidad estructural -C(O) para formar una amida, un carbamato, o una urea. Ejemplos de un grupo heterocíclico incluyen, pero no se limitan a, aziridina, oxirano, tiirano, azetidina, oxetano, tietano, pirrolidina, imidazol, tetranhidrofurano, piran, tiopiran, tiomorfolina, tiomorfolina S-óxido, oxazolina, tetranhidrotiofeno, piperidina, tetranhidropiran, tiano, imidazolidina, oxodioxolenilo, oxazolidina, tiazolidina, dioxolano, ditiolano, piperazina, oxazina, ditiano, dioxano, piridinilo, furanilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, pirrolilo, tienilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo,

25

indolilo, imidazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, pirimidinilo, oxazolilo, triazinilo, y tetrastilo. Los heterociclos de ejemplo incluyen bencimidazol, dihidrotiofeno, dioxin, dioxano, dioxolano, ditiano, ditiazina, ditiazol, ditiolano, 5 furan, indol, 3-H indazol, 3-H-indol, indolizina, isoindol, isotiazol, isoxazol, morfolina, oxazol, oxadiazol, oxatiazol, oxatiazolidina, oxazina, oxadiazina, piperazina, piperidina, purina, piran, pirazina, pirazol, piridina, pirimidina, pirimidina, piridazina, pirrol, pirrolidina, 10 tetranhidrofurano, tetrazina, tiadiazina, tiadiazol, tiatriazol, tiazina, tiazol, tiofeno, triazina, y triazol. El heterociclo se puede sustituir opcionalmente con un grupo amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, hidroxilo, carbocíclico, tio, otro heterocíclico, o arilo.

15

El término "heteroarilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico, donde por lo menos una de una pluralidad de átomos en el anillo es un O, N, S, P o Se. El anillo del heterorarilo se caracteriza por electrones [pi] 20 deslocalizados (aromaticidad) compartidos entre los miembros en el anillo. Las unidades estructurales heteroarilo como se define aquí puede tener manos de unión de carbono (C), N, S, P o Se. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un átomo N en el anillo del heteroarilo es el átomo de unión a una unidad 25 estructural -C(O) para formar una amida, carbamato, o urea. En las realizaciones de ejemplo, el "heteroarilo" se refiere a un cíclico que comprende 5 o 6 átomos en el anillo (es

decir heteroarilo C_{5-6}). Ejemplos de un grupo heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, pirrol, furan, tieno, oxazol, tiazol, isoxazol, isotiazol, imidazol, pirazol, oxadiazol, tiadiazol, triazol, tetrazol, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, y triazina.

El término "hidroxi" o "hidroxilo" se refiere al sustituyente -OH. El término "oxo" se refiere al sustituyente =O. El término "nitro" se refiere a NO_2 .

10

El término "azido" se refiere a N_3 .

El término "análogos azufre" se refiere a un análogo de un compuesto, en el que uno o más átomos de selenio se han reemplazado por uno o más átomos de azufre.

15

El término "sulfanilo" se refiere a una unidad estructural --SR', donde R' es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, carbocíclico, heterocíclico, arilo, o aralquilo.

20

El término "sulfenilo" se refiere a una unidad estructural --SOR', donde R' es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, carbocíclico, heterocíclico, arilo, o aralquilo.

25

El término "sulfonilo" se refiere a una unidad estructural --SOR', donde R' se refiere a hidrógeno, alquilo,

alquienilo, alquinilo, carbocíclico, heterocíclico, arilo, o aralquilo.

El término "cetona" se refiere a una unidad estructural
 5 que contiene por lo menos un grupo carbonilo donde el carbono
 del carbonilo se une a dos otros átomos de carbono. En las
 realizaciones de ejemplo, una "cetona" se refiere a una
 unidad estructural que contiene carbonilo que contiene 3, 4,
 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono (es decir., cetona C₃₋
 10 ₁₀). Ejemplos de un grupo cetona incluyen, pero no se limitan
 a, acetona, butanona, pentanona, hexanona, heptanona,
 octanona, nonanona, decanona, ciclobutanona, ciclopentanona,
 ciclohexanona, cicloheptanona, ciclooctanona, ciclónonanone y
 ciclodecanona.

15

El término "amino" se refiere a un grupo primario,
 secundario o terciario que tiene la fórmula, --NR'R'' en el
 que R' y R'' son independientemente hidrógeno, acilo,
 alquilo, alquienilo, alquinilo, aralquilo, arilo, carboxilo,
 20 cicloalquilo, heterocíclico, u otro grupo amino (como en el
 caso de hidrazida). R' y R'' junto con el átomo de nitrógeno
 al cual se adhieren, forman un anillo que tiene 4 a 8 átomos.
 Por lo tanto, el término "amino", incluye grupos aminos no
 sustituido, monosustituido (por ejemplo, monoalquilamino o
 25 monoarilamino), y disustituido (por ejemplo, dialquilamino o
 aralquilamino). Los grupos amino incluyen una unidad
 estructural --NH₂, metilamino, etilamino, dimetilamino,

dietilamino, metil-etilamino, pirrolidin-1-ilo o piperidino, morfolino, etc. Otros grupos "amino" de ejemplo que forman un anillo incluyen pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolizininilo, imidazolilo, isoindolilo, indolilo, indazolilo, purinilo, quinolizininilo. El anillo que contiene el grupo amino se puede sustituir opcionalmente con otro grupo amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, o hidroxilo.

10

El término "amina" se refiere a un grupo amino primario, secundario o terciario amino de la fórmula $--NR'R''$ en el que R' y R'' como se utiliza en esta definición son independientemente hidrógeno, acilo, alquilo, alquienilo, alquinilo, aralquilo, arilo, carboxilo, cicloalquilo, heterocíclico, u otro amino (en el caso de hidrazida) o R' y R'' junto con el átomo de nitrógeno al cual se adhieren, forman un anillo que tiene 4-8 átomos. Por lo tanto, el término "amino", como se utiliza aquí, incluye grupos amino no sustituido, monosustituido (por ejemplo, monoalquilamino o monoarilamino), y disustituido (por ejemplo, dialquilamino o aralquilamino). Los grupos amino incluyen $--NH_2$, metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metil-etilamino, pirrolidin-1-ilo o piperidino, morfolino, etc. Otros grupos "amino" de ejemplo que forman un anillo, incluyen, pero no se limitan a, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo,

25

piridazinilo, indolizininilo, imidazolilo, isoindolilo, indolilo, indazolilo, purinilo, quinolizininilo. El anillo que contiene el grupo amino se puede sustituir opcionalmente con otro grupo amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, o
5 hidroxilo.

El término "alcohol" se refiere a "hidroxi", "hidroxilo", o cualquier sustituyente que comprende la unidad estructural -OH.

10

El término "alcohol amino" se refiere a un grupo funcional que contiene un alcohol y un grupo amina. Los "alcoholes amino" también se refieren a aminoácidos que tienen un carbono unido a un alcohol en lugar del grupo ácido
15 carboxílico. En las realizaciones de ejemplo, un "alcohol amino" comprende una amina unida al carbono adyacente al carbono que lleva alcohol. En las realizaciones de ejemplo, "alcohol amino" se refiere a una amina y la unidad estructural que contiene alcohol que contiene 1 , 2, 3, 4, 5,
20 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 átomos de carbono (es decir, alcohol amino C₁₋₁₂). Ejemplos de alcoholes amino incluyen, pero no se limitan a, etanolamina, heptaminol, isoetarina, norepinefrina, propanolamina, esfingosina, metanolamina, 2-amino-4-mercaptobutan- 1 -ol, 2-amino-4-(metiltio)butan- 1 -
25 ol, cisteinol, fenilglicinol, prolinol, 2-amino-3 -fenil- 1-propanol, 2-amino-1-propanol, ciclohexilglicinol, 4-hidroxi-prolinol, leucinol, tert-leucinol, fenilalaninol, a-

fenilglicinol, 2-pirrolidinemetanol, tirosinol, valinol, serinol, 2-dimetilaminoetanol, histidinol, isoleucinol, leucinol, metioninol, 1-metil-2-pirrolidinemetanol, treoninol, triptofanol, alaninol, argininol, glicinol, 5 glutaminol, 4-amino-5-hidroxipentanamida, ácido 4- amino-5-hidroxipentanoico, ácido 3-amino-4-hidroxibutanoico, lisinol, 3-amino-4- hidroxibutanamida, y 4-hidroxi-prolinol.

El término "aminoácido" se refiere a un grupo que 10 contiene un ácido carboxílico y una amina unida al átomo de carbono inmediatamente adyacente al grupo carboxilato, e incluye aminoácidos natural y sintético. Ejemplos de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, 15 treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano. En algunas realizaciones, el carboxilo se sustituye con H, una sal, éster, alquilo, o aralquilo. El grupo amino también se puede 20 sustituir con H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, carboxilo, cicloalquilo, aralquilo, o heterociclilo.

El término "éter" se refiere a la unidad estructural -- R'--O--R'', en la que R' y R'' son independientemente 25 hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico, heterocíclico, arilo, o aralquilo. R' adicionalmente puede ser un enlace covalente adherido a un carbono.

El término "halógeno" se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

5 El término "haluro" se refiere a un grupo funcional que contiene un átomo unido a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Las realizaciones de ejemplo divulgadas aquí pueden incluir los grupos "haluro de alquilo", "haluro de alqueno", "haluro de alquino", "haluro de cicloalquilo",
10 "haluro de heterociclilo", o "haluro de heteroarilo". En las realizaciones de ejemplo, " haluro de alquilo" se refiere a una unidad estructural que contiene un enlace de carbono - halógeno que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono (es decir., haluro de alquilo C₁₋₁₀). Ejemplos de
15 un grupo haluro de alquilo incluyen, pero no se limitan a, grupos fluorometilo, fluoroetilo, clorometilo, cloroetilo, bromometilo, bromoetilo, yodometilo y yodoetilo. A menos que se indique lo contrario, cualquier grupo que contiene carbono mencionado aquí puede contener uno o más enlaces de carbono-
20 halógeno. Por vía de ejemplo no limitante, un grupo alquilo C₁ puede ser, pero no se limita a, metilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, bromometilo, dibromometilo, tribromometilo, yodometilo, diyodometilo, triyodometilo, clorofluorometilo,
25 diclorofluorometilo, y difluoroclorometilo.

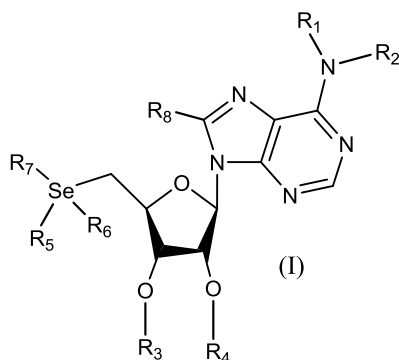
En los compuestos descritos aquí, los heteroátomos son

capaces de soportar múltiples valencias diferentes. A modo de ejemplo no limitante, S, Se y N pueden ser neutro o tienen una carga positiva. Adicionalmente O, puede ser neutro o tiene una carga positiva o negativa.

5

Las realizaciones de ejemplo de los compuestos de acuerdo con la fórmula (I), (II) o (III) que pueden abarcar los diastereómeros y enantiómeros de los compuestos ilustrados. Los enantiómeros se definen como uno de un par de entidades moleculares que son imágenes especulares entre sí y no superponibles. Los diastereómeros o diastereoisómeros se definen como estereoisómeros distintos de enantiómeros. Los diastereómeros o diastereoisómeros son estereoisómeros que no están relacionados como imágenes especulares. Los diastereoisómeros se caracterizan por diferencias en las propiedades físicas.

Una realización de la presente descripción puede comprender un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I):



20

o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente

aceptable del mismo. R_1 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto
 5 con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R_2 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el
 10 que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

15

R_3 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con
 R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por
 20 lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R_4 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con
 R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo
 25 heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

R₅ es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

5 R₆ es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

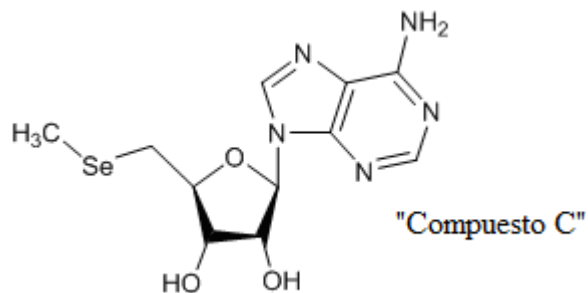
R₇ es un alquilo C₃-C₁₆, en el que el alquilo C₃-C₁₆ es
 10 un alquilo no sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alquenilo, alquinilo, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína,
 15 selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', S- R', en el que R' para OR' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el que
 20 R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el que R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo; y

25

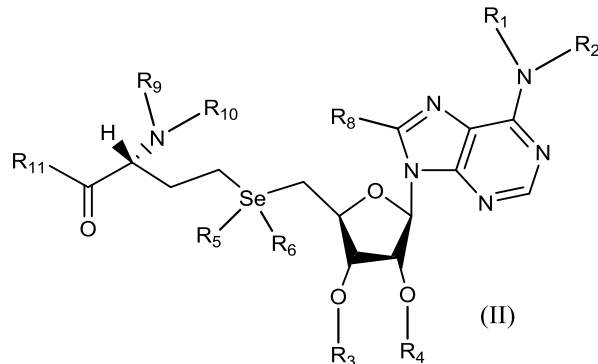
R₈ es hidrógeno, azido, alquilo, alquenilo, alquinilo.

El término "Compuesto C" se refiere a 5'-Metilselenoadenosina, también conocido como (2R,4S,5S)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-5-((metilselanil)metil)tetranhidrofuran-3,4-diol (Número de Registro CAS 5135-40-0), e incluye

5 cualesquier sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



Otra realización de la presente descripción puede comprender un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II):



10

o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

15 R_1 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo

heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

5 R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

10

R_3 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

15

R_4 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

20

R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

25

R_6 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo,

OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

R₈ es hidrógeno, azido, alquilo, alqueno, alquino;

5

R₉ es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C(O)R', C(O)OR', donde R' es alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R₉ junto con R₁₀ forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

10

R₁₀ es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C(O)R', C(O)OR', donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R₉ junto con R₁₀ forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno; y

15

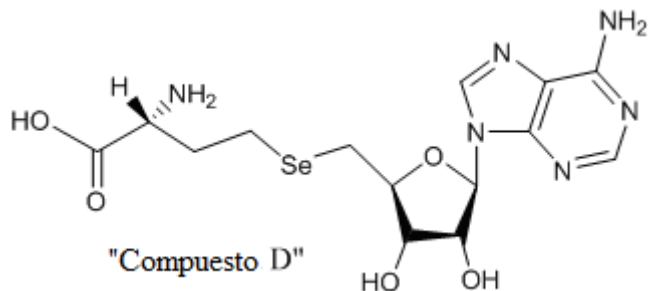
20

R₁₁ es OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna.

25

El término "Compuesto D" se refiere a 5'-Selenoadenosil homocisteína; ácido (2R)-2-amino-4-(((2S,3S,5R)-5-(6-amino-

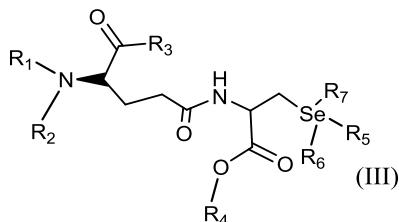
9H-purin-9-il)-3,4-dihidroxitetranhidrofuran-2-il)metil)selanil)butanoico (Número de Registro CAS 4053-91-2), e incluye cualesquier sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



5

e

Una realización adicional de la presente descripción puede comprender un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III):



10

o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

15 R₁ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C(O)R', C(O)OR', en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R₁ junto con R₂ forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por
20 lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R₂ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C(O)R', C(O)OR', en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R₁ junto con R₂ forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R₃ es OH, OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna;

R₄ es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna;

R₅ es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

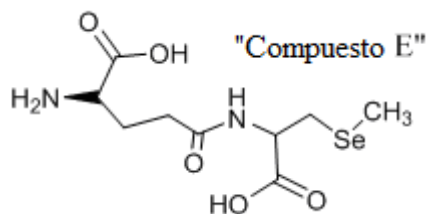
R₆ es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo; y

R₇ es un alquilo C₃-C₁₆, en el que el alquilo C₃-C₁₆ no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y

un grupo amino, alquénilo, alquinilo, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', S- R', en el que R' para OR' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el que R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo.

15

El término "Compuesto E" se refiere a γ -L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína; también conocido como N5-(1-carboxi-2-(metilselanil)etil)-L-glutamina, o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

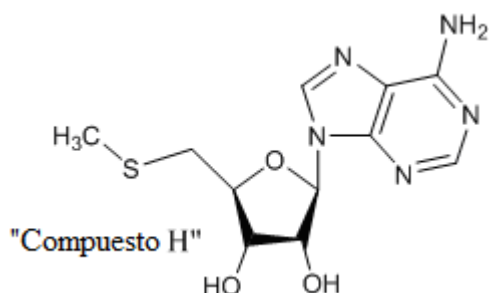


20

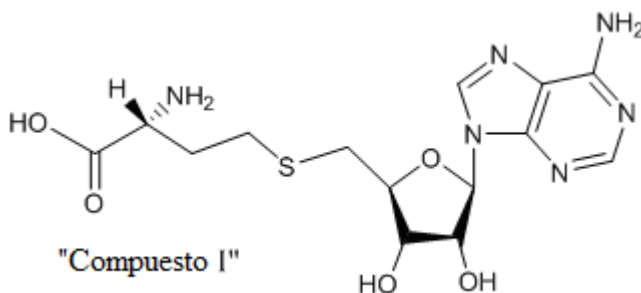
Los términos "Compuesto CDE", "Compuestos CDE", "Compuesto de combinación de CDE" o "Compuesto CDE en combinación" se refiere a una combinación o mezcla de

Compuesto C, Compuesto D y Compuesto E, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

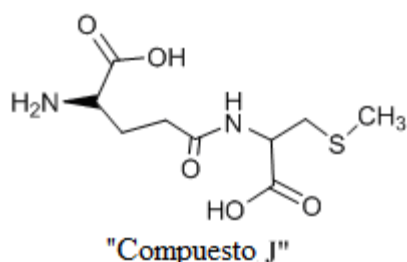
El término "Compuesto H" se refiere a 5'-Metiltioadenosina; 5'-S-Metil-5'-tioadenosina (Registro CAS No. 2457-80-9), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



El término "Compuesto I" se refiere a S-Adenosil-L-homocisteína, también conocido como (S)-5'-(S)-(3-Amino-3-carboxipropil)-5'-tioadenosina (Registro CAS No. 979-92-0), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



El término "Compuesto J" se refiere a γ-L-glutamyl-metil-L-cisteína, también conocido como Gama-glutamyl-metil-cisteína, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



El término "Compuesto HIJ" se refiere a una mezcla de
 Compuesto H, Compuesto I y Compuesto J, o sales
 5 farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los términos "análogo" y "derivado" son intercambiables
 y se refieren a una modificación natural o no natural de por
 lo menos una posición de una molécula dada. Por ejemplo, un
 10 derivado de un compuesto o molécula dada se puede modificar
 ya sea por adición de un grupo funcional o átomo, eliminación
 de un grupo funcional o átomo o cambio de un grupo funcional
 o átomo a un grupo funcional o átomo diferente (que incluyen,
 pero no se limita a, isótopos).

15

El término "que comprende" se refiere a una composición,
 compuesto, formulación o método que es inclusive y no excluye
 elementos adicionales o etapas de método. El término "que
 comprende" también se refiere a una composición, compuesto,
 20 formulación, o método de las realizaciones de la presente
 descripción que es inclusive y no excluyen elementos
 adicionales o etapas del método.

El término "que consiste de" se refiere a un compuesto,

composición, formulación, o método que excluye la presencia de cualquier componente adicional o etapas del método. El término "que consiste de" también se refiere a un compuesto, composición, formulación, o método de la presente descripción
5 que excluye la presencia de cualquier componente adicional o etapas del método.

El término "que consiste esencialmente de" se refiere a una composición, compuesto, formulación o método que es
10 inclusive de elementos adicionales o etapas del método que no afectan materialmente las características de la composición, compuesto, formulación o método. El término "que consiste esencialmente de" también se refiere a una composición, compuesto, formulación o método de la presente descripción
15 que es inclusive de elementos adicionales o etapas del método que no afectan materialmente las características de la composición, compuesto, formulación o método.

El término "compuesto (s)" se refiere a cualquiera de
20 una o más entidades químicas, unidades estructurales farmacéuticas, fármacos, y similares que se pueden utilizar para tratar, diagnosticar o prevenir una enfermedad, dolencia, mareo o trastorno de la función corporal. Se puede determinar que un compuesto es terapéutico al utilizar los
25 métodos de detección de la presente solicitud.

El término "composición(es)" se refiere a la combinación

de uno o más compuestos con o sin otro agente, tales como, pero no limitado a un agente portador. (por ejemplo, uno o más compuestos que contienen selenio con un portador, inerte o activo, haciendo la composición especialmente adecuada para
5 uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

El término "componente" se refiere a una parte constituyente de un compuesto o una composición. Por ejemplo, los componentes de una composición pueden incluir un
10 compuesto, un portador, y cualquier otro agente presente en la composición.

El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una composición o compuesto suficiente para efectuar
15 resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad efectiva se puede administrar en una o más aplicaciones o dosificaciones y no pretende estar limitada a una formulación particular o ruta de administración.

20 El término "hidrato" se refiere a un compuesto que se asocia con agua en la forma molecular (es decir, en la que no se divide el enlace H- OH, y puede ser representado, por ejemplo, por la fórmula $R \times H_2O$, donde R es un compuesto descrito aquí. Un compuesto dado puede formar más de un
25 hidrato que incluye, por ejemplo, monohidratos ($R \times H_2O$), dihidratos ($R_2 \times H_2O$), trihidratos ($R_3 \times H_2O$), y similares.

El término "inhibidor" o "antagonista" se refiere a la propiedad de un compuesto que disminuye, limita, o bloquea la acción o función de otro compuesto.

5 El término "aislado" se refiere a la separación de un material a partir de por lo menos un otro material en una mezcla o de materiales que se asocian naturalmente con el material. Por ejemplo, un compuesto sintetizado de forma sintética se separa de un material de partida o un
10 intermedio.

Un "compuesto terapéutico conocido" se refiere a un compuesto terapéutico que se ha mostrado (por ejemplo, a través de ensayos con animales o experiencia anterior con
15 administración a humanos) ser efectivo en un tratamiento. En otras palabras, un compuesto terapéutico conocido no se limita a un compuesto conocido o que se muestra ser eficaz en el tratamiento de enfermedad (por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas).

20

El término "potencial mitocondrial" se refiere a la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna mantenida por el movimiento neto de cargas positivas a través de la membrana.

25

El término "modula metabolismo de glucosa" se refiere a un cambio en el estado (por ejemplo, actividad o cantidad) de

un de un estado conocido o determinado en una célula u organismo vivo de una ruta bioquímica que forma, convierte o descompone la glucosa o componente del mismo.

5 "Opcional" u "opcionalmente" se refiere a una circunstancia en la que puede o no puede ocurrir el evento o circunstancia descrito posteriormente, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y casos en los que no ocurre. "Opcionalmente" es inclusive de
10 realizaciones en las que están presentes las condiciones descritas y realizaciones en las que la condición descrita no está presente. Por ejemplo, "fenilo opcionalmente sustituido" significa que el fenilo puede o no ser sustituido y que la descripción incluye ambos fenilo no sustituido y fenilo en el
15 que existe sustitución.

El término "selenio orgánico" o "compuesto seleno-orgánico" se refiere a cualquier compuesto orgánico en el que el selenio reemplaza el azufre. Por lo tanto, el selenio
20 orgánico puede referirse a cualquiera de dichos compuestos biosintetizados por la levadura, o compuestos seleno-orgánicos libres que se sintetizan químicamente, tal como selenometionina.

25 Los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan de forma intercambiable y se refieren a cualquier integrante del reino Animalia. Un sujeto puede ser un mamífero, tal como un

humano, mamífero domesticado (por ejemplo, perro o gato), o un mamífero de ganado (por ejemplo, vaca/ganado o cerdo/porcino).

5 El término "ppb" como se utiliza aquí se refiere a partes por mil millones con base en selenio para compuestos que contienen selenio o con base en azufre para compuestos que contienen azufre. Ejemplos de compuestos que contienen selenio son Compuesto C, Compuesto D, y Compuesto E. Ejemplos
10 de compuestos que contienen azufre son el Compuesto H, Compuesto I, y Compuesto J. Con el fin de convertir ppb con base en selenio a ppb del compuesto que contiene selenio multiplicando el ppb indicado por los siguientes factores: 4.35 para el Compuesto C, 5.46 para el Compuesto D, y 3.94
15 para el Compuesto E. Con el fin de convertir ppb con base en azufre a ppb del compuesto que contiene azufre multiplicando el ppb indicado por los siguientes factores: 9.28 para el Compuesto H, 12.00 para el Compuesto I, y 8.25 para el Compuesto J.

20

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, las composiciones y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de
25 seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable.

El término "portador" se refiere a un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material
5 farmacéuticamente aceptable, composición o control, tal como un relleno, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, implicado en llevar o transportar el compuesto que contiene selenio, análogo o derivado desde un órgano, o porción del cuerpo, hasta otro
10 órgano, o porción del cuerpo. Un portador debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente o sujeto.

Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como
15 portadores farmacéuticamente aceptables que puede servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa, y sus derivados, tales como
20 carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite
25 de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol;

(12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo;
(13) agar; (14) agentes de regulación, tales como hidróxido
de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico;
(16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica;
5 (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20)
soluciones reguladoras de fosfato; y (21) otras sustancias
compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones
farmacéuticas.

10 El término "profármaco" se refiere a un compuesto
farmacológicamente activo. Más normalmente, un "profármaco"
se refiere a un compuesto inactivo que se convierte en un
agente farmacológicamente activo por una transformación
metabólica. Un profármaco de un compuesto o composición
15 descrita aquí se preparan al modificar grupos funcionales
presentes en el compuesto de cualquiera de las fórmulas
anteriores de una manera tal que las modificaciones se pueden
dividir *in vivo* para liberar el compuesto progenitor. Un
profármaco puede experimentar fácilmente cambios químicos *in*
20 *vivo* bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, hidrólisis o
catálisis de enzima) lo que resulta en la liberación del
agente farmacológicamente activo. Los profármacos incluyen
compuestos de cualesquiera de las fórmulas descritas aquí, en
las que un grupo hidroxilo, amino, o carboxi se une a cualquier
25 grupo que se puede dividir *in vivo* para regenerar el grupo
hidroxilo, amino o carboxi, respectivamente. Ejemplos de
profármacos incluyen, pero no se limitan a ésteres (por

ejemplo, derivados de acetato, formiato, y benzoato) de compuestos de cualquiera de las fórmulas anteriores o cualquier otro derivado, que al ser llevado al pH fisiológico o a través de acción de enzima se convierte en el fármaco progenitor activo. Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados de profármacos adecuados se describen en la técnica (véase, por ejemplo, Bundgaard. Design of Prodrugs. Elsevier, 1985).

El término "purificado" o "sustancialmente purificado" se refiere a la eliminación de componentes inactivo o inhibidores (*por ejemplo*, contaminantes) a partir de una composición al grado que 10% o menos (*por ejemplo*, 10% o menos, 9% o menos, 8% o menos, 7% o menos, 6% o menos, 5% o menos, 4% o menos, 3% o menos, 2% o menos, o 1% o menos) de la composición comprende componentes inactivos, compuestos, o portadores farmacéuticamente aceptables.

El término "sales" puede incluir sales de adición de ácido o sales de adición de bases libres. Ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos tales como nítrico, fosfórico, sulfúrico, o bromhídrico, yodhídrico, fluorhídrico, fosforoso, así como sales derivadas de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo,

ácidos hidroxilo alcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos
 aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y
 ácidos acético, maleico, succínico, o cítricos. Ejemplos no
 limitantes de dichas sales incluyen napadisilato, besilato,
 5 sulfato, piro sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato,
 fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato,
 metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato,
 trifluoroacetato, propionato, caprilato, isobutirato,
 oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato,
 10 maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato,
 dinitrobenzoato, ftalato, bencenosulfonato, toluenosulfonato,
 fenilacetato, citrato, lactato, maleato, tartrato,
 metanosulfonato, y similares. También se contemplan sales de
 aminoácidos tales como, pero no limitado a arginato,
 15 gluconato, galacturonato y otras sales, tales como, pero no
 limitadas a aquellas divulgadas en Berge, et al.
 "Pharmaceutical Salts", J. Pharma Sci. 1977; 66: 19).

La frase "sales farmacéuticamente aceptables" incluye,
 20 pero no se limita a, sales bien conocidas por aquellos
 expertos en la técnica. Por ejemplo, mono-sales (por ejemplo
 sales de metal alcalino y de amonio) y polisales (por ejemplo
 di- o tri-sales,) de la invención. Las sales
 farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la
 25 descripción se preparan, por ejemplo, cuando un grupo
 intercambiable, tal como hidrógeno en las unidades
 estructurales --OH, --NH- , o --P(=O)(OH)--, se reemplaza con

un catión farmacéuticamente aceptable (por ejemplo un ión de sodio, potasio, o amonio) y se puede preparar de forma conveniente a partir de un compuesto correspondiente descrito aquí, por ejemplo, mediante reacción con una base adecuada.

5

En los casos donde los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas no tóxicas, puede ser apropiada la administración de los compuestos como sales. Ejemplos de sales farmacéuticamente
10 aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológico aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, alfa-ketoglutarato, y alfa-glicerofosfato. También se pueden
15 formar sales inorgánicas adecuadas, que incluyen sales de clorhidrato, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, al hacer reaccionar un compuesto
20 suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden elaborar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

25

Los términos "levadura enriquecida con selenio" y "levadura selenizada" se refieren a cualquier levadura (por

ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que se cultiva en un medio que contiene una fuente de selenio, tales como sales de selenio inorgánicas. La cantidad de selenio residual en el producto acabado generalmente es muy bajo (por ejemplo, menos de 2%)

El término "sustituido" en relación con una unidad estructural se refiere a un sustituyente adicional que se une a cualquier ubicación aceptable en la unidad estructural. A menos que se indique lo contrario, las unidades estructurales se pueden unir a través de un carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, o cualquier otro átomo aceptable. Los ejemplos de sustituyentes incluyen, pero no se limitan a aminas, alcoholes, tioles, éteres, alquenos, alquinos, epóxidos, aziridinas, oxiranos, azetidinas, dihidrofuranos, pirrolidinas, piranos, piperidinas, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos, carboxilatos, iminas, imidas, azidas, grupos azo, enaminas, haluros de alquilo, haluros de alqueno, haluros de alquino, haluros de arilo, fosfinas, óxidos de fosfina, fosfinitos, fosfonitos, fosfitos, fosfonatos, fosfatos, sulfatos, sulfóxidos, grupos sulfonilo, grupos sulfoxilo, sulfonatos, nitratos, nitritos, nitrilos, grupos nitro, grupos nitrosos, cianatos, tiocianatos, isotiocianatos, carbonatos, haluros de acilo, peróxidos, hidroperóxidos, hemiacetales, hemicetales, acetales, cetales, ortoésteres, ésteres de ortocarbonato, sulfuros, disulfuros, ácidos sulfónicos, ácidos sulfónicos, tionas, tiales,

fosfodiésteres, ácidos borónicos, ésteres borónicos, ácidos borónicos y ésteres borónicos.

Los términos "tratar", "trata" o "tratamiento" se
5 refieren al tratamiento terapéutico en el que el objeto es
reducir (por ejemplo, disminuir o retardar) la aparición de
una afección fisiológica no deseada, para reducir los
síntomas de un trastorno o enfermedad presente o para obtener
resultados beneficiosos o deseados tales como restauración o
10 inhibición parcial o total en decline de un parámetro, valor,
función, métrica o resultado que es o se vuelve anormal. Los
resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero no se
limitan a, alivio de los síntomas; disminución de la
extensión o el vigor o tasa de desarrollo de la afección,
15 trastorno o enfermedad; estabilización (es decir, no
empeoramiento) del estado de la afección, trastorno o
enfermedad; retardo en el inicio o ralentización de la
progresión de la afección, trastorno o enfermedad; mejora de
la afección, trastorno o estado de enfermedad; y remisión (ya
20 sea parcial o total), ya sea o no que se traduzca en
disminución inmediata de los síntomas clínicos reales, o la
mejora o potenciación de la afección, trastorno o enfermedad.

El término "reactivo (s) capaz de detectar
25 específicamente la expresión de genes" se refiere a reactivos
capaces de o suficientes para detectar la expresión de
diversos genes descritos aquí. Ejemplos de reactivos

adecuados incluyen, pero no se limitan a, cebadores o sondas de ácido nucleico capaces de hibridarse específicamente con mARN o cADN, y anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos monoclonales o policlonales).

5

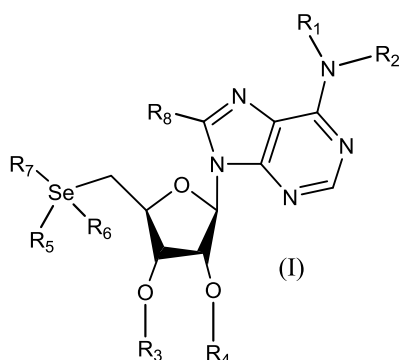
El término "tóxico" se refiere a cualquier efecto perjudicial o nocivo en un sujeto, una célula, o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de administración de la sustancia tóxica.

10

COMPUESTOS Y COMPOSICIONES

La presente descripción se dirige a composiciones selenoórgánicas, composiciones, y métodos para utilizar los
15 compuestos y composiciones. Los compuestos y composiciones descritos aquí pueden reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en diversas rutas biológicas. Las composiciones, los compuestos y métodos de la
20 presente descripción no parecen de forma adversa el metabolismo de glucosa en células de hígado de tal manera que también se pueden utilizar para tratar o prevenir Diabetes Mellitus No Dependiente de Insulina (Tipo II).

25 Una realización de la presente descripción se dirige a una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de un compuesto de la Fórmula (I):



o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

R_1 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

10

R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

15

R_3 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo

20

heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

5 R_4 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno.

10 R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; donde R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

15 R_6 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; donde R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo.

R_7 es un alquilo C_3-C_{16} , en el que el alquilo C_3-C_{16} es un alquilo no sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alquenilo, alquinilo, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', S- R', donde R' para OR' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo,

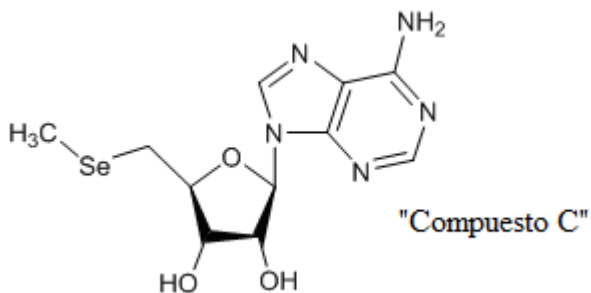
20

25

cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo; y

R₈ es hidrógeno, azido, alquilo, alquenilo, alquinilo.

Una realización adicional de las composiciones descritas aquí puede comprender, consistir esencialmente de, o consiste de 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto C"), y cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. El Compuesto C es (2R,4S,5S)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-5-((metilselanil)metil)tetranhidrofuran-3,4-diol (Número de Registro CAS 5135-40-0), e incluye cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



20

Una composición de la presente descripción puede comprender, consiste esencialmente de, o consiste de un compuesto de la Fórmula (I), el Compuesto C, y combinaciones

de los mismos. Por ejemplo, un aspecto de la presente solicitud proporciona composiciones que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, un compuesto de la Fórmula (I), y
 5 combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, se pueden sintetizar, aislar y/o purificar uno o más de estos compuestos.

En algunas realizaciones, la composición comprende,
 10 consiste esencialmente de, o consiste de por lo menos 5'-Metilselenoadenosina, y un otro compuesto. En otras realizaciones, el otro compuesto es un compuesto que contiene selenio. En realizaciones adicionales, la composición comprende una relación de 5'-Metilselenoadenosina con el otro
 15 compuesto (por ejemplo, un compuesto que contiene selenio) de por lo menos 1:1 a 100:1, 1:1 a 50:1, 1:1 a 10:1, 1:1 a 6:1, o 1:1 a 3:1.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición
 20 que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R_1 , R_3 , R_4 y R_8 son cada uno H; R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo,
 25 cicloalquilo, $C(O)R'$, o $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; R_5 y R_6 están cada uno ausente; y R_7 es un alquilo C_3 - C_{16} , en el

que el alquilo C₃-C₁₆ no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alquenoilo, alquinoilo, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', S- R', donde R' para OR' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo.

En una realización específica, se proporciona una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) a por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v) de un compuesto, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la Fórmula (I) o 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto C"). En otra realización, la composición excluye 5'-Selenoadenosil homocisteína y/o Gama-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína. En aún realizaciones adicionales, la composición excluye una o más de 5'-Metiltioadenosina, S-Adenosil-L-homocisteína, y Gama-

glutamil-metil-cisteína. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), o 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto C"), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, con la condición que se excluyan una o más de 5'-Metiltioadenosina, Gama-glutamil-metil-cisteína, o adenosil homocisteína, homocisteína, o metionina.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R_1 , R_3 , R_4 y R_8 son cada uno H; R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, o $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; R_5 y R_6 están cada uno ausente; y R_7 es alquilo seleccionado del grupo que consiste de iso-propilo, butilo, iso-butilo, butilo secundario, butilo terciario, pentilo, iso-pentilo, neo-pentilo, hexilo, iso-hexilo, 3-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, neo-hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, y hexadecilo, o aminoácido.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), o 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto C") o una sal, hidrato o

profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R_1 , R_3 , R_4 y R_8 son cada uno H; R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; R_5 y R_6 están cada uno ausente; y R_7 es alquilo o aminoácido; con la condición que 5'-selenoadenosil metionina, dehidroxi 5'-metilselenoadenosina, etilselenoadenosina, seleno(hidroxil)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), alilselenoadenosil homocisteína, seleno-adenosil homocisteína, seleno-hidroxi adenosil homocisteína, seleno adenosina, seleno-adenosil-Se(metil)-selenóxido, adenosil-hidroxi selenóxido, etil selenoadenosina, seleno-(hidroxil)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), adenosil-hidroxi selenóxido, y seleno-adenosil-Se(metil)-selenóxido cada uno se puede excluir de la composición.

En algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R_7 es un alquilo seleccionado del grupo que consiste de iso-propilo, butilo, iso-butilo, butilo secundario, butilo terciario, pentilo, iso-pentilo, neo-pentilo, hexilo, iso-hexilo, 3-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, neo-hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo,

pentadecilo, y hexadecilo, alquenilo, alquinilo, cetona, alcohol amino, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', donde R' se selecciona de un alquilo seleccionado del grupo que consiste de iso-propilo, butilo, iso-butilo, butilo secundario, butilo terciario, pentilo, iso-pentilo, neo-pentilo, hexilo, iso-hexilo, 3-metilpentilo, 2,3-dimetilbutilo, neo-hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, y hexadecilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; y R₈ es hidrógeno, azido, alquilo, alquenilo, alquinilo.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente descripción comprenden, consisten de, o consisten esencialmente de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto C"), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, con la condición que 5'-selenoadenosil metionina, dehidroxi 5'-metilselenoadenosina, etilselenoadenosina, seleno(hidroxil)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), alilselenoadenosil homocisteína, seleno-adenosil homocisteína, seleno-hidroxi adenosil homocisteína, seleno adenosina, seleno-adenosil-Se(metil)-selenóxido, adenosil-hidroxi selenóxido, etil

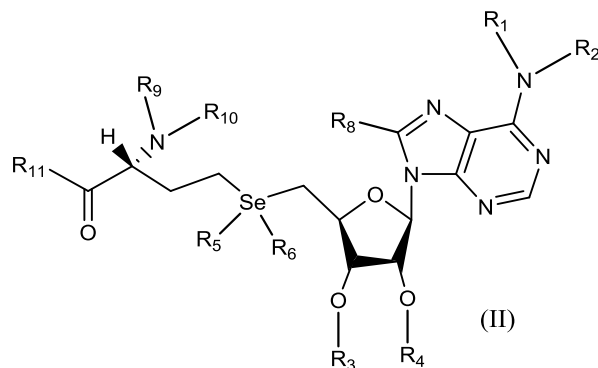
selenoadenosina, seleno-(hidroxi)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), adenosil-hidroxi selenóxido, y seleno-adenosil-Se(metil)-selenóxido cada uno se puede excluir de la composición.

5

En otras realizaciones, se proporciona una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de uno o más compuestos de acuerdo con una o más de la Fórmula (I) o 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto C"), en la
 10 que cada uno de los siguientes compuestos se excluye de la composición con el fin de minimizar la toxicidad de selenio, eliminar los compuestos inactivos o inhibidores, y/o maximizar el índice terapéutico de la composición, en la que los compuestos excluidos son γ -glutamoyl selenocisteína- γ -glutamoyl
 15 cisteína, y -glutamoylcisteína-2,3-DHP-selenocisteína, di- γ -glutamoylselenocisteína, selenoglutationa- γ -glutamoylcisteína, y -glutamoyl selenocisteína- γ -glutamoyl cisteína, γ -glutamoylcisteína-2,3-DHP-selenocisteína, di- γ -glutamoylselenocisteína,
 20 selenoglutationa- γ -glutamoylcisteína, dehidroxi 5'-metilselenoadenosina, etilselenoadenosina, seleno(hidroxi)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), alilselenoadenosil homocisteína, seleno-adenosil homocisteína, seleno-hidroxi adenosil homocisteína, seleno adenosina, seleno-adenosil-
 25 Se(metil)-selenóxido, adenosil-hidroxi selenóxido, etil selenoadenosina, seleno-(hidroxi)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), adenosil-hidroxi selenóxido, y seleno-adenosil-

Se(metil)-selenóxido.

Otra realización de la composición de la presente descripción comprende, consiste esencialmente de, o consiste
5 de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II):



o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

10

R_1 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo
15 heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el
20 que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por

lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R₃ es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R₃ junto con
 5 R₄ y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R₄ es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R₃ junto con
 10 R₄ y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

15 R₅ es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

R₆ es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;
 20

R₈ es hidrógeno, azido, alquilo, alqueno, alquino;

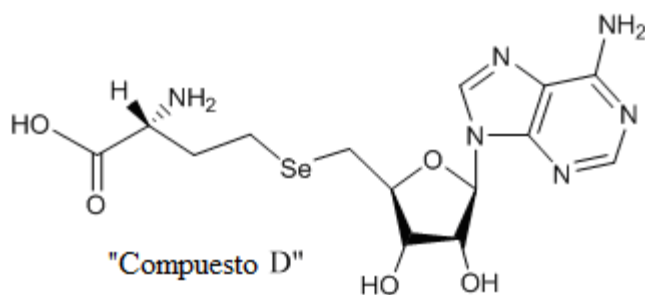
25 R₉ es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, C(O)R', C(O)OR', donde R' es alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterocíclico;

o R_9 junto con R_{10} forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

5 R_{10} es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterocíclico; o R_9 junto con R_{10} forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por
10 lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;
y

R_{11} es OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo,
15 heterocíclico, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna.

Una realización adicional de las composiciones descritas aquí comprende, consiste esencialmente de, o consiste de 5'-
20 Selenoadenosil homocisteína ("Compuesto D"), e incluye cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Compuesto D es ácido (2R)-2-amino-4-(((2S,3S,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-yl)methyl)selenanil)butanoico
25 (Número de Registro CAS 4053-91-2), e incluye cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



Una composición de la presente descripción puede comprender, consiste esencialmente de, o consistir de un compuesto de la Fórmula (II), Compuesto D, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un aspecto de la presente solicitud proporciona composiciones que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste de 5'-selenoadenosil homocisteína, un compuesto de la Fórmula (II), y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, se pueden sintetizar, aislar, y/o purificar uno o más de estos compuestos uno o más de estos compuestos.

En algunas realizaciones de la Fórmula (II), una composición comprende, consiste esencialmente de, o consiste de por lo menos 5'-selenoadenosil homocisteína ("Compuesto D") y un otro compuesto. En algunas realizaciones, la composición comprende una relación de 5'-selenoadenosil homocisteína con otro compuesto que contiene selenio de por lo menos 1:1 a 100:1, 1:1 a 50:1, 1:1 a 10:1, 1:1 a 6:1, o 1:1 a 3:1. En las realizaciones, el otro compuesto es 5'-metilselenoadenosina. En las realizaciones, el otro compuesto es γ -L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R_1 , R_3 , R_4 , R_8 y R_9 son cada uno H; R_2 es H, acilo, alquilo, carboxilo, $C(O)R'$, o $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; R_5 y R_6 están ausentes; R_{10} es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; y R_{11} es OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} son como de definió anteriormente y en el que R_{11} es OR, donde R se selecciona de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, o tert-butilo.

25

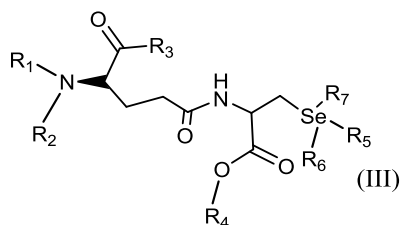
En un aspecto específico, se proporciona una composición que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste

de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, 5'-selenoadenosil homocisteína ("Compuesto "D"), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

En algunas realizaciones, las composiciones comprenden, consisten esencialmente de, o consisten de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II), selenoadenosil homocisteína, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo; con la condición que una o más de adenosil homocisteína, 5'-selenoadenosil metionina, alilselenoadenosil homocisteína, y seleno-hidroxi adenosil homocisteína cada uno se puede excluir de la composición. En las realizaciones, una composición excluye uno o más compuestos una o más de 5'-
10 Metiltioadenosina, Gama-glutamyl-metil-cisteína, o adenosil homocisteína, homocisteína o metionina.

Una realización adicional de la composición de la presente descripción puede comprender, consistir
20 esencialmente de, o consistir de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III):



o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente

aceptable del mismo, en el que

5 R_1 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

10 R_2 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

20 R_3 es OH, OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna;

25 R_4 es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna;

R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo,

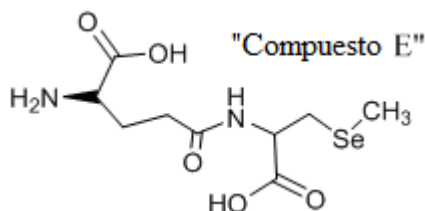
alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

R₆ es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo,
5 alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo; y

R₇ es un alquilo C₃-C₁₆, en el que el alquilo C₃-C₁₆ no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alquenilo, alquinilo, cetona, alcohol
10 amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y
15 triptofano, OR', Se-R', S- R', en el que R' para OR' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el
20 que R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo.

Una realización adicional de las composiciones descritas
25 aquí puede comprender, consistir esencialmente de, o consistir de Gama (γ)-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína ("Compuesto E"), e incluye cualesquier análogos, derivados,

y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Compuesto E es N5-(1-carboxi-2-(metilselanil)etil)-L-glutamina, e incluye cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.



5

Una composición de la presente descripción puede comprender, consistir esencialmente de, o consistir de un compuesto de la Fórmula (III), Compuesto E, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un aspecto de la presente solicitud proporciona composiciones que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste de Gama (γ)-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína, un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, se pueden sintetizar, aislar, y/o purificar uno o más de estos compuestos uno o más de estos compuestos.

Un aspecto de la presente solicitud proporciona composiciones que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste de Gama-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína, un compuesto de la Fórmula (III) y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, uno o más de estos compuestos se pueden aislar y/o purificar. En las realizaciones, una composición que comprende por lo

menos 0.033% (p/v) de uno de los compuestos.

En las realizaciones, una composición que comprende por lo menos Gama-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína y un otro
 5 compuesto. En algunas realizaciones, la composición comprende una relación de Gama-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína con un otro compuesto que contiene selenio de por lo menos 1:1 a 100:1, 1:1 a 50:1, 1:1 a 10:1, 1:1 a 6:1, o 1:1 a 3:1. En las realizaciones, el otro compuesto es 5'-metil selenoadenosina.
 10 En las realizaciones, el otro compuesto es Gama (γ)-L-glutamyl-metil-L-cisteína.

En un aspecto específico, se proporciona una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III), o
 15 una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, Gama-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína ("Compuesto E"), o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo en una relación con un otro compuesto que contiene selenio en la composición de por lo menos 1:1.

20

En algunas realizaciones, una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III), Gama-L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, con la
 25 condición que una o más de γ -glutamoyl selenocisteína- γ - glutamoyl cisteína, γ -glutamoylcisteína-2,3-DHP-selenocisteína, di- γ -glutamoylselenocisteína,

selenoglutationa- γ -glutamoilcisteína, γ -glutamoil
 selenocisteína- γ -glutamoil cisteína, γ -glutamoilcisteína-2,3-
 DHP-selenocisteína, di- γ -glutamoil-selenocisteína y
 selenoglutationa- γ -glutamoilcisteína cada una se puede
 5 excluir de la composición.

En algunas realizaciones, una composición que comprende
 un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III), Gama-L-
 glutamil-Se-metil-L-selenocisteína, o una sal, hidrato o
 10 profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, con la
 condición que se excluyan una o más de 5'-Metiltioadenosina,
 Gama-glutamyl-metil-cisteína, o adenosil homocisteína,
 homocisteína o metionina.

Otro aspecto de la presente solicitud proporciona
 análogos o derivados de los compuestos biológicamente activos
 que contienen selenio descritos aquí, por ejemplo, las
 Fórmulas (I), (II), y (III). Se pueden preparar de forma
 sintética los análogos y/o derivados de los compuestos que
 20 contienen selenio. Por ejemplo, una realización de las
 Fórmulas (I), (II), y (III) comprende cualquier análogo,
 derivado o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
 Otra realización de la presente composición comprende un
 compuesto de las Fórmulas (I), (II), y (III), y combinaciones
 25 de los mismos.

Realizaciones adicionales de la composición de la
 presente descripción pueden comprender, consistir

esencialmente de, o consistir de mezclas de los compuestos descritos aquí. Por ejemplo, una realización de la presente composición es el "Compuestos CDE". Los Compuestos CDE comprenden una mezcla de Compuesto C, Compuesto D y Compuesto E, y cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los Compuestos CE comprenden una mezcla de Compuesto C y Compuesto E, y cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los Compuestos DE comprenden una mezcla de Compuesto D y Compuesto E, y cualesquier análogos, derivados, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunas realizaciones, una composición de la presente solicitud comprende, consiste esencialmente de, o consiste de por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) a por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v) de uno de los compuestos: Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III), o mezclas de los mismos. Por ejemplo, una composición puede comprender por lo menos 0.033% (p/v), por lo menos 0.05% (p/v), por lo menos 0.1% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.05% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) a por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v) o por lo menos aproximadamente 0.05% (p/v) a por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v) de Compuesto C, Compuesto D,

Compuesto E, un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III), los Compuestos CDE, o mezclas de los mismos.

5 Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) a por lo menos aproximadamente 0.035% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.040% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.045% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.050% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.055% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.060% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.065% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.070% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.075% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.080% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.085% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.090% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.095% (p/v), o por lo menos aproximadamente 0.033% a por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v) de un compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III), Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, o

mezclas de los mismos, y todos los valores de rango por ciento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición
 5 comprende por lo menos aproximadamente 0.05% a por lo menos
 aproximadamente 0.060% (p/v), por lo menos aproximadamente
 0.05% a por lo menos aproximadamente 0.065% (p/v), por lo
 menos aproximadamente 0.05% a por lo menos aproximadamente
 0.070% (p/v), por lo menos aproximadamente 0.05% a por lo
 10 menos aproximadamente 0.075% (p/v), por lo menos
 aproximadamente 0.05% a por lo menos aproximadamente 0.080%
 (p/v), por lo menos aproximadamente 0.05% a por lo menos
 aproximadamente 0.085% (p/v), por lo menos aproximadamente
 0.05% a por lo menos aproximadamente 0.090% (p/v), por lo
 15 menos aproximadamente 0.05% a por lo menos aproximadamente
 0.095% (p/v), o por lo menos aproximadamente 0.05% a por lo
 menos aproximadamente 0.1% (p/v) de un compuesto de la
 Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III), Compuesto C,
 Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, o mezclas de
 20 los mismos, y todos los valores de rango por ciento.

En otras realizaciones, la composición comprende
 aproximadamente 0.033% (p/v) a aproximadamente 99.9% (p/v),
 aproximadamente 0.033% a aproximadamente 90% (p/v),
 25 aproximadamente 0.033% a aproximadamente 80% (p/v),
 aproximadamente 0.033% a aproximadamente 70% (p/v),
 aproximadamente 0.033% a aproximadamente 60% (p/v),

aproximadamente 0.033% a aproximadamente 50% (p/v),
aproximadamente 0.033% a aproximadamente 40% (p/v),
aproximadamente 0.033% a aproximadamente 30% (p/v),
aproximadamente 0.033% a aproximadamente 20% (p/v),
5 aproximadamente 0.033% a aproximadamente 10% (p/v),
aproximadamente 0.033% a aproximadamente 5% (p/v), o
aproximadamente 0.033% a aproximadamente 1% (p/v) de un
compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III),
Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, o
10 mezclas de los mismos, y todos los valores de rango por
ciento.

En otras realizaciones, la composición comprende
aproximadamente 0.05% (p/v) a aproximadamente 99.9% (p/v),
15 aproximadamente 0.05% a aproximadamente 90% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 80% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 70% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 60% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 50% (p/v),
20 aproximadamente 0.05% a aproximadamente 40% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 30% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 20% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 10% (p/v),
aproximadamente 0.05% a aproximadamente 5% (p/v), o
25 aproximadamente 0.05% a aproximadamente 1% (p/v) de un
compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III),
Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, o

mezclas de los mismos, y todos los valores de rango por ciento.

En realizaciones adicionales, la composición comprende

5 aproximadamente 0.1% (p/v) a aproximadamente 99.9% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 90% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 80% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 70% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 60% (p/v),
 10 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 50% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 40% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 30% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 20% (p/v),
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% (p/v),
 15 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5% (p/v), o
 aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1% (p/v) de un
 compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III),
 Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, o
 mezclas de los mismos, y todos los valores de rango por
 20 ciento.

En otras realizaciones, una composición que comprende
 por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) a por lo menos
 aproximadamente 0.1% (p/v) o por lo menos aproximadamente
 25 0.05% (p/v) a por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v) de un
 compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III),
 Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, o

una mezcla de los mismos.

En las realizaciones, una composición que comprende por lo menos 5'-Metilselenoadenosina y un otro compuesto. En algunas realizaciones, la composición comprende una relación de 5'-Metilselenoadenosina con un otro compuesto que contiene selenio de por lo menos 1:1 a 100:1, 1:1 a 50:1, 1:1 a 10:1, 1:1 a 6:1, o 1:1 a 3:1. En las realizaciones, el otro compuesto es 5'-selenoadenosil homocisteína. En otras realizaciones, el otro compuesto es L-glutamil-Se-metil-L-selenocisteína.

En otras realizaciones, las composiciones puede excluir una o más de 5'-Metiltioadenosina ("Compuesto H"), S-Adenosil-L-homocisteína ("Compuesto I"), Gama-glutamil-metilcisteína ("Compuesto J"), Gama-L-glutamil-Se-metil-L-selenocisteína, Se-adenosilhomocisteína, o glutamil selenocisteína, debido a que uno o más de estos compuestos puede no ser necesario para la composición o inhibidor para otro compuestos en la composición.

Un aspecto de la presente solicitud proporciona composiciones que comprenden por lo menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la

Fórmula (III) y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, se puede sintetizar, aislar y/o purificar uno o más de estos compuestos.

5 Un aspecto de la presente solicitud se dirige a 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto C"), Se-Adenosil-L-homocisteína ("Compuesto D"), L-glutamyl-Se-metil-L-selenocisteína ("Compuesto E") y análogos de los mismos. Algunas realizaciones incluyen una composición que comprende
10 un compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II) y/o Fórmula (III) y mezclas de los mismos, y un portador.

En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que
15 consiste de: 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), y un compuesto de la Fórmula (III) y mezclas de los mismos. En aún realizaciones adicionales, la composición comprende
20 por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) de por lo menos uno de estos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos aproximadamente 0.05% (p/v) para cada uno de dos de estos compuestos. En aún otra realización, la composición comprende por lo menos aproximadamente 0.033%
25 (p/v) para cada uno de tres de estos compuestos.

En realizaciones adicionales, uno o más de estos

compuestos de la Fórmula (I), Fórmula (II) y Fórmula (III) se pueden sintetizar, aislar y/o purificar. En las realizaciones, las composiciones que comprenden compuestos de la Fórmula (I), Fórmula (II) y Fórmula (III) comprenden
 5 adicionalmente un portador tal como agua, salina fisiológica, regulador fisiológico que incluyen surfactantes y aminoácidos de estabilización.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición
 10 que comprende uno o más compuestos de acuerdo con una o más de la Fórmula (I), Fórmula (II) Fórmula (III), Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, los Compuestos CDE, o mezclas de los mismos, en los que uno o más de cada uno de los siguientes compuestos se excluye de la composición con el fin
 15 de minimizar toxicidad de selenio, eliminar los compuestos inactivos o inhibidores, y/o maximizar el índice terapéutico de la composición, en la que los compuestos excluidos son γ -glutamoyl selenocisteína- γ -glutamoyl cisteína, γ -glutamoylcisteína-2,3-DHP-selenocisteína, di- γ -glutamoylselenocisteína, selenoglutationa- γ -glutamoylcisteína, γ -glutamoyl selenocisteína- γ -glutamoyl cisteína, γ -glutamoylcisteína-2,3-DHP-selenocisteína, di- γ -glutamoylselenocisteína, selenoglutationa- γ -glutamoylcisteína, dehidroxi 5'-metilselenoadenosina,
 20 etilselenoadenosina, seleno(hidroxil)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), alilselenoadenosil homocisteína, seleno-adenosil homocisteína, seleno-hidroxil adenosil homocisteína, seleno

adenosina, seleno-adenosil-Se(metil)-selenóxido, adenosil-hidroxi selenóxido, etil selenoadenosina, seleno-(hidroxi)-selenofeno-(3'-desoxi-adenosina), adenosil-hidroxi selenóxido y seleno-adenosil-Se(metil)-selenóxido.

5

En algunas realizaciones, una composición que comprende por lo menos dos compuestos diferentes seleccionados del grupo que consiste de: 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un
10 compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II) y un compuesto de la Fórmula (III) y mezclas de los mismos; y un portador. En otras realizaciones, una composición que comprende por lo menos dos compuestos diferentes seleccionados del grupo que consiste de: 5'-
15 Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína; y un portador. En las realizaciones, la composición comprende 5'-Metilselenoadenosina y Gama-glutamil-metilseleno-cisteína. En las realizaciones, cada uno de los dos compuestos está
20 presente en la composición por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v).

En otras realizaciones, una composición que comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del
25 grupo que consiste de: 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II)

y un compuesto de la Fórmula (III) y mezclas de los mismos; y un portador. En otras realizaciones, una composición que comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de: 5'-
5 Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína; y un portador. En las realizaciones, cada uno de los tres compuestos está presente en la composición por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v).

10 En algunas realizaciones, cualquiera de los compuestos de la presente solicitud descritos aquí se pueden modificar con un profármaco para prolongar la vida media. Los profármacos también pueden ser útiles para proteger el compuesto contra oxidación, para dirigir el compuesto a un
15 tejido, o para permitir que el compuesto pase la barrera hematoencefálica.

En algunas realizaciones, un profármaco comprende un selenoglucósido. Los glucósidos incluyen monosacáridos,
20 disacáridos, y oligosacáridos. Los sacáridos pueden incluir ribosa, glucosa, galactosa, o mannososa. Por ejemplo, una galactosa conjugada con una unidad estructural de selenio puede dirigir el compuesto al hígado.

25 En otras realizaciones, un profármaco comprende una selenazolidina. Estos compuestos proporcionan liberación lenta de los compuestos.

En todavía otras realizaciones, un profármaco comprende la conjugación de un compuesto selenoorgánico con una vitamina tal como vitamina C o vitamina E. Estos conjugados de profármaco han mejorado los efectos protectores.

En todavía otras realizaciones, un profármaco puede ser un profármaco activado con citocromo P450, tales como fosfatos o fosfonatos cíclicos. Otras realizaciones de profármacos activados del citocromo P450 mejoran la biodisponibilidad. En particular, los nucleósidos se han modificado con estas moléculas y proporcionan la orientación de moléculas al hígado. Los profármacos de ejemplo incluyen profármacos HepDirect. Otras realizaciones de profármaco activado con citocromo P450 mejoran la biodisponibilidad y se describen en Huttunen et al, Current Medicinal Chemistry 2008 15: 2346.

En las realizaciones, cualquiera de los compuestos de la Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III), Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E, o Compuestos CDE, se pueden modificar para reducir la oxidación de selenio. En las realizaciones, los compuestos pueden formar un dímero a través de un enlace entre átomos de selenio.

En las realizaciones, cualquiera de los compuestos de Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III), Compuesto C,

Compuesto D, Compuesto E, o Compuestos CDE se pueden modificar mediante la unión a un agente orientado a tejido u otro agente para aumentar la vida media del compuesto. Los agentes de orientación de tejido pueden incluir cualquier
5 agente conocido en la técnica, que incluyen pero no se limitan a, anticuerpos específicos para unión a un antígeno específico de tejido, un receptor de transferrina, o un profármaco como se describe aquí.

10 En algunas realizaciones, una composición de la invención se formula a través de la barrera hematoencefálica. Las composiciones de la invención se pueden combinar con un material de implante adecuado para suministro al cerebro, tal como un implante biodegradable polimérico o portador. Dichos
15 portadores poliméricos incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, poli lactidas, poliglicólidos, poliortoésteres, polivinil pirrolidona, y alcoholes de polivinilo y acetato de etileno-co-vinilo.

20 En otras realizaciones, los compuestos se pueden vincular a o combinarse con un portador de nanopartículas para proporcionar composiciones al cerebro y proporcionarlas para orientación a tejido. Otras nanopartículas incluyen fosfolípidos, quitosano, ácido láctico, y dextrano.

25

Las microesferas y liposomas son portadores adicionales que pueden ser utilizados en la presente descripción. Por

ejemplo, microesferas y liposomas pueden incluir, pero no se limitan a, ácido poli (láctico-co-glicólico) o portadores de PLGA. En otras realizaciones, el suministro de portador de las composiciones en el cerebro u otros tejidos del cuerpo se puede orientar al utilizar liposomas o microesferas que comprenden un anticuerpo, un receptor de transferrina, o un profármaco como un agente de orientación. La orientación de tejidos también puede implicar transporte mediado por receptor, tal como con el receptor de insulina o el receptor de transferrina. Estos receptores se pueden integrar en liposomas o microesferas que también incluyen las composiciones descritas aquí.

Los profármacos lípidos también son adecuados para uso con los compuestos de la invención. Mediante ejemplo no limitante, algunos profármacos lípidos se describen en Hostetler et al., (1997 Biochem. Pharm. 53: 1815-1822), y Hostetler et al., 1996 Antiviral Research 31: 59-67), ambas se incorporan en su totalidad aquí mediante referencia. Ejemplos adicionales de la tecnología de profármacos adecuados se describen en los documentos WO 90/00555; WO 96/39831; WO 03/095665 A2; Patentes Estadounidenses Nos. 5,411,947; 5,463,092; 6,312,662; 6,716,825;; y Solicitud de Patentes Estadounidenses publicadas Nos. 2003/0229225 y 2003/0225277 cada una de las cuales se incorpora en su totalidad aquí como referencia. Dichos profármacos pueden poseer también la capacidad de dirigir el compuesto fármaco a

un tejido particular dentro del paciente, por ejemplo, el hígado, como se describe por Erion et al., (2004 J. Am. Chem. Soc. 126:5154-5163; Erion et al, Am. Soc. Pharm. & Exper. Ther. DOI: 10.1124/jept.104.75903 (2004); WO 01/18013 A1; 5 Patente Estadounidense. No. 6,752,981), cada una de las cuales se incorpora en su totalidad aquí como referencia.

Dichos profármacos pueden también poseer la capacidad de dirigir el compuesto fármaco a un tejido particular dentro 10 del paciente, por ejemplo, el hígado, como se describe por Erion et al., (2004 J. Am. Chem. Soc. 126:5154-5163; Erion et al, Am. Soc. Pharm. & Exper. Ther. DOI: 10.1124/jept.104.75903 (2004); WO 01/18013 A1; Patente Estadounidense. No. 6,752,981), cada una de las cuales se 15 incorpora en su totalidad aquí como referencia. A modo de ejemplo no limitante, otros profármacos adecuados para uso con los compuestos de la invención se describen en el documento WO 03/090690; Patente Estadounidense No. 6,903,081; Solicitud de patente Estadounidense No. 2005/0171060A1; 20 solicitud de patente Estadounidense No. 2002/0004594A1; y por Harris et al, (2002 Antiviral Chem & Chemo. 12: 293-300; Knaggs et al, 2000 Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 2075-2078) cada una de los cuales se incorporan en su totalidad aquí como referencia.

25

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende uno o más compuestos cada uno de acuerdo con la

Fórmula (I). En algunos aspectos, la composición comprende 5'-metilselenoadenosina, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo; y 5'-selenoadenosil homocisteína, o una sal, hidrato o profármaco
5 farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende uno o más compuestos cada uno de acuerdo con la Fórmula (I) y Fórmula (III). En algunos aspectos, la
10 composición comprende 5'-metilselenoadenosina, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo; 5'-selenoadenosil homocisteína, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo; y gama-L-glutamil-Se-metil-L-selenocisteína, o una sal, hidrato o
15 profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, la composición comprende 5'-metilselenoadenosina, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo; y gama-L-glutamil-Se-
20 metil-L-selenocisteína, o una sal, hidrato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende uno o más compuestos cada uno de acuerdo con la
25 Fórmula (I) y Fórmula (II). En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende uno o más compuestos cada uno de acuerdo con la Fórmula (II) y (III).

En las realizaciones, cualquiera de las composiciones descritas aquí puede comprender adicionalmente un agente terapéutico diferente para modular el metabolismo de glucosa o tratar diabetes.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico diferente es insulina o un análogo de la misma. Los análogos de insulina incluyen análogos de insulina de acción rápida y análogos de insulina de acción larga. Los análogos de insulina pueden tener uno o más cambios de aminoácido. Los análogos de insulina de acción rápida incluyen Asparto, Glulisina y LisPro. Las insulinas de acción larga incluyen insulina NPH, Insulina detemir, insulina Degludec o Insulina glargina.

En una realización, la composición comprende adicionalmente un agente terapéutico diferente para modular el metabolismo de glucosa o tratar diabetes. En algunas realizaciones, el agente terapéutico diferente es insulina o un análogo de la misma. En algunas realizaciones, el agente terapéutico diferente es un sensibilizador de insulina, un secretagogo de insulina o un imitador de incretina. Otros agentes terapéuticos de ejemplo efectivos en la presente composición que se pueden utilizar para tratar diabetes incluyen metforminas, sulfonilureas, meglitinidas, derivados de D-fenilalanina, tiazolidinedionas, inhibidores de DPP-4,

inhibidores de alfa glucosidasa, secuestrantes de ácidos biliares y combinaciones de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención,
5 una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable, éster o profármaco del mismo, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Los diluyentes y
10 portadores de ejemplo de la presente invención se describen en detalle en la sección de Definiciones de esta solicitud. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los portadores pueden incluir agua, salina fisiológica, y soluciones reguladas acuosas que contienen surfactantes o aminoácidos de
15 estabilización, tales como histidina o glicina. En una realización de la presente solicitud, el portador farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, las
20 composiciones y/o formulaciones que comprenden selenio se pueden administrar a un sujeto solas, o en combinación con otras formas de selenio, fármacos, moléculas pequeñas, o en composiciones farmacéuticas donde se mezclan con excipiente(s) u otros portadores farmacéuticamente
25 aceptables. En otras realizaciones, las composiciones de la presente solicitud se pueden formular utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en

dosificaciones adecuadas para administración oral. Los portadores pueden permitir a las composiciones farmacéuticas ser formuladas como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, o para ingestión oral o nasal por un paciente que se va a tratar. Adicionalmente, las composiciones que comprenden uno o más compuestos, incluyen, pero no limitado a, 5'-Metilselenoadenosina, un compuesto de Fórmula (I), y combinaciones de los mismos se pueden administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente) por vía intravenosa en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica.

Las composiciones se pueden formular para cualquier ruta de administración, en particular para administración oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal. Las composiciones se pueden formular en cualquier forma convencional, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, soluciones, suspensiones, dispersiones, jarabes, aerosoles, geles, supositorios, parches y emulsiones.

Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier sujeto puede depender de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y ruta de administración, salud

general y la interacción con otros fármacos que se administran al mismo tiempo. Dependiendo del objetivo buscado que se va a alterar por el tratamiento, las composiciones farmacéuticas se pueden formular y administrar sistémicamente
5 o localmente.

Las técnicas conocidas en el arte para formulación y administración de compuestos terapéuticos son suficientes para administrar los compuestos y composiciones de la
10 presente invención y se pueden encontrar en la última edición de "Remington Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Las composiciones de la presente descripción se pueden formular para cualquier ruta de administración, en particular para administración oral, rectal, transdérmica,
15 subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal. Las rutas adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir la administración oral o transmucosal; así como suministro parenteral, que incluye administración intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal,
20 intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, o intranasal.

Para inyección, una composición de la presente solicitud (por ejemplo, una composición que contiene selenio) se puede formular en soluciones acuosas, tales como en reguladores
25 fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o solución salina fisiológicamente regulada. Para administración a tejido, órgano, o celular, se

utilizan penetrantes apropiados para la barrera particular que se va a permear en la formulación. Dichos penetrantes generalmente se conocen en la técnica.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente solicitud incluyen composiciones en las que los ingredientes activos (por ejemplo, 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-

10 cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III) y mezclas de los mismos) están contenidos en una cantidad efectiva para alcanzar el propósito destinado. Por ejemplo, en una realización preferida, una cantidad efectiva de una composición farmacéutica comprende una cantidad de un

15 compuesto seleccionado del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III) y mezclas de los mismos. La determinación de

20 las cantidades efectivas están bien dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción proporcionada aquí.

Algunos compuestos que contienen selenio se han

25 preparado de forma sintética, purificado y detectado en un ensayo de bioactividad. No todos los componentes y compuestos que se encuentran en la levadura selenizada o un extracto de

agua de la misma tienen actividad biológica cuando se obtiene de dichas levaduras y de hecho, pueden ser tóxicos para las células.

5 Las composiciones de la presente descripción se pueden formular para cualquier ruta de administración, en particular para administración oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intranasal. Las rutas adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir la
10 administración oral o transmucosal; así como suministro parenteral, que incluye administración intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, o intranasal.

15 Para inyección, una composición de la presente solicitud (por ejemplo, una composición que contiene selenio) se puede formular en soluciones acuosas, tales como en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o solución salina fisiológicamente
20 regulada. Para administración a tejido, órgano, o celular, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera particular que se va a permear en la formulación. Dichos penetrantes generalmente se conocen en la técnica.

25 En las realizaciones, las composiciones que contienen o compuestos formulados de forma sintética pueden comprender una cantidad igual de cada componente que contiene selenio,

por ejemplo, una relación de por lo menos 1:1:1 de Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína a 5'-Metilselenoadenosina a Se-Adenosil-L-homocisteína. En otras realizaciones, una composición puede comprender por lo menos dos componentes en
5 relaciones de 1:1 a 100:1, 1:1 a 50:1, 1:1 a 10:1, 1:1 a 6:1, o 1:1 a 3:1.

Las composiciones que comprenden uno o más compuestos que incluyen 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-
10 homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III) y combinaciones de los mismos se pueden administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente) por vía intravenosa en un portador
15 farmacéuticamente aceptable tal como salina fisiológica. Se pueden utilizar métodos estándar para administración intracelular de los compuestos (por ejemplo, a través de la entrega de liposomas). Dichos métodos son bien conocidos por aquellos expertos comunes en la técnica.

20

Las composiciones que comprenden selenio son útiles para la administración intravenosa, así como administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. Para inyección, una composición que
25 comprende selenio (por ejemplo, una composición farmacéutica) de la presente solicitud se puede formular en soluciones acuosas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente

compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o solución salina fisiológicamente regulada. Para la administración al tejido o celular, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera particular que se va a impregnar en la formulación. Dichos penetrantes generalmente se conocen en la técnica.

En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas pueden contener un disgregante, almidón gelatinizado y un recubrimiento. En realizaciones, los disgregantes incluyen polivinil pirrolidona entrecruzada, gomas, almidones que incluyen almidón gelatinizado y productos de celulosa. En las realizaciones, los recubrimientos incluyen alcohol de polivinilo, derivados de celulosa y derivados de ácido metacrílico.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, las composiciones y/o formulaciones que comprenden selenio se pueden administrar a un sujeto solas, o en combinación con otras formas de selenio, fármacos, pequeñas moléculas, o en composiciones farmacéuticas donde se mezclan con excipiente(s) u otros portadores farmacéuticamente aceptables. En las realizaciones, las composiciones pueden incluir uno o más aminoácidos o seleno aminoácidos, tales como metionina, cisteína o selenocisteína con el fin de minimizar la toxicidad. En una realización de la presente solicitud, el portador farmacéuticamente aceptable es

farmacéuticamente inerte. En otra realización de la presente solicitud, las composiciones que comprenden selenio se pueden administrar solas a sujetos individuales, en riesgo de o que sufren de una enfermedad o afección asociada con metabolismo
5 de glucosa.

Las composiciones también se pueden formular en cualquier forma convencional, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, soluciones, suspensiones,
10 dispersiones, jarabes, aerosoles, geles, supositorios, parches y emulsiones. Las composiciones de la presente solicitud, en particular las composiciones que comprenden 5'-Metilselenoadenosina, un compuesto de Fórmula (I), y sus combinaciones, también se pueden agregar a las bebidas o
15 productos alimenticios nutricionales (por ejemplo, ENSURE, POWERBAR, o similares), una multi -vitamina, productos nutricionales, etc., para ayudar al consumo diario.

MÉTODOS PARA UTILIZAR COMPUESTOS Y COMPOSICIONES

20 Los compuestos y composiciones de la presente descripción exhiben especificidad a tejido con respecto a expresión de genes de los genes que se relacionan con activación/inactivación de los procesos biológicos y transcripcionales. Por ejemplo, la presente solicitud se
25 relaciona con métodos para utilizar los compuestos y composiciones descritas aquí para reemplazar insulina, mejorar la actividad de insulina, mejorar la sensibilidad a

glucosa, inhibir la producción de glucosa, o modular el metabolismo de glucosa en diversas rutas biológicas de un sujeto. Por lo tanto, las composiciones y compuestos que comprenden selenio se pueden administrar solos a sujetos
5 individuales, en riesgo de o que sufren de una enfermedad o afección asociada con aberración de los genes descritos aquí. Por ejemplo, los métodos de la presente solicitud pueden encontrar uso en diagnosticar o tratar (por ejemplo, profiláctica o terapéuticamente) un sujeto con una afección
10 asociada con diabetes mellitus (DM) no Dependiente de Insulina (Tipo II).

En una realización de la presente descripción, un método para reemplazar insulina en un sujeto comprende administrar
15 una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de: 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II),
20 un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la composición reemplaza insulina en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la
25 composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-

glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

En otra realización, un método para mejorar la actividad de insulina en un sujeto comprende administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de: 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), a compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la composición mejora la actividad de insulina en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05%

(p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos. Una realización adicional del método para mejorar la actividad de insulina en un sujeto, comprende adicionalmente administrar insulina o un análogo o derivado de la misma.

En aún otras realizaciones, un método para inhibir la producción de glucosa en un sujeto comprende administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de: 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la composición inhibe la producción de glucosa en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras

realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

En otra realización, un método para aumentar la fosforilación de FOXO3 y/o FOXO en un sujeto comprende administrar una composición al sujeto comprende por lo menos dos compuestos seleccionado del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la composición mejora la fosforilación de FOXO3 y FOXO4 en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

En las realizaciones, un método para modular el

metabolismo de glucosa en un sujeto comprende: administrar una cantidad efectiva de una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos dos compuestos diferentes seleccionados del grupo que consiste de 5'-

5 Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III). En otra realización, una cantidad efectiva de la composición modula el metabolismo de glucosa en células de

10 hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-

15 glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras

20 realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

En las realizaciones, un método para aumentar la sensibilidad a glucosa en un sujeto comprende administrar una

25 composición al sujeto, la composición comprende por lo menos dos compuestos diferentes seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-

homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la
5 composición aumenta la sensibilidad a glucosa en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de
10 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno
15 de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

En las realizaciones, un método para tratar diabetes en
20 un sujeto comprende administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos dos compuestos diferentes seleccionados del grupo que consiste de: 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula
25 (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III) y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la composición trata la

diabetes en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

En algunas realizaciones, se proporciona un método o uso para inhibir la expresión de *G6PC* en un sujeto que comprende administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos dos compuestos seleccionado del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la composición inhibe la expresión del gen *G6PC* en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres

diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

10

En algunas realizaciones del método, una disminución de *G6PC* varía desde un aumento o reducción de aproximadamente 50% a un aumento o reducción del 500% en comparación con una célula de tipo idéntico no tratada con el compuesto. La magnitud de la respuesta de *G6PC* depende del tipo de célula, compuesto específico, y tiempo en contacto con la célula.

15

En otras realizaciones, se proporciona un método o uso para aumentar la expresión del receptor de insulina (*INSR*) en un sujeto que comprende administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos dos compuestos seleccionado del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III) y combinaciones de los mismos. En otra realización, una cantidad efectiva de la composición aumenta

20

25

la expresión del receptor de insulina en células de hígado del sujeto cuando se compara con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos
5 seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las
10 realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05% (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

15 En las realizaciones, se proporciona un método o uso para aumentar la expresión del receptor de factor de crecimiento similar a insulina (*Igf1r*) en un sujeto que comprende administrar una composición al sujeto, la composición comprende por lo menos dos compuestos
20 seleccionado del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III) y combinaciones de los mismos. En otra
25 realización, una cantidad efectiva de la composición aumenta la expresión del receptor de factor de crecimiento similar a insulina en células de hígado del sujeto cuando se compara

con células de hígado del sujeto no tratado con la composición. En algunas realizaciones, la composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-
5 Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos. En las realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.05%
10 (p/v) para cada uno de los dos compuestos. En otras realizaciones, la composición comprende por lo menos 0.033% (p/v) para cada uno de los tres compuestos.

En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la
15 composición puede comprender 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína o mezclas de los mismos. En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la composición puede comprender por lo menos aproximadamente 0.1% (p/v) de 5'-Metilselenoadenosina.

20

En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la composición puede estar en una forma seca o de cápsula. En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la composición puede comprender adicionalmente insulina o un análogo o
25 derivado de la misma. En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la composición puede comprender adicionalmente un sensibilizador de insulina, un secretagogo

de insulina, o un imitador de incretina.

En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la composición puede excluir una o más de 5'-Metiltioadenosina, S-Adenosil-L-homocisteína o Gama-glutamyl-metil-cisteína. En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la composición se puede administrar por vía oral.

En uno cualquiera de los métodos descritos aquí, la composición se puede administrar a una o más células de hígado del sujeto. En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos que se describen aquí comprenden administrar insulina o análogo de la misma o comprende adicionalmente administrar un agente terapéutico diferente para modular el metabolismo de glucosa o tratar diabetes.

En las realizaciones de los métodos de la presente solicitud, se proporciona un uso para una composición que comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), y un compuesto de la Fórmula (III) para reemplazar insulina o mejorar la actividad de insulina en un sujeto. En las realizaciones, el uso comprende adicionalmente insulina o un análogo de la misma. En las realizaciones, el uso comprende adicionalmente un

agente terapéutico diferente para modular el metabolismo de glucosa o tratar diabetes. En otras realizaciones de la presente solicitud, se proporciona un uso para una composición que comprende por lo menos tres diferentes
5 compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III) y combinaciones de los mismos para inhibir *G6PC*
10 en el hígado.

Los compuestos que contienen selenio afectan la expresión de genes en células de hígado de manera diferente que las células neuronales. En contraste con el efecto de que
15 los compuestos y composiciones tienen sobre las células del hígado como se describe aquí, la misma o una composición similar puede afectar a las células neuronales de una manera opuesta. Por ejemplo, una composición como se describe aquí, disminuye la fosforilación de FOXO3 y/o FOXO4 en las células
20 neuronales, a diferencia de aumentar la expresión de FOXO3 o FOXO4 como se especifica en los métodos de la presente descripción.

En realizaciones adicionales del método de la presente
25 descripción, la cantidad efectiva de los compuestos y composiciones como se describe aquí es una cantidad efectiva para inhibir la expresión de *G6PC*, disminuir la producción de

glucosa en células del hígado, o incrementar la fosforilación FOXO en una célula de hígado sin ser tóxica para las celdas. Las cantidades efectivas de los compuestos seleccionados no muestran toxicidad para ninguna de las células ejemplificadas
 5 que incluyen células esqueléticas de ratón, neuronales humanas, o células de hígado de ratón. Adicionalmente, la composición que comprende los compuestos descritos aquí no afecta adversamente el metabolismo de la glucosa en las células de hígado.

10

Los métodos para determinar la expresión de genes en una célula de un sujeto son conocidos por aquellos expertos en la técnica, y pueden incluir la hibridación con cebadores y/o sondas, por ejemplo en una matriz o por métodos de PCR. Las
 15 matrices y/o cebadores para determinación de la expresión de genes están disponibles comercialmente. Los cebadores y matrices o micromatrices se pueden diseñar fácilmente utilizando las secuencias disponibles públicamente para los genes descritos aquí, tal como *G6PC*, *FOXO3*, *FOXO4*, *INSR*, e
 20 *Igf1r*. Por ejemplo, las secuencias de ejemplo para *G6PC* se encuentran en NM_000151.3, GI: 393537030, ID de Gen: 2538; *FOXO3* se encuentran en NM_001455.3, GI: 146260266, ID de Gen: 2309; *FOXO4* se encuentran en NM_001170931.1, GI: 283436082, ID de Gen: 4303; *Insr* se encuentran en NM_000208.2, GI:
 25 119395735, ID de Gen: 3643; w *Igf1r* se encuentran en XM_011521513.1, GI: 767983996, ID de Gen: 3480. La modulación de la expresión de genes en las células del hígado se puede

determinar como se describe aquí utilizando una serie de ensayos en una muestra tomada de un sujeto tratado de acuerdo con las composiciones descritas aquí.

5 Como se conoce bien en las técnicas médicas o de investigación, las dosificaciones para cualquier sujeto pueden depender de muchos factores, que incluyen, pero no limitados a, el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, compuesto particular que se va a administrar, 10 sexo, tiempo, y ruta de administración, salud general y la interacción con otros fármacos que se administran simultáneamente. En loas realizaciones, la dosis de la presente composición se pueden ajustar dependiendo de la eficacia o presencia de signos manifiestos de toxicosis por 15 selenio que se observan en el sujeto. La toxicosis por selenio puede ser indicada por síntomas que incluyen, pero no limitados a, aliento a ajo, pérdida de cabello, uñas o en forma de escamas.

20 En algunas realizaciones, la dosis de la presente composición se administra por lo menos una vez al día durante un período de tiempo para alcanzar un estado de equilibrio de selenio elemental en la sangre. En aún otras realizaciones, la dosis de la presente composición se puede administrar 25 mientras que el sujeto está experimentando síntomas de una enfermedad o trastorno.

EJEMPLOS

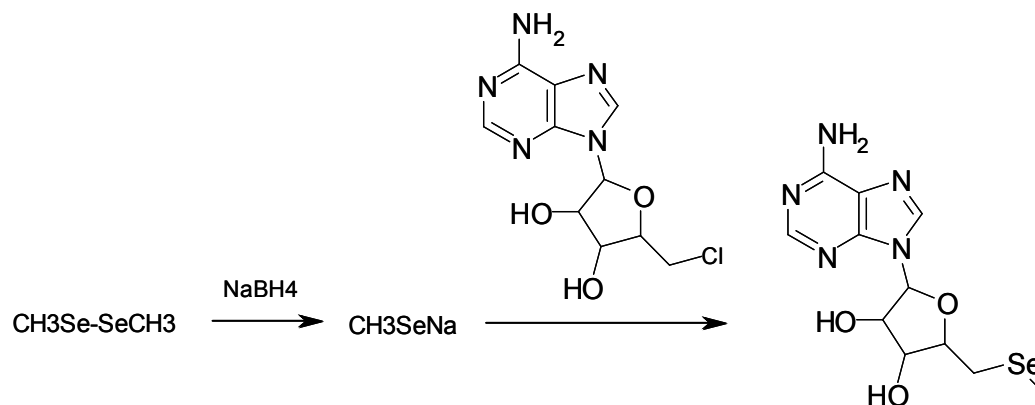
Los siguientes ejemplos proporcionan ejemplos
ilustrativos o realizaciones de las composiciones, compuestos
5 y métodos de la presente descripción. Las realizaciones
ilustrativas de los compuestos, composición, y métodos de la
presente descripción se proporcionan aquí a modo de ejemplos.
Mientras que los conceptos y tecnología de la presente
descripción son susceptibles de varias modificaciones y
10 formas alternativas, las realizaciones específicas de los
mismos se han mostrado a modo de ejemplo en las figuras y se
describirán aquí en detalle. Sin embargo, se debe entender
que no hay intención de limitar los conceptos de la presente
descripción a las formas particulares descritas, sino que por
15 el contrario, la intención es cubrir todas las
modificaciones, equivalentes y alternativas consistentes con
la presente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Se apreciará que la tecnología descrita aquí tiene
20 amplias aplicaciones. Las anteriores realizaciones se
eligieron y describieron con el fin de ilustrar los
principios de la tecnología, así como algunas aplicaciones
prácticas. Mientras que se han descrito y/o ejemplificado
ciertas realizaciones aquí, se contempla que son posibles
25 variación y modificación considerable de las mismas.

Ejemplo 1: Síntesis y 5'-Metilselenoadenosina ("Compuesto

C'')

El esquema de síntesis y metodología para producir el Compuesto C es:



5

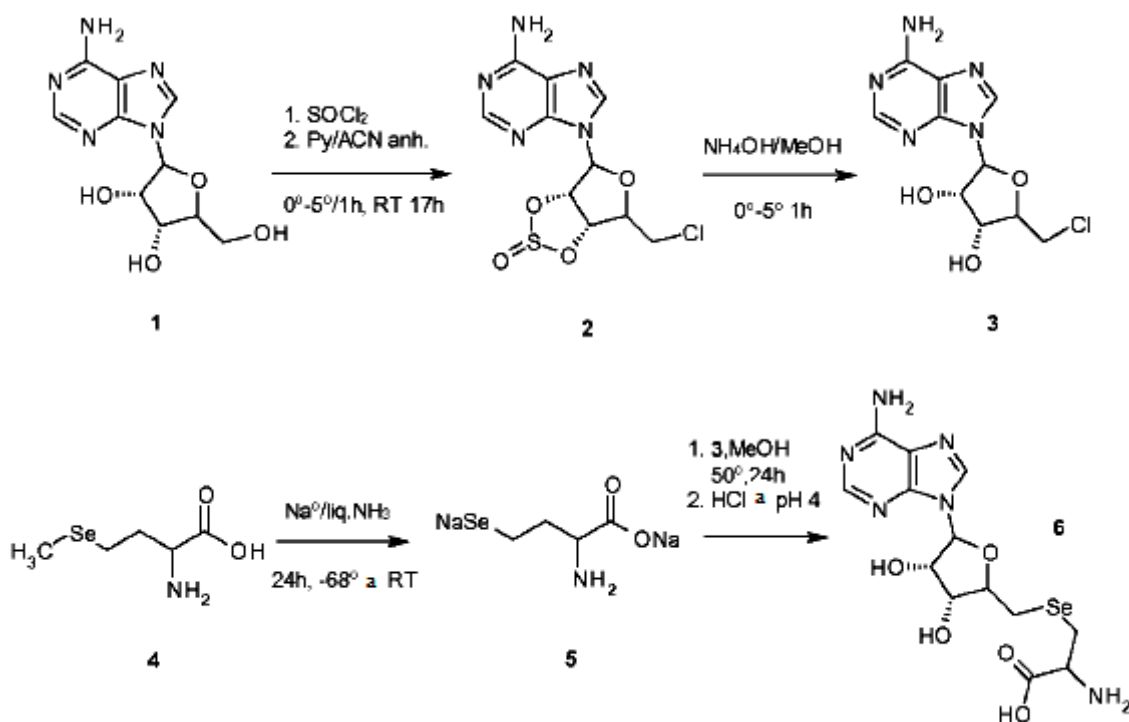
Se coloca borohidruro de sodio (227 mg, 6.0 mM, bajo Ar°) en un matraz de fondo redondo de 200 mL que contiene 20 mL de alcohol etílico anhidro, equipado con un agitador magnético y ubicado en un baño enfriado con hielo. Se agrega dimetildiseleniuro (190 μL , 37.6 mg, 2.0 mM), al matraz con enfriamiento, agitación y bajo flujo de Ar . Después de la formación de una solución amarillenta se agrega 5'-cloro-5'-desoxiadenosina sólida (1,143 g, 4.0 mM). Se agrega 100 mL de alcohol etílico adicional para disolver el precipitado. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante los siguientes cuatro días. Se utiliza Espectrometría de Masa para monitorizar la conversión de aproximadamente 75% de conversión que se logra después de cinco días. Los disolventes se evaporan y 3.22 g del producto (con aproximadamente 20% de material de partida (SM)) se recolecta

20

y purifica por cromatografía preparativa de fase inversa (C-8). Se recolecta un rendimiento de 1.1 g de producto puro cuyo peso molecular se confirma por espectrometría de masa.

5 **Ejemplo 2: Síntesis y Caracterización de Se-Adenosil-L-homocisteína ("Compuesto D")**

El esquema de síntesis y metodología para producir el Compuesto D se muestra adelante en las etapas 1-6:



10

5'-Cloro-5'-desoxiadenosina (639-62)

Se colocan ochenta y nueve (89) gramos (0.366 mol, 1 eq.) de adenosina, 59.3 ML (58, 1.833 mol, 2 eq.) de piridina anhidra y 1L de acetonitrilo anhidro en un matraz de 4

cuellos de 2L secado en horno, equipado con un embudo de goteo, un agitador, entrada/salida de gas y un termómetro. El conjunto de reacción se coloca en un baño de hielo/sal y se inicia agitación. Cuando la temperatura de la solución cae por debajo de 3° C se agrega lentamente cloruro de tionilo. La temperatura de la mezcla de reacción se mantiene por debajo de 5° C durante adición de cloruro de tionilo y durante 4 horas más (en este momento la solución es de color amarillo con precipitado blanco-amarillo en la parte inferior). Luego, la reacción se deja durante la noche a temperatura ambiente.

La mañana siguiente, el precipitado voluminoso se filtra utilizando un filtro de vidrio sinterizado y se lava sobre el filtro con volumen de 300 ML de acetonitrilo seco. Durante este tiempo, cambia el color del precipitado en blanco. El precipitado húmedo luego se transfiere de nuevo en el matraz de reacción de 2 L, que contiene una mezcla de 800 ML de metanol y 160 ML de agua. Se agrega ochenta mililitros (80ML) de solución de hidróxido de amonio concentrado gota a gota al matraz de reacción con agitación mecánica y enfriamiento con baño de agua. La mezcla se agita durante 45 min a temperatura ambiente y un precipitado blanco que se forma se separa del líquido mediante filtración a vacío.

25

El filtrado se concentra hasta secado utilizando evaporador giratorio de vacío, mientras que el precipitado se

cristaliza de aproximadamente 560 ML de agua caliente, se enfría en un baño de hielo-agua, y la primera cosecha de los cristales se filtra y se seca por congelación. El filtrado se utiliza como un disolvente en la cristalización de sólidos lo
5 que resulta de la evaporación giratoria del primer filtrado para obtener la segunda cosecha de producto que también se seca por congelamiento durante dos días. Ambos cultivos de cristales se secan finalmente durante dos días sobre pentóxido de fósforo en un desecador de vacío. Se obtienen
10 ochenta y cuatro (84) gramos de cristales blancos, 80.5% de rendimiento. MS (286-M+H), mp. 187° C. Selenoadenosilhomocisteína (655-40).

Se carga L-selenometionina (9.806 gramos, 50 mM, 1eq.)
15 en un matraz de tres cuellos, 2 L equipado con un termómetro, un dedo de refrigeración de gran tamaño (con medidor de burbuja en la salida), una entrada de gas amoníaco (que alcanza el fondo del matraz) y una barra de agitación magnética y se coloca en un recipiente duar de 2.5 L que
20 contiene baño de enfriamiento de CO₂-acetona. Se pasa Ar° a través del matraz antes de agregar CO₂ sólido al baño de acetona y el dedo de refrigeración. Cuando la temperatura interior del matraz se reduce por debajo -35° C se inicia el flujo de amoníaco anhidro (gas) y cuando los niveles de
25 amoníaco líquido alcanzan el volumen de 800 ML se detiene el flujo de gas.

Se agregan pequeños trozos de sodio metálico a una solución bien agitada hasta que la coloración azul-violeta de la solución se mantiene durante aproximadamente 30 seg. Se agrega un total de 2.645 gramos (115 mM, 2.3 eq.) de sodio
5 dentro de 45 minutos. La agitación y refrigeración se mantienen durante 30 minutos más. En este momento todos los componentes están en la solución. Se agrega 5'-cloro-5'-desoxiadenosina anhidra (14.856 gramos, 52 mM, 1.04 eq.) en una sola porción y la mezcla de reacción se deja con
10 agitación y flujo de Ar° muy lento durante la noche.

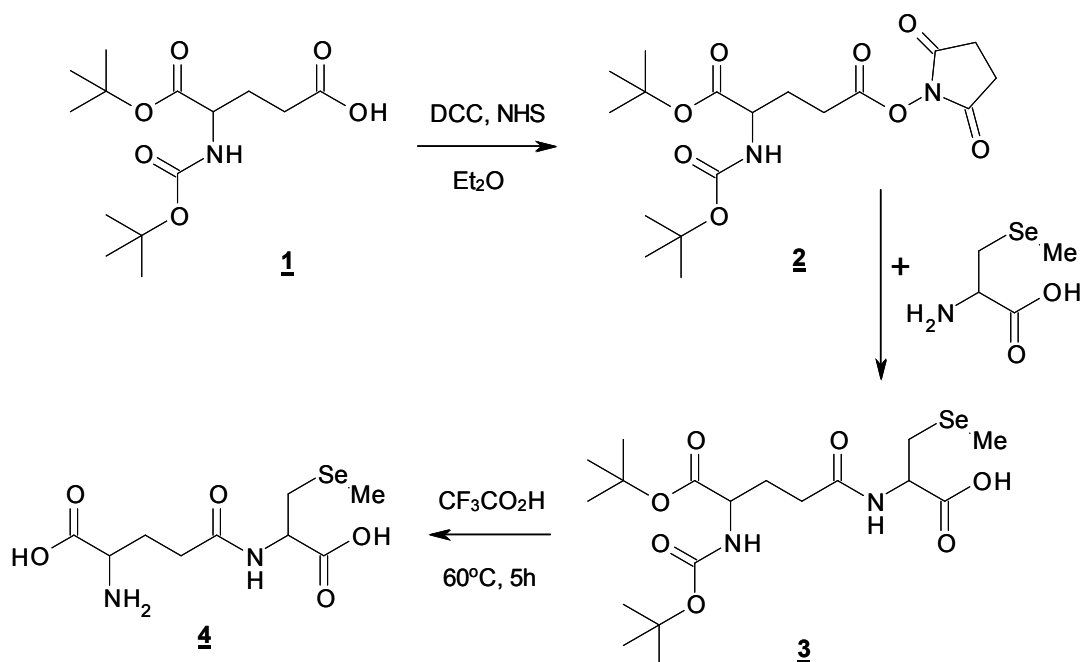
A la mañana siguiente, se agrega 350ML de de metanol anhidro a los sólidos blancos que estaban presentes en el matraz. El matraz se coloca en un baño de aceite, se instala
15 un condensador de reflujo, se mantiene flujo de gas Ar°, y un baño de aceite se calienta a 50° C para las subsiguientes 24 horas. Un mililitro (1 ML) de la solución se acidifica a pH 3.5 con unas pocas gotas de 0.1 N HCl, y la muestra se analiza para la presencia de sustratos utilizando
20 espectrometría de masas.

Si por debajo de 5%, la mezcla se puede acidificar con HCl 1 N a pH 3.5, se filtra de sales, se concentra hasta secado utilizando evaporador giratorio de vacío y el producto
25 bruto se puede purificar mediante cristalización a partir de mezcla de agua-etanol. La primera cosecha de cristales Selenoadenosilhomocisteína produjo 15.98 gramos de producto

con un rendimiento del 74%. Aún, aproximadamente el 95% del producto estaba limpio, y se podría utilizar en estudios biológicos sin purificación adicional.

5 **Ejemplo 3: Síntesis y Caracterización de Gama-glutamil-metilseleno-cisteína ("Compuesto E")**

El esquema de síntesis y metodología para producir el Compuesto E se muestra adelante con las etapas 1-4 :



10

Síntesis de N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSe (655-90)

N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OH (303 mg, 1.0 Mmol), N-hidroxisuccinimida (121 mg, 1.05 Mmol) y dicitclohexil carbodiimida (227 mg, 1.1 Mmol) se suspenden/disuelven en 15 mL de éter etílico anhidro y 10 uL de dimetiletilbencilamina se agrega desde una jeringa en la mezcla de reacción. La agitación a temperatura ambiente (22° C) se mantiene durante

48 h. La mezcla se filtra y el precipitado se lava 10 x 10 mL de éter etílico. El filtrado se concentra y se seca a alto vacío produciendo el producto cristalino de color blanco (570 mg, 90% de rendimiento). MS ($M + Na^+$) = 423.17;

5

Síntesis de N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-MeSe-Cys-OH (655 a 90)

Se agregan N-Boc-(O-tBu)-L-Glu-OSu (570 mg, 0.9 Mmol), de metilselenocisteína (175 mg, 0.8 mmol), trietilamina (152 mg, 209 μ L, 1.5 mmol) a una mezcla de 6 mL de 1,4-Dioxano y 2 mL de agua. La agitación magnética de la mezcla de reacción se mantiene durante 100 h. Después de este tiempo se agregan HCl 1.21 N (1.65 mL) y la mezcla de reacción posterior se extrae con 3x 20 mL de éter etílico. El extracto se concentra hasta secado utilizando evaporador giratorio de vacío que produce 649 mg del producto ceroso que se somete a HPLC preparativa. Se recolectaron doscientos ochenta y tres miligramos (283 mg) del producto que tienen 75.6% de rendimiento. El espectro de masas confirmó el peso molecular del producto y la presencia de un solo átomo de Se en el. Masa calculado para $C_{18}H_{32}N_2O_7Se$ = 468.42; se encuentran estos resultados 469.24 m/e ($M+H^+$) y 491.24 m/e ($M+Na^+$).

15

20

Síntesis de γ -glutamil-metilseleno-cisteína (655-92)

25

Una mezcla de 283 mg (0.6 Mmol) de N-Boc-(O-tBu) -L-Glu-Mese-Cys-OH, 2 mL de tioanisol y 5 mL de ácido trifluoroacético se calientan con agitación magnética en un

baño de aceite, durante 6 horas y a 63° C y se deja durante la noche a temperatura ambiente (22° C). Se agrega la mezcla de reacción gota a gota en 20 ML de éter etílico agitado vigorosamente. El precipitado que se forma se lava con dos
5 rondas (2x) 20 Ml de éter etílico. El producto obtenido 138.3 mg de precipitado cremoso que luego se purifica mediante HPLC preparativa.

Ejemplo 4

10

Los compuestos selenoórganicos sintéticos individuales, combinaciones de los compuestos selenoórganicos individuales, y sus análogos de azufre se probaron en un cultivo celular (*in vitro*) para efectos sobre la supervivencia o viabilidad
15 celular y expresión de genes en los ejemplos descritos aquí. En particular, las células probadas eran células AML-12 de hígado de ratón.

Materiales y Métodos

20 Estirpes celulares y Compuestos

La estirpe celular AML-12 de hígado de ratón y células IMR-32 de neuroblastos humanos se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia). Las
25 células AML-12 se amplificaron en medio Eagle modificado de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12) complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 40 ng/ml de dexametasona (Dex,

Sigma) y 1X solución de ITS (que contiene 0.01 mg/ml de insulina bovina, 0.0055 mg/ml de transferrina humana, 5ng/ml de selenio sodio) (Sigma). Las células IMR-32 se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) complementado con
5 10% de FBS.

El Compuesto C (5'-Metilselenoadenosina), Compuesto D (Se-Adenosil-L-homocisteína), y Compuesto E (Gama-glutamil-metilseleno-cisteína), y sus análogos de azufre, Compuesto H
10 (5'-Metiltioadenosina), Compuesto I (S-Adenosil-L-homocisteína), y Compuesto J (Gama-glutamil-metil-cisteína) se sintetizan o se obtienen de fuentes comerciales (cuando estén disponibles). Las purezas de todos los compuestos probados se verifican que son $\geq 99\%$, según se determina
15 mediante Espectrometría de Masas. Se utilizaron tres tandas de los compuestos sintetizados anteriormente en los siguientes experimentos.

Los valores ppb mostrados en los ejemplos aquí se
20 refieren a ppb de selenio en compuestos que contienen selenio o ppb de azufre en compuestos que contienen azufre con el fin de asegurar que se están probando cantidades equivalentes de selenio o azufre en los experimentos.

25 Con el fin de convertir ppb a base de selenio a ppb del compuesto, el % de Se en un compuesto se calcula al dividir el peso atómico de selenio por el peso molecular del

compuesto y multiplicar el dividendo por 100. Con el fin de convertir ppb a base de azufre a ppb del compuesto el % de S en un compuesto se calcula al dividir el peso atómico de azufre por el peso molecular del compuesto y multiplicar el
5 dividendo por 100.

Por ejemplo, dividir el peso atómico de selenio de 78.96 por el peso molecular de Compuesto C de 344 y multiplicar el resultado por 100, resulta en un % de selenio en el Compuesto
10 C de 23%. De forma similar, para el Compuesto D, dividir el peso atómico de selenio de 78.96 por el peso molecular de Compuesto D de 432 y multiplicar el resultado por 100, resulta en un % de selenio en el Compuesto D de 18%. Para el Compuesto E, dividir el peso atómico de selenio de 78.96 por
15 el peso molecular de Compuesto E de 311 y multiplicar el resultado por 100, resulta en un % de selenio en el Compuesto E de 25%.

Se utilizan estos valores de % Se para derivar factores
20 para convertir ppb de selenio a ppb del compuesto. Estos factores son: 4.35 para el Compuesto C, 5.46 para el Compuesto D, y 3.94 para el Compuesto E. Con el fin de convertir ppb a base de selenio a ppb del compuesto multiplicar el ppb indicado de selenio por el factor para
25 cada compuesto como se muestra en la Tabla adelante. Por ejemplo, 150 ppb de Compuesto C en los experimentos adelante se refiere a 150 ppb de selenio y es equivalente a 653 ppb de

Compuesto C.

Para los compuestos de azufre, dividir el peso atómico de azufre de 32 por el peso molecular de Compuesto H de 297, y multiplicar el resultado por 100, resulta en un % de azufre en el Compuesto H de 11%. De forma similar, para el Compuesto I, dividir el peso atómico de azufre de 32 por el peso molecular de Compuesto I de 384 y multiplicar el resultado por 100, resulta en un % de azufre en el Compuesto I de 8%. Para el Compuesto J, dividir el peso atómico de azufre de 32 por el peso molecular de Compuesto J de 264 y multiplicar el resultado por 100, resulta en un % de azufre en el Compuesto J de 12%.

Se utilizan estos valores de % Se para derivar factores para convertir ppb de azufre a ppb del compuesto. Estos factores son: 9.28 para el Compuesto H, 12.00 para el Compuesto I, y 8.25 para el Compuesto J. Con el fin de convertir ppb a base de azufre a ppb del compuesto multiplicar el ppb indicado de azufre por el factor para cada compuesto como se muestra en la Tabla adelante. Por ejemplo, 150 ppb de Compuesto H como se describe en los experimentos adelante se refiere a 150 ppb de azufre y es equivalente a 1392 ppb de Compuesto H.

Ppb de Selenio suministrado por el	Ppb equivalente del Compuesto C	Ppb equivalente del Compuesto D	Ppb equivalente del Compuesto E
------------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

Compuesto			
100	435	546	394
150	653	819	591
200	870	1092	788
300	1305	1638	1182
450	1958	2457	1773
600	2610	3276	2364
900	3915	4914	3546
ppb de Azufre suministrado por el Compuesto	Ppb equivalente del Compuesto H	Ppb equivalente del Compuesto I	Ppb equivalente del Compuesto J
100	928	1200	825
150	1392	1800	1238
200	1856	2400	1650
300	2784	3600	2475
450	4176	5400	3712
600	5568	7200	4950
900	8352	10800	7425

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular en AML-12 cultivadas se determinó utilizando equipos de ensayo de Proliferación Celular CellTiter96® AQueous One Solution de Promega, de acuerdo con

5 el protocolo y las instrucciones del fabricante. En breve, AML-12 (1×10^4 células/pozo) se sembraron en placas claras de 96 pozos (VWR) y se cultivaron en medio DMEM/F12 que contiene 10% de FBS, 1X ITS y 40 ng/ml de Dex durante la noche. Las

10 células se trataron con de control (agua) o compuestos en

medio DMEM/F12 libre de ITS que contenía 10% de FBS y 40 ng/ml de Dex durante 48 horas.

Las células cultivadas se incubaron con una solución Aqueous One (100 ul/por pozo) a 37° C durante 1 hora, y la absorbancia de OD490 nm de cada muestra se determinó por el lector de microplacas Bio-Tek. La viabilidad celular en las células cultivadas se determinó mediante la sustracción de OD490 nm en células cultivadas con OD490 nm en medios de cultivo normales (sin siembra de células). Se examinaron ocho muestras por cada tratamiento para análisis anterior. Los datos se presentan como la Media $\pm$ EEM de ocho muestras.

Tratamientos Celulares para Análisis de ARN y proteínas

Para el análisis de ARN de receptor de insulina (*Insr*), receptor de factor de crecimiento similar a insulina (*Igf1r*), y la glucosa-6-fosfatasa (*G6PC*), se amplificaron células AML-12 en medio DMEM/F12 que contiene ITS, Dex y FBS, y se cultivaron en placas de 24 pozos (6.7×10^4 células/pozo) en 10% de medio DMEM /F12 libre de FBS ITS con o sin Dex durante la noche. Estas células se trataron con control (agua) o varios compuestos (diluidos en 10% de medio DMEM /F12 libre de FBS ITS con o sin Dex) durante 6 horas, 24 horas, o 48 horas.

En algunos experimentos, las células AML-12 se lavaron dos veces con PBS después de los tratamientos con compuestos durante 24 horas, y después se incubaron con los compuestos

de selenio (150 o 300 ppb de cada compuesto) en presencia o ausencia de insulina (10 o 100 nM) , 0.1 mM 8-CPT (Sigma), o 0 Dex.5 μ M en medio DMEM libre de suero, libre de glucosa/rojo fenol complementado con lactosa 20 mM y piruvato 2 mM, y HEPES 15 mM (medio de producción de glucosa) durante otras 6 horas. Después de los tratamientos, se recolectaron los medios celulares y se sometieron a ensayos de glucosa utilizando el equipo de ensayo de glucosa Abcam de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se sometieron a lisis y se recolectaron para aislamiento de ARN y análisis por PCR de *G6PC*, *Insry* *Igflr*.

Para los estudios de expresión de proteínas, las células AML-12 se amplificaron en medio DMEM/F12 que contiene ITS, Dex y FBS, y se cultivaron en placas de 6 pozos (3.33×10^5 células/pozo) en medio DMEM /F12 libre de FBS ITS con o sin Dex durante la noche. Estas células se trataron con control (agua) o varios compuestos, ya sea en suero que contiene (10% de medio DMEM /F12 libre de FBS ITS complementado con Dex) o libre de suero (medio DMEM /F12 libre de ITS/Dex) durante 6 horas y 24 horas. Adicionalmente, las células IMR-32 de neuroblastos humanos se cultivaron en 10% de medio FBS EMEM y luego se trataron con control (agua), compuestos de selenio y sus análogos de azufre en el mismo medio que contiene suero durante 6 horas y 24 horas.

Aislamiento de ARN y análisis de PCR en Tiempo real

El ARN total de estas células se aisló utilizando Trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante, y luego se incubó con ADNasa I para eliminar cualquier ADN genómico potencial contaminado. Las muestras de ARN se sometieron a análisis PCR en tiempo real utilizando el equipo de RT de Applied-Bioscience y sondas Taqman prediseñadas (Invitrogen), como se describió anteriormente (Lan et al EMBO J 2003). Tres a seis muestras se analizaron en cada grupo de tratamiento. Los datos se normalizaron por los niveles de mARN en *Actina B* (ACTB) en cada muestra y se presentan como la media $\pm$ EEM de 3-6 muestras.

Preparación de proteínas y análisis de transferencia Western

Las células AML-12 de hígado o células IMR-32 neuronales se sembraron en placas de 6 pozos, y luego se trataron con vehículo y diversos compuestos durante 6 horas y 24 horas, como se describe aquí. Después de los tratamientos, las células se enjuagaron con PBS enfriado con hielo y se sometieron a lisis en el regulador RIPA enfriado en hielo que contiene inhibidores de proteínasa y fosfatasa completos (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA) en hielo durante 30 min. Los lisados celulares se recolectaron utilizando un rascador de células y pipeta de transferencia, y luego se centrifugaron a 12000x g durante 30 min a 4° C para eliminar el sedimento de ADN y obtener el extracto de proteína. Los niveles de proteína en el sobrenadante de estos lisados de células se determinaron utilizando el equipo de ensayo de

proteínas Pierce Micro BCA (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5 Para el análisis de transferencia de Western, cinco microgramos de proteínas totales de células tratadas con control y compuestos se sometieron a separación en gel SDS-PAGE, y luego se transfirieron a membranas de PVDF, como se describió previamente (Reddy, Liu et al. 2008 Science) . Las
10 membranas se bloquearon en una solución salina regulada con fosfato (PBS) que contiene 5% (p/v) de albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, MO), y se incubaron con anticuerpos primarios específicos. Las membranas luego se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo conjugados
15 con HRP (dilución 1: 5000, Cell Signaling, Inc.).

Todos los anticuerpos primarios, excepto Actb (Li-COR, Lincoln, Nebraska), Elf2b ϵ y pElf2b ϵ (Abcam, Cambridge, MA) se adquirieron de Cell Signaling Inc. Se detectaron señales
20 positivas sobre transferencias de membrana utilizando reactivos de Detección de Cebadores de transferencia Western de quimioluminiscencia mejorada de Amersham (GE Healthcare Lifescience, Pittsburgh, PA). Las imágenes de señales de luminiscencia en las transferencias de membrana se capturaron
25 utilizando el sistema de imagen LI-COR Odyssey Fc (Lincoln, Nebraska). La misma transferencia de membrana se peló y re-borró con otro anticuerpo como se describe en el protocolo de

detección de cebador GE WB ECL (GE Healthcare Lifescience, Pittsburgh, PA). Las densidades de banda de proteína en las transferencias de Western se determinaron utilizando el software de estudio de imagen Li-COR o software ImageJ NIH y
 5 luego se normalizaron por nivel de Actb en cada muestra. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM de tres muestras por cada grupo.

Análisis estadístico

10 Cuando fue aplicable, se utilizó la *prueba t de Student* para determinar la significación estadística de la diferencia entre los grupos tratados con solución salina y tratados con Compuestos CDE con un valor de p de menos de 0.05.

15 Resultados y discusión:

Efecto de los Compuestos CDE sobre viabilidad de células AML-12

Para probar si existe cualquier efecto tóxico de los
 20 compuestos de selenio sobre la supervivencia de células AML-12, se realizaron ensayos de viabilidad celular sobre células de hígado. Las células AML-12 se trataron con un control de agua o 150 ppb de Compuesto C individual, Compuesto D, Compuesto E, Compuesto H, Compuesto I y Compuesto J;
 25 combinaciones de los Compuestos I y J ("Compuesto IJ"); combinaciones de Compuesto D y Compuesto E ("Compuesto DE"); y combinaciones de Compuesto C, Compuesto D, y Compuesto E

("Compuestos CDE") durante 48 horas.

Ningún tratamiento de compuesto, que incluya tanto compuestos individuales y combinaciones de compuestos, 5 provoca una disminución significativa de la viabilidad celular (indicado por OD490 nm) en células AML-12 en comparación con el grupo de control (figura 1). Estos resultados demostraron que los Compuestos CDE de selenio no tuvieron ningún efecto negativo en la supervivencia o 10 viabilidad de células AML-12.

Inhibición de expresión de ARNm en *G6PC* por Compuestos CDE en células AML-12 cultivadas en medio que contiene FBS y Dex sin ITS

15 El hígado es el órgano principal para producir glucosa para mantener los niveles normales de glucosa en la corriente sanguínea. La subunidad de glucosa-6-fosfatasa catalítica (*G6PC*) es una enzima esencial para la gluconeogénesis en el hígado. Para explorar la función potencial de los Compuestos 20 CDE en el hígado, la expresión de *G6PC* se examinó por análisis de QRT-PCR en células AML-12 cultivadas en las diferentes condiciones descritas aquí.

25 Se recomienda que las células AML-12 deben ser cultivadas o amplificadas en medios que contiene complemento de suero-insulina-transferrina- selenito de sodio (ITS) y Dexametasona (Dex). Para descartar la posibilidad de que la

insulina y selenito sódico en ITS pueda interferir con la acción de los compuestos probados de selenio en células AML-12, se investigó la expresión de *G6PC* en la células AML-12 cultivadas en medio libre de ITS, pero que contienen FBS y Dex. En breve, las células AML-12 se cultivaron/amplificaron en medio de amplificación completo (10% de DMEM/F12 que contiene FBS, ITS y Dex), sembradas sobre placas de cultivo, y se cultivaron en medio que contiene FBS- y Dex libre de ITS durante la noche. Estas células se trataron con control (agua), compuestos de selenio individuales: el Compuesto C, Compuesto D, Compuesto E a la dosis de 150 ppb de cada compuesto, y azufre compuestos individuales: Compuesto H, Compuesto I, Compuesto J. una combinación de los Compuestos CDE, y una combinación de los Compuestos HIJ también se probaron sobre las células durante 48 horas. Después de estos tratamientos, se recolectaron las células y se sometieron a análisis de QRT-PCR.

Como se muestra en la figura 2A, el tratamiento de células AML-12 de hígado con la combinación de Compuestos CDE, pero no la combinación analógica de azufre de compuestos HIJ, provocó una disminución muy significativa (aproximadamente 50%) en la expresión de *G6PC* en células de hígado bajo condiciones experimentales. Adicionalmente, la expresión de *G6PC* se examina adicionalmente en células AML-12 después del tratamiento con todos los compuestos individuales (véase figura 2B). No se observó ninguna alteración

significativa (por ejemplo, aumento o disminución) de la expresión de *G6PC*. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM de 4 muestras.

5 Se observó el efecto de la disminución de expresión de *G6PC* en respuesta a la combinación de Compuestos CDE en tres experimentos repetidos utilizando diferentes tandas de células (datos no mostrados). Este efecto no se debe a los potenciales efectos tóxicos de los compuestos de selenio
10 sobre la supervivencia de células ya que los Compuestos CDE no afectaron la viabilidad de las células AML-12 bajo las mismas condiciones experimentales (véase figura 1). Estos resultados demuestran que los Compuestos CDE en combinación, pero no compuestos individuales o sus análogos de azufre,
15 pueden inhibir la expresión de *G6PC* en células AML-12 en presencia de FBS y Dex en medio de cultivo.

Una combinación de Compuestos CDE inhibe la expresión de *G6PC* en células AML12 en medio libre de ITS y Dex FBS durante 24 horas seguidas por medio libre de suero durante 6 horas

20

Se ha informado que el Dex puede regular la expresión de *G6PC* en el hígado. Se investigó los efectos de los Compuestos CDE en células AML-12 bajo condiciones de cultivo libres de
25 ITS/Dex. Las células AML-12 de hígado cultivadas bajo condiciones libres de suero durante 24 horas y 48 horas mostraron alguna morfología celular anormal. Sin embargo, no

se observó cambios morfológicos brutos en células AML-12 después del cultivo en medio libre de suero durante 6 horas (datos no mostrados). Por lo tanto, la células AML-12 se trataron previamente con Compuestos CDE medio libre de ITS/Dex pero que contiene suero, durante 24 horas seguidas de repetición del tratamiento de estos compuestos en el medio libre de suero/ITS/Dex durante 6 horas para investigar adicionalmente los efectos del Compuesto CDE sobre la expresión de *G6PC*.

10

En resumen, las células AML-12 se trataron con 150 o 300 ppb de combinación de Compuestos CDE (diluido en 10% de FBS, pero medio libre de ITS/Dex) durante 24 horas. Las células luego se lavaron dos veces con PBS para eliminar FBS residual, y se incubaron con las mismas dosis de estos compuestos de selenio en presencia o ausencia de insulina 10 o 100 nM (diluida en medio libre de FBS/ITS/Dex) durante 6 horas. Los tratamientos solo con insulina se incluyeron para comparación de la eficacia de los efectos de los Compuestos CDE y el aditivo potencial o acciones sinérgicas entre los Compuestos CDE e insulina.

20

Como se muestra en la figura 3, los tratamientos de ambas dosis de insulina (10 y 100 nM) inhibieron significativamente la expresión de *G6PC*, que se espera. El tratamiento de Compuestos CDE solos en la dosis de 150 ppb provocó una tendencia de reducción en la expresión de *G6PC*

25

(figura 3). Más dramáticamente, los tratamientos de Compuestos CDE en la dosis de 300 ppb causaron una robusta y significativa reducción en la expresión de *G6PC* en estas células AML12 de hígado, con la eficacia por lo menos comparable con insulina 100 nM (figura 3). Adicionalmente, la combinación probada del tratamiento de insulina con 150 o 300 ppb de Compuestos CDE también resultó en una reducción significativa en la expresión de mRNA en *G6PC*, en comparación con control (figura 3). Los resultados demuestran claramente que los Compuestos CDE puede imitar la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* en células AML-12 y la dosis efectiva de 300 ppb Compuestos CDE es comparable con insulina 100 nM.

Inhibición de la expresión de *G6PC* y mejora de la acción de la insulina en la regulación de expresión de *G6PC* por los Compuestos CDE en células AML-12 cultivadas bajo condiciones diabéticas simuladas (estimuladas por cAMP y Dex)

Para investigar adicionalmente los efectos de los Compuestos CDE sobre la expresión de *G6PC*, se examinó la expresión de mRNA en *G6PC* en células AML-12 cotratadas con 8-(4-clorofeniltio) cAMP permeables a células (8-CPT) y Dexametasona (Dex). EL AMP cíclico (8-CPT) y Dex SON estímulos bien conocidos de la expresión de *G6PC* y la producción de glucosa en el hígado, que imita las condiciones diabéticas *in vivo*. En resumen, las células AML-12 del hígado se trataron previamente con agua (control) o 150 ppb o 300

ppb de combinación de Compuestos CDE en 10% de FBS, pero medios libres de ITS/Dex durante 24 horas. Este tratamiento inicial fue seguido por repetición de tratamiento de estos compuestos de selenio en presencia o ausencia de insulina 10 nM o 100 nM, 8-CPT 0.1 mM, y Dex 0.5 μ M en medio libre de suero durante 6 horas. Después de estos tratamientos, se recolectaron las células y se sometieron a análisis de QRT-PCR. Los datos se presentan en la figura 4 como media $\pm$ EEM de cuatro muestras por cada grupo. Las letras diferentes ((a vs b, a' vs b' vs c', a'' vs b'' vs c'')) en la figura 4 significa una diferencia significativa entre los dos grupos.

Como se muestra en la figura 4, las células AML-12 de hígado tratadas con 8-CPT/Dex mostraron un gran aumento en la expresión de mRNA en *G6PC*. El tratamiento con ambas dosis de insulina disminuyó significativamente la expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/ Dex en células AML-12 (cuando se compara con grupo 8-CPT/Dex en el gráfico de barras en la Figura 4). Más importante aún, los Compuestos CDE en la dosis de 150 ppb también atenúa significativamente la expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/DEX. Los niveles medios de expresión de *G6PC* se redujeron adicionalmente en células AML-12 después de tratamientos de 8-CPT/Dex y la combinación de Compuestos de CDE en una dosis más alta (300 ppb), a pesar de que el valor *P* fue mayor de 0.05 (en comparación con el grupo 8-CPT/Dex) debido a la alta variación de la expresión de *G6PC* en este grupo de tratamiento. Independientemente, estos estudios

demonstraron que, como la insulina, los Compuestos CDE solo en las dosis ensayadas puede inhibir la expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/Dex (aproximadamente una reducción del 40-48% en comparación con el grupo 8-CPT/Dex).

5

Adicionalmente, el tratamiento de los Compuestos CDE a 150 ppb de dosis en combinación con insulina 10 nM, junto con 8-CPT/Dex, inhibe adicionalmente la expresión de *G6PC* en la células AML-12 en comparación con insulina 10 nM y el grupo 10 8-CPT/Dex (indicado por a' vs b' en el gráfico de barras en la figura 4). También, los niveles promedio de los niveles de mRNA en *G6PC* fueron más bajos en células AML-12 después del tratamiento con insulina 10 nM, 8-CPT/Dex y una dosis más alta de Compuestos CDE (insulina 10 nM/8-CPT/Dex/300 ppb del 15 grupo de Compuestos CDE frente a insulina 10 nM/8-CPT/Dex 150 ppb del grupo de Compuestos CDE). Sin embargo, no hubo diferencia estadística entre estos dos grupos.

Más dramáticamente, como se muestra en el gráfico de 20 barras de inserción, el tratamiento con Compuestos CDE a 300 ppb en combinación con insulina 100 nM junto con 8-CPT/Dex inhibió significativa y adicionalmente la expresión de *G6PC* en células AML-12 en comparación con la insulina 100 nM y 8 grupo/Dex -CPT (indicado por a" vs b" vs c" en el gráfico de 25 barras en la figura 4). Adicionalmente, los niveles de mRNA en *G6PC* en células AML-12 después de los tratamientos de insulina 100 nM, 8-CPT/Dex y 300 ppb de los Compuestos CDE

fueron significativamente más bajos que aquellos en insulina 100 nM/8-CPT/Dex/150 ppb del grupo de Compuestos CDE (véase gráfico de inserción en la figura 4).

5 En conjunto, estos resultados demuestran que la combinación de insulina y Compuestos CDE fue aún más efectiva que la insulina sola o Compuestos CDE solos en la inhibición de expresión de *G6PC* aumentada debido a tratamiento de 8-CPT/Dex.

10

El análisis de glucosa también se realizó en los medios cultivados de células AML-12 después de tratamientos anteriores. Desafortunadamente, los niveles de glucosa producidos por células AML-12, incluso después de
15 estimulación de 8-CPT/Dex, eran demasiado bajos para ser detectados por el ensayo de glucosa de sensible a fluorescencia (Abcam) (datos no mostrados).

En resumen, estos resultados sobre células AML-12
20 cultivadas bajo las condiciones de cultivo descritas anteriormente demuestran que los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* bajo el modelo normal e *in vitro* de la afección patológica o diabética (por ejemplo, el tratamiento de células con 8-CPT/Dex).
25 Adicionalmente, los Compuestos CDE pueden mejorar la acción de la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* en células AML-12 cultivadas en condiciones simuladas diabéticas. Estos

resultados proporcionan evidencia molecular de que los Compuestos CDE tienen el potencial para inhibir la producción de glucosa en exceso en Diabéticos Tipo I y/o Tipo II.

5 **Regulación por aumento de la expresión de *Insr* e *Igflr* en células AML-12 después de tratamiento con Compuestos CDE**

El receptor de insulina (*Insr*) y receptor 1 de factor de crecimiento similar a insulina 1 (*Igflr*) son esenciales para insulina y la acción IGF1 para controlar la expresión de *G6PC*, y la producción posteriormente de glucosa en el hígado. Para examinar si la combinación de Compuestos CDE puede modular la insulina o sensibilidad de IGF1 en las células de hígado de una manera dependiente del receptor, se determinó la expresión de insulina y los receptores de IGF1 mediante análisis de QRT-PCR.

Las Células AML-12 primero se trataron con un control de agua (control, n = 4), los Compuestos CDE de selenio, y sus compuestos HIJ de análogos de azufre (n = 4) en medio libre de ITS pero que contiene FBS-/Dex durante 24 horas y luego se sometieron a análisis de QRT-PCR de *Insr* e *Igflr*. Como se muestra en la figura 5A, el nivel de mRNA en *Insr* se incrementó fuertemente por 2,78 veces después de tratamiento de Compuestos de CDE. Del mismo modo, la expresión de *Igflr* también se estimuló significativamente por los Compuestos CDE por un aumento de aproximadamente 2,2 veces (véase figura 5B). Sin embargo, los Compuestos HIJ de análogos de azufre no

afectaron la expresión de *Insr* e *Igflr* en células AML-12 (véase figuras 5A y 5B).

Para validar adicionalmente que los Compuestos CDE
5 puedan mejorar la expresión de *Insr* e *Igflr*, células AML-12 se trataron con dos dosis de Compuestos CDE en medio libre de ITS/Dex pero que contenía FBS durante 24 horas. Las células se trataron de nuevo con las mismas dosis de Compuestos CDE en la presencia o ausencia de 8-CPT/Dex en medio libre de
10 FBS/ITS/Dex durante 6 horas. Adicionalmente, estas células se trataron con insulina durante 6 horas para ver si había alguna diferencia entre la insulina y Compuestos CDE en la expresión de *Insr* e *Igflr* de control.

15 Como se muestra en las figuras 5C y 5D, los tratamientos de Compuestos CDE en ambas dosis de 150 ppb y 300 ppb, mejora de forma significativa la expresión de *Insr* e *Igflr* en células AML-12 sin cotratamientos de 8-CPT/Dex, cuando se compara con el control (es decir, 0 ppb de grupo CDE/no
20 insulina y 8-CPT/Dex. Sin embargo, solo la insulina no aumentaron la expresión de *Insr* e *Igflr* en células AML-12 (véase figuras 5B y 5C). De manera similar, los tratamientos de Compuestos CDE en la dosis de 300 ppb, no pero insulina, también se ha mejorado significativamente la expresión de
25 *Insr* e *Igflr* en células AML-12 cotratadas con 8-CPT/Dex (véase barras negras en la figura 5C y 5D).

Estos resultados demuestran que los Compuestos CDE pueden estimular la expresión de *Insr* e *Igf1r* en células AML-12 bajo las condiciones probadas. Adicionalmente, estos datos muestran que existe una diferencia entre la insulina y la acción de los Compuestos CDE en la regulación de la expresión de genes en las células AML-12. También, los resultados sugieren que los Compuestos CDE pueden ser útiles para el tratamiento de diabéticos Tipo I y Tipo II al mejorar la sensibilidad a la insulina.

10

Juntos, los estudios de expresión de genes anteriores (figuras 2A-2B, 3, 4) demuestran que los Compuestos CDE, pero no los compuestos individuales o de sus análogos de azufre, pueden imitar a la insulina para atenuar significativamente la expresión de *G6PC*, lo que representa de esta manera una forma novedosa de reducir la producción de glucosa hepática. Estos datos también proporcionan evidencia molecular que los Compuestos CDE puede actuar en una manera similar a la insulina en la inhibición de la expresión de *G6PC* en las células de hígado de ratón, incluso en presencia de un estimulante de producción de glucosa, tales como 8-CPT/Dex (figuras 3 -4).

15
20

Adicionalmente, los Compuestos CDE en combinación también mejora la acción de insulina para inhibir la expresión de *G6PC* en células AML-12 estimuladas con 8-CPT/Dex (figura 4). Los Compuestos CDE en combinación pueden

25

estimular la expresión de *Insr* e *Igflr* (figuras 5A-5D) que también contribuyen a la reducción de la expresión de *G6PC* para la producción de glucosa en el hígado junto con sensibilidad mejorada a insulina/*Igfl* y tráfico de glucosa.

5 Más aún, los Compuestos CDE en combinación no tienen efectos tóxicos sobre la viabilidad de células de hígado (figura 1). En resumen, estos resultados demuestran que los Compuestos CDE en combinación imitan la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* y también mejora la acción de insulina en
10 el proceso, probablemente a través de la estimulación de expresión de *Insr* y/o *Igflr*, en células AML-12 de hígado de ratón sin efectos tóxicos en la supervivencia o viabilidad celular.

15 **Ejemplo 5: Fosforilación de FOXO3 y FOXO4 objetivo a Compuestos CDE en células AML-12**

La subclase de familia O de factor de transcripción de Forkhead (FOXO) cumple una función crítica en el metabolismo, gluconeogénesis, y sensibilidad a la insulina en el hígado.

20 La actividad intracelular de genes FOXO está estrechamente regulada por modificación post-traducciona. En particular, la fosforilación de FOXOS se excluye del núcleo, bloqueando de esta manera su acceso a sus genes objetivo. En individuos resistentes a insulina o diabéticos, no existe señal de
25 excluir FOXOS desde el núcleo, por lo que permanece presente en el núcleo y estimula la transcripción de *G6PC*. El aumento de expresión de *G6PC* impulsa la gluconeogénesis, que conduce

a hiperglucemia. Los factores de crecimiento similar a insulina (IGF) también pueden modular la acción de la insulina para controlar la expresión de *G6PC* mediada por FOXO para la producción de glucosa en el hígado.

5

Como se describió anteriormente, las células AML-12 del hígado demostraron que los Compuestos CDE en combinación pueden imitar la acción de la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* y puede mejorar la acción de la insulina en el proceso. Debido a que FOXOS son moléculas de señalización principales para gluconeogénesis y sensibilidad a la insulina en el hígado, se examinó la cuestión de si los Compuestos de CDE, como insulina, se dirigirán a FOXOs y otras moléculas de señalización relacionadas en la células AML-12.

15

Fosforilación de Foxo3 y Foxo4 objetivo a Compuestos CDE en células AML-12 cultivadas en medio que contiene suero

Para determinar si la combinación de Compuestos CDE puede regular la fosforilación FOXO en el hígado, las células AML-12 se trataron con control, y 150 ppb de Compuestos CDE de selenio, y sus análogos de azufre, 150 ppb de Compuestos HIJ, en medio que contiene suero y Dex pero sin ITS durante 6 horas. Las células tratadas se sometieron a análisis de transferencia Western. Los datos cuantitativos de expresión de proteínas en transferencias de Western se presentan como media $\pm$ EEM de 3 muestras. Letras diferentes en los gráficos de barras significan una diferencia significativa entre los

25

dos grupos ($P < 0.05$).

La figura 6A muestra la expresión de proteínas de diversas moléculas de señalización que incluyen Foxo3T32 fosforilado (Treonina 32; pFoxo3T32), Foxo T28 fosforilado (Treonina 28; pFoxo4T28), Pdk1 fosforilado (pPDK1), AKT T308 fosforilado (Treonina 308; pAKTT308), AKT S473 fosforilado (Serina 473; pAKTS473), AKT, Gsk3a S21 fosforilado (Serina 21; pGsk3bS21), Gsk3b S9 fosforilado (Serina 9; pGsk3bS9), Gsk3a, Gsk3b, 4EBP1 T37/46 fosforilado (Treonina 37 y Treonina 46; p4EBP1T37T46), Elf2bεS539 fosforilado (Serina 530; pElf2bεS530) y Elf2bε en células AML-12 después de tratamiento con agua, y 150 ppb de los Compuestos HIJ y 150 ppb de los Compuestos CDE diluidos en medio que contiene suero y Dex (pero sin ITS) durante 6 horas. Se ha encontrado que las formas fosforiladas de proteínas Foxo3 (por ejemplo, pFoxo3 en treonina 32, pFoxo3T32) y Foxo4 (por ejemplo, pFoxo4 en treonina 28, pFoxo4T28) se encuentran que se elevan visiblemente en células AML-12 después de tratamiento con Compuestos CDE, pero no Compuestos HIJ, durante 6 horas (figura 6A). El análisis cuantitativo mostrado es aproximadamente un aumento de 2.5- veces de pFoxo3T32 y aproximadamente un aumento de 3.2 veces de pFoxo4T28 en células AML-12 tratadas con Compuestos CDE (figura 6B y 6C). También probamos varios anticuerpos Foxo1 (pFoxo1) fosforilados, pero sin detectar una banda específica de proteínas pFoxo1 sobre transferencias Western de estos

anticuerpos (datos no mostrados). Los resultados sugieren que la expresión de pFoxo1 en las células AML-12 es probablemente muy baja.

5 Se realizaron análisis de QRT-PCR de los niveles de proteína *Foxo1*, *Foxo3*, y *Foxo4* en células AML-12 después del mismo tratamiento descrito anteriormente. No existió ninguna observación de cualquier cambio significativo de expresión de mARN de *Foxo1*, 3, o 4 la (datos no mostrados) y el aumento
10 observado de FOXO3 y Foxo4 fosforilados (véase figuras 6A-6C) no es debido al aumento potencial de expresión de FOXO3/4 de proteínas en células AML-12 por Compuestos CDE. De hecho, los niveles de proteína total Foxo3 y Foxo4 no se vieron afectados por los Compuestos CDE en la células AML-12
15 cultivadas en condiciones libres de suero (véase figura 7A).

Adicionalmente, el Compuesto C individual, el Compuesto D y el Compuesto E cada uno a 150 dosis ppb en células AML-12 se ensayaron para determinar el efecto sobre fosforilación
20 Foxo3/4 en la misma condición de cultivo (en medios que contienen suero) durante 6 horas y 24 horas. No se observó ningún cambio de los niveles de proteína pFoxo3T32 y pFoxo4T28 después del tratamiento con Compuesto C individual, Compuesto D o tratamiento con Compuesto E (datos no
25 mostrados), indicando que existe un efecto sinérgico entre el Compuesto C, Compuesto D y Compuesto E en combinación que lleva a fosforilación de Foxo3 y Foxo4 en células AML-12.

En conjunto, estos resultados demuestran que los Compuestos CDE, pero no los compuestos individuales o de sus análogos de azufre, pueden mejorar la fosforilación de Foxo3 y Foxo4 en células AML-12 cuando se cultivan en medio que contiene suero. Cuando la fosforilación de FOXOs resulta en la exclusión nuclear de estos factores de transcripción, estos resultados sugieren que los Compuestos CDE funcionarán como inactivadores de Foxo3 y Foxo4 en las células AML-12.

10

Debido a que la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/quinasa 1 proteína dependiente de fosfoinositida (PDK1)/quinasa B de proteína (AKT) es la principal ruta de señalización en dirección 5' de FOXOs para el control mediado por insulina mediante la producción de glucosa en el hígado, se evaluó si no hubo ningún cambio en los niveles de PDK1 fosforilado (pPDK1) y AKT (pAKT) en estas células AML-12 tratadas con el compuesto. Sorprendentemente en los probados 6 horas de tratamiento, los Compuestos CDE no afectaron a la fosforilación de PDK1 y AKT, o los niveles de AKT total (figura 6A). Esto podría ser debido a los potenciales efectos transitorios de Compuestos CDE sobre la activación de PDK1 y AKT que se producen en células AML-12 en puntos de tiempo anteriores (antes del punto de tiempo de 6 horas probado examinado).

25

Adicionalmente, los niveles de otras dos moléculas de

señalización en dirección 3', GSK3a y GSK3b fosforilada, que son controlados directamente por AKT, no se observa que tienen cualquier cambio en sus niveles de proteína (figura 6A). Los niveles de 4EBP1 fosforilada (un objetivo molecular en dirección 3' de señalización AKT/ mTOR) y pelf2Bε S539 (una objetivo molecular en dirección 3' de GSK3), que son clave para la síntesis de proteínas de insulina impulsada o de traducción también no se vieron afectados (véase figura 6A). Estos resultados proporcionan evidencia molecular directa adicional que los Compuestos CDE no tenían un efecto tóxico sobre la proliferación de células AML-12 o la supervivencia como se describió anteriormente (figura 1).

En conjunto, estos resultados sugieren que los Compuestos CDE no afectan a varias moléculas de señalización en dirección 3' de directos o indirectos a AKT tales como Gsk3a, GSK3b, p4EBP1 y pElf2bε S539, excepto Foxo3 y Foxo4 descritos anteriormente en células AML-12 en presencia de suero en medio de cultivo. En otras palabras, los Compuestos CDE pueden inactivar selectivamente Foxos al mejorar su fosforilación en células AML-12 de hígado.

Fosforilación de Foxo3/4 objetivo a Compuestos CDE en células AML-12 cultivadas en condiciones libres de suero

Como se mencionó anteriormente, se pueden cultivar células AML-12 en un medio libre de suero durante un período de tiempo corto (es decir, 6 horas) sin defectos morfológicos

evidentes (datos no mostrados). Por lo tanto, se examinó los niveles de proteína de las proteínas Foxo3 y Foxo4 fosforilados en células AML-12 cultivadas bajo condiciones libres de suero.

5

En breve, se trataron células AML-12 con control (agua), los Compuestos CDE (150 ppb de selenio de cada compuesto), los Compuestos CE (150 ppb de selenio de cada compuesto) o Compuestos DE (150 ppb de selenio de cada compuesto) en medio
10 libre de suero, libre de ITS, y libre de Dex durante 6 horas y se sometió a análisis de transferencia de Western y análisis cuantitativo. Los datos cuantitativos se normalizaron por nivel de proteína Actb y se presentan como la media $\pm$ EEM de 3 muestras. Letras diferentes en los
15 gráficos de barras de las figuras. 7B y 7C significa una diferencia significativa entre aquellos dos grupos ($P < 0.05$).

Como se muestra en la figura 7A, se encontró que los niveles de proteína fosforilada de Foxo3 (pFoxo3 en la
20 treonina 32) y Foxo4 (pFoxo4 en la treonina 28) son elevados en células AML-12 después del tratamiento con Compuestos CDE y compuestos CE, pero no Compuestos DE, durante 6 horas en medio libre de suero. No hubo ningún cambio evidente de los niveles de proteína total Foxo3 y Foxo4 después de los
25 tratamientos con los compuestos de selenio (figura 7A). No se detectó banda específica de pFoxo1 utilizando varios anticuerpos pFoxo1 específicos sobre estas muestras de

proteínas (datos no presentados).

El análisis cuantitativo mostró que había un aumento de aproximadamente 1.8 veces de pFoxo3T32 (figura 7B) y un
5 aumento de 6 veces de los niveles de pFoxo4T28 (figura 7C) en células AML-12 tratadas con compuestos CDE y tratados con compuestos CE. Todas las demás moléculas probadas tales como pPdk1, pAkt, pGsk3a, pGsk3b, y p4ebp1 no fueron obviamente alteradas por Compuestos CDE (véase figura 7A). Los
10 resultados anteriores obtenidos a partir de la células AML-12 cultivadas en condiciones libres de suero mediante Compuestos CDE son consistentes con los hallazgos de células AML-12 cultivadas en medio que contiene suero (figuras 6A-6C). La mejora de fosforilación Foxo3 y Foxo4 por loa Compuestos CDE
15 en células AML-12 es totalmente independiente de FBS, factores de crecimiento o insulina, ya que la insulina o FBS no se agregaron al medio de cultivo de las células en este experimento. En otras palabras, los Compuestos CDE pueden pasar por alto la insulina o factores de crecimiento para
20 inactivar Foxo3 y Foxo4 en células de hígado.

En resumen, estos resultados demuestran que los Compuestos CDE se pueden dirigir específicamente a la fosforilación Foxo3 y Foxo4 en la células AML-12 cultivadas
25 en ambos medios que contienen suero (figuras 6A-6C) y libres de suero (figuras 7A-7C). Por lo tanto, se puede concluir a partir de estos estudios que el Compuesto CDE son

inactivadores FOXO novedosos y la inactivación de estas moléculas FOXO por Compuestos CDE es independiente de insulina, FBS y otro factor de crecimiento en células de hígado de ratón.

5

Para probar si el aumento observado de la fosforilación de Foxo4 en las células AML-12 de hígado es un efecto general de la combinación de Compuestos CDE en células de mamíferos, se examinaron los niveles pFOXO4 en una estirpe celular neuronal IMR-32 diferente de hígado en que las pruebas se realizaron al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones experimentales que las células AML-12 del hígado. Como se muestra en la figura 8, no se observó el aumento de la fosforilación Foxo4 en células IMR-32 neuronales tratadas con Compuestos CDE. También se examinaron y encontraron niveles de proteína Foxo1 y FOXO3 fosforilados en los que el Foxo3 fosforilado se había detectado y FOXO1 fosforilado no se detectaron en células IMR-32 por sus anticuerpos específicos (datos no mostrados). Independientemente, la ausencia de aumento de fosforilación de FOXO4 en células IMR-32 por los Compuestos CDE (figura 8) indica que los Compuestos CDE en combinación probablemente no tienen efectos tóxicos sobre células neuronales. Por lo tanto, podemos concluir que la fosforilación FOXO potenciada por Compuestos CDE es probablemente específica a célula de hígado.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los

Compuestos CDE, pero no los compuestos individuales o de sus análogos de azufre, funcionarán como inactivadores de FOXO específicos a células de hígado novedosas y que la inactivación de estas moléculas FOXO en las células de hígado de ratón por Compuestos CDE es independiente de insulina y cualesquiera otros factores de crecimiento.

Los datos previos descritos aquí demuestran que los Compuestos CDE puede imitar la acción de insulina para inhibir la expresión de *G6PC* y mejorar la acción de insulina para inhibir la expresión de *G6PC* en las células AML-12 (figuras 3-4). Este último (figura 4), como se discutió anteriormente, se podría también atribuir a una mayor expresión de *Insr* e *Igf1r* (figuras 5A-5D). Todos estos eventos son probablemente debido a la inactivación independiente de insulina/ factor de crecimiento/FBS de Foxo3 y Foxo4 por Compuestos CDE (figuras 6A-6B, 7A-7C), ya que el *G6PC* es un gen objetivo FOXO conocido en hígado humano mientras que los *Insr* e *Igf1r* son dos genes Foxo3/4 objetivo potenciales debido a la presencia de muchos motivos de unión Foxo en sus promotores de genes (datos no mostrados). La expresión de *Insr* e *Igf1r* mejorada por los Compuestos CDE (figuras 5A-5D) mejorará aún más la acción de la insulina o mejorará la sensibilidad a la insulina para estimular adicionalmente la fosforilación de Foxo3/4 para inhibir la expresión de *G6PC*.

Independientemente, estos resultados sugieren que la combinación de Compuestos CDE puede actuar específicamente como un inactivador FOXO independiente de insulina o independiente de otro factor de crecimiento potente en células AML-12 de hígado para reducir la expresión de *G6PC* y probablemente reducir la producción de glucosa hepática. Adicionalmente, la administración de los Compuestos CDE es probable que disminuya las consecuencias fisiológicas de una célula del hígado que se convierte en resistente a la insulina, en el contexto del control de la expresión de *G6PC* para reducir la producción de glucosa hepática. Al pasar por la insulina para mejorar la fosforilación de Foxo mediante los Compuestos CDE, sin dejar de ser capaz de controlar la homeostasis de glucosa a través de la regulación de la expresión de *G6PC* mediada por FOXO, se abren muchas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de diabetes en general. Como consecuencia, el tratamiento de diabetes se vuelve menos dependiente de la administración unilateral de insulina exógena o, el correcto funcionamiento de los receptores de insulina.

Ejemplo 6

Los Compuestos de CDE en combinación mejoran la acción de la insulina en la inhibición de la expresión de *G6PC* y la producción de glucosa y pasa la insulina para regular la señalización de PDK1/Akt/Foxo1/3/4 en hepatocitos primarios de ratón, sin ser tóxico a las células

Una combinación de tres compuestos selenoórganicos sintéticos, Compuestos CDE, se probaron en combinación en un cultivo celular de hepatocitos de ratón primarios para los efectos sobre la producción de glucosa, expresión de *G6PC* y fosforilación de Foxo1/3/4.

Materiales y métodos

Aislamiento de hepatocitos primarios de ratón y compuestos

Los hepatocitos primarios de ratón se adquirieron de Research Triangle Labs, LLC (Research Triangle Park, Carolina del Norte). Estos hepatocitos primarios de ratón se aislaron de ratones C57BL6 normales adultos sanos, cultivados sobre placas recubiertas con colágeno de 12 pozos o de 24 pozos durante 24 horas en Triangle Research Labs (TRL) y luego enviadas a nuestro laboratorio para experimentos.

Los Compuesto C (5'-Metilselenoadenosina), D (Se-Adenosil-L-homocisteína) y E (Gama-glutamyl-metilselenocisteína), se sintetizaron en el Laboratorio Químico de Alltech, Inc. Las purezas de todos los compuestos probados se verifican que son $\geq 99\%$, según se determina mediante Espectrometría de Masas.

Cultivo de células y tratamientos

Los hepatocitos primarios de ratón, cultivados en placas de cultivo recubiertas con colágeno de 12 o 24 pozos, se recibieron de Triangle Research Lab (TRL) en el día 3 después

del aislamiento de hepatocitos frescos de ratones y se cultivaron en medio de mantenimiento de hepatocitos (TRL) en un incubador de CO₂ al 5% a 37° C para permitir que los hepatocitos se aclimaten durante 8 horas o durante la noche, de acuerdo con el procedimiento recomendado de TRL (Research Triangle Park, Carolina del Norte).

Los hepatocitos aclimatados durante la noche se lavaron dos veces con PBS (para eliminar cualquier FBS residual y otros aditivos en el medio de mantenimiento de hepatocitos TRL, tratado previamente con control (agua) o Compuestos CDE de selenio (150 o 300 ppb de cada compuesto de selenio) en medio DMEM/F12 complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) durante 24 h. Luego, estas células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con la misma dosis de Compuestos CDE de selenio (150 o 300 ppb) en presencia o ausencia de insulina (10 o 100 nM, Sigma), 8-CPT 0.1 mM (Sigma) o Dex 0.5 µM (Sigma) en medio DMEM libre de suero y libre de glucosa (Invitrogen) complementado con lactosa 20 mM (Sigma) y piruvato 2 mM (Sigma) y HEPES 15 mM (Sigma) durante otras 6 horas. Después de los tratamientos, se recolectaron medios celulares y se sometieron a ensayo de glucosa y estudios toxicológicos de lactato deshidrogenasa (LDH) y se recolectaron células de los medios de comunicación celulares análisis de ARN y de proteínas.

Para los estudios de los Compuestos CDE sobre

hepatocitos primarios de ratón bajo condiciones de cultivo totalmente libre de suero, los hepatocitos se aclimataron en medio de mantenimiento de hepatocitos (TRL) durante 8 horas, se lavaron dos veces con PBS (para eliminar cualquier FBS residual y otros aditivos en la placa de cultivo) y luego se privaron de medio DMEM/F12 libre de suero durante la noche. Algunos de estos hepatocitos privados de suero se trataron con control (agua), compuestos de selenio (150 o 300 ppb de cada compuesto) en presencia o ausencia de insulina (10 o 100 nM), 8-CPT 0.1 mM (Sigma) o Dex 0,5 μ M (Sigma) en medio DMEM libre de suero y libre de glucosa/ rojo fenol complementado con lactosa 20 mM y piruvato 2 mM y HEPES 15 mM durante 6 horas. Después de un tratamiento de 6 horas, se recolectaron los medios de cultivo para análisis de la glucosa y estudios toxicológicos que monitorizan la actividad de LDH y se aislaron células cultivadas para análisis de proteínas. Adicionalmente, algunos hepatocitos privados de suero se trataron con Compuestos CDE (300 ppb de cada compuesto) en medios DMEM/F12 normal durante 0, 5, 30, 60, 120 y 180 min y se recolectaron las células para el análisis de proteínas del curso del tiempo de diversas moléculas de señalización.

Aislamiento de ARN y análisis de PCR en tiempo real

El ARN total de estas células se aisló utilizando Trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante y luego se incubó con DNasa I para eliminar cualquier ADN genómico potencial contaminado. A continuación, las muestras

de ARN se sometieron a análisis PCR en tiempo real utilizando el equipo de RT de Applied-Bioscience y sondas Taqman prediseñadas (Invitrogen), como se describió anteriormente (Lan et al EMBO J 2003). De tres a cuatro muestras se
5 analizaron en cada grupo de tratamiento. Los datos se normalizaron por el nivel de ARNm e *Actb* en cada muestra y se presentan como la media $\pm$ EEM de 3-4 muestras.

Preparación de proteína y análisis de transferencia Western

10 Después de los tratamientos descritos anteriormente, los hepatocitos primarios de ratón se enjuagaron con PBS enfriado con hielo y se sometieron a lisis en el regulador RIPA enfriado en hielo que contiene inhibidores de proteinasa y fosfatasa completos (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA)
15 en hielo durante 30 min. Los lisados celulares se recolectaron utilizando un rascador de células y transferencia de pipeta y luego se centrifugaron a 12000 x g durante 30 min a 4° C para eliminar el sedimento de ADN y obtener el extracto de proteína. Los niveles de proteína en
20 el sobrenadante de estos lisados de células se determinaron utilizando el equipo de ensayo de proteínas Pierce Micro BCA (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

25 Para el análisis de transferencia de Western, cinco microgramos de proteínas totales de células tratadas con control y tratadas con el compuesto (s) se sometieron a

separación en gel SDS-PAGE y después se transfirieron a membranas de PVDF, como se describió previamente (Reddy et al. 2008 Science). Las membranas se bloquearon en una solución salina regulada con fosfato (PBS) que contiene 5% (p/v) de albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, MO) y se incubaron con anticuerpos primarios específicos, seguido por la incubación con anticuerpos secundarios con anti-ratón o anti-conejo conjugados con HRP (dilución 1: 5000, Cell Signaling Inc.). Todos los anticuerpos primarios, excepto Actb (Li-COR, Lincoln, Nebraska), se adquirieron de Cell Signaling Inc. Se detectaron señales positivas sobre transferencias de membrana utilizando reactivos de Detección de Cebadores de transferencia Western de quimioluminiscencia mejorada de Amersham (GE Healthcare Lifescience, Pittsburgh, PA). Las imágenes de señales de luminiscencia en las transferencias de membrana se capturaron utilizando el sistema de imagen LI-COR Odyssey Fc (Lincoln, Nebraska). La misma transferencia de membrana se peló y re-borró con otro anticuerpo como se describe en el protocolo de detección de cebador GE WB ECL (GE Healthcare Lifescience, Pittsburgh, PA). Las densidades de banda de proteína en las transferencias de Western se determinaron utilizando el software de ImageJ NIH y luego se normalizaron por nivel de Actb en cada muestra. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM de tres muestras por cada grupo.

Análisis de producción de glucosa

Los medios de cultivo celulares de los tratamientos descritos anteriormente se recolectaron y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos para eliminar cualesquier hepatocitos desalojados potenciales y se sometió a análisis de glucosa utilizando un equipo de ensayo de glucosa colorimétrico (Abcam) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La absorbancia a 570 nm de las muestras y varias concentraciones de estándares de glucosa se determinaron por el lector de microplacas Bio-Tek, y se obtuvo la concentración de glucosa en el medio de cada muestra de la curva estándar de glucosa, y luego se normalizaron por su nivel de proteínas en células adjuntas que se determinaron utilizando el equipo de ensayo de proteínas Pierce Micro BCA (Thermo Scientific-pieza Biotecnología, Rockford, IL) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de glucosa en cada grupo de tratamiento se dividieron por el nivel medio en el grupo control (sin los tratamientos de Compuestos CDE, insulina, 8-CPT y Dex) para obtener el nivel de glucosa relativa. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM de 3-4 muestras.

Estudios toxicológicos al examinar el nivel de LDH en medio de cultivo

Al igual que en el ensayo de glucosa anterior, se recolectaron los medios de cultivo celular a partir de los tratamientos descritos anteriormente y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos para eliminar cualesquier hepatocitos

desalojados potenciales y se sometió a análisis de LDH utilizando un equipo de ensayo de glucosa colorimétrico (Abcam) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, la absorbancia a OD450 nm en los estándares de LDH y las muestras de medio de cultivo después de incubación con sustratos de LDH por cada dos minutos hasta 40 minutos se determinaron mediante el lector de microplacas Bio-Tek. La concentración de LDH en el medio de cada muestra se obtuvo al sustraer la lectura OD450 dentro del rango lineal de la absorbancia seguida al utilizar la curva estándar LDH, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El nivel de LDH obtenido en el medio de cada muestra se normalizó por su nivel de proteínas en células adheridas. Los niveles de LDH en cada grupo de tratamiento se normalizaron adicionalmente por el valor medio del grupo de control (sin los tratamientos de Compuestos CDE, insulina, 8-CPT y Dex) para obtener el nivel de LDH en relación en cada grupo. Los datos se presentan como la Media $\pm$ EEM de 3-4 muestras.

20 **Análisis estadístico**

Si procede, se realizó la prueba t de Student para determinar la diferencia estadística entre los dos grupos. Se consideró significativo el valor P menor de 0.05.

25 **Resultados y discusión**

Compuestos CDE en combinación inhiben la producción de glucosa y expresión de G6PC en hepatocitos primarios de ratón

Los estudios previos descritos aquí en células AML-12 demuestran que los Compuestos CDE puede imitar la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* (figuras 3-4), pero no
5 tienen efectos tóxicos en viabilidad celular de AML-12 (figura 1). Sin embargo, si los Compuestos CDE pueden controlar la producción de glucosa en células AML-12 no fue establecido, ya que los niveles de glucosa en el medio de cultivo producido por células AML-12 eran demasiado bajos
10 para ser detectados por un equipo de ensayo sensible a glucosa por fluorescencia (Abcam, datos no mostrado). Por lo tanto, los hepatocitos primarios de ratón se utilizaron para investigar si los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para inhibir la producción de glucosa y para confirmar aún
15 más los efectos inhibidos de los Compuestos CDE sobre la expresión de *G6PC* pero sin efectos tóxicos sobre la supervivencia celular observada en células AML-12.

Al igual que en los estudios sobre células AML-12, se
20 trataron previamente hepatocitos primarios de ratón con un control (agua) o 150 ppb y 300 ppb de dosis de Compuestos CDE de selenio en medio DMEM /F12 que contiene suero durante 24 horas. Este tratamiento fue seguido por re-tratamientos con estos compuestos de selenio en presencia o ausencia de
25 insulina (10 y 100 nM) o insulina sola durante 6 horas. Adicionalmente, un cAMP permeable a células, 8-CPT y Dex también se agregan a algunos hepatocitos pretratados con

control durante 6 horas para validar si los hepatocitos primarios de ratón estaban funcionando en respuesta a estos estímulos conocidos de la producción de glucosa en las células del hígado. Después de los tratamientos descritos
5 anteriormente, se recolectaron los medios de cultivo celular para el ensayo de glucosa y análisis toxicológico (al medir los niveles de LDH). Las células adheridas se sometieron a análisis de proteínas para determinar los niveles de proteína en cada pozo que refleja las células totales en la muestra.
10 Luego los niveles de glucosa obtenidos en medio de cultivo se normalizaron por niveles de proteína en cada muestra. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM de 4 muestras. En las figuras. 9A-9B, el * $P < 0.05$ frente al grupo de tratamiento con vehículo (la primera barra en los gráficos). En la figura
15 9C, hay un aumento significativo en todos los grupos de tratamiento frente al grupo de tratamiento de control (la primera barra en la gráfica).

Como se muestra en la figura 9A, los tratamientos de 8-
20 CPT/Dex provocaron un aumento significativo de la producción de glucosa en hepatocitos primarios, que indica que estos hepatocitos primarios eran biológicamente funcionales incluso después de haber sido procesado, enviado y cultivados durante 5 días, debido a su aislamiento inicial de hígados de ratón.
25 Para apoyar adicionalmente este hallazgo, el tratamiento con insulina sola en 10 nM y 100 nM dosis provocó una disminución significativa de la producción de glucosa (alrededor de una

disminución del 25-30% en comparación con el grupo de control tratado con agua; véase figura 9A.).

Más importante aún, los tratamientos con Compuestos CDE en ambas dosis (150 ppb y 300 ppb) redujo significativamente la producción de glucosa en una disminución de aproximadamente 20-28% en comparación con el grupo de control tratado con agua (véase figura 9A). Los cotratamientos del Compuesto CDE con insulina también inhibieron significativamente la producción de glucosa en aproximadamente un 32-38% de disminución en tratamientos probados en comparación con el grupo control (véase figura 9A).

Se debe enfatizar aquí que el grado de la disminución de la producción de glucosa por los Compuestos CDE en ambas dosis de prueba fueron comparables con la insulina (10 o 100 nM), lo que sugiere que los Compuestos CDE a las dosis probadas son tan efectivos como la insulina a la concentración de 100 nM para inhibir la producción de glucosa. Nuestros datos también indican que la disminución máxima alcanzable de la producción de glucosa por la insulina, los Compuestos CDE o ambos es de aproximadamente 20 a 38% en estos hepatocitos. Independientemente, nuestros datos demuestran que los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para inhibir la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón.

El *G6PC* es esencial para la producción de glucosa en el hígado. Por lo tanto se examinó la expresión de *G6PC* en la misma tanda de los hepatocitos después de los mismos
5 tratamientos. En resumen, un conjunto duplicado de hepatocitos primarios se trataron previamente con el control (agua) o Compuestos CDE de selenio en las dosis de 150 y 300 ppb en medio DMEM/F12 que contiene suero, seguido por re-tratamientos con estos compuestos de selenio en la presencia
10 o ausencia de insulina (10 y 100 nM) durante 6 horas. Después de estos tratamientos, se recolectaron los hepatocitos y se sometieron a aislamiento de ARN seguido por análisis de QRT-PCR de *G6PC* y *Actb*.

15 Como se muestra en la figura 9B, la insulina sola o en presencia de ambas dosis de Compuestos CDE inhibe significativamente la expresión de *G6PC*. Los Compuestos CDE a 150 ppb también provocaron una disminución de la expresión de *G6PC* (aproximadamente 31% de disminución, figura 9B), a pesar
20 de que no fue estadísticamente significativo probablemente debido al número limitado de muestras. Sin embargo, se observó una disminución significativa (42% de disminución) de los niveles de ARNm en *G6PC* en los hepatocitos después del tratamiento con Compuestos CDE solo a 300 ppb (figura 9B).
25 Estos resultados demuestran que los Compuestos CDE también puede imitar la insulina, aunque ligeramente menos eficiente que la insulina en dosis de 100 nM, para inhibir la expresión

de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón. Estos hallazgos son consistentes con la inhibición de la expresión de *G6PC* en células AML12 (figura 3) y la producción de glucosa atenuada por los Compuestos CDE en hepatocitos primarios de ratón
5 descritos anteriormente (figura 9A).

La lactato deshidrogenasa (LDH) se utiliza ampliamente en el desarrollo de fármacos para el estudio de la toxicidad de compuesto en las células del hígado. Un aumento del nivel
10 de LDH en los medios de cultivo (después normalizado por los niveles de proteína en células cultivadas) por los tratamientos de compuestos sugiere que el compuesto será tóxico para las células de hígado debido a la ruptura celular o fugas de la membrana celular para la liberación de LDH
15 citosólica en medio de cultivo. Para investigar si los Compuestos CDE son tóxicos para los hepatocitos primarios de ratón y si la disminución observada de la producción de glucosa y la expresión de *G6PC* por Compuestos CDE (figuras 9A y 9B) fue debido a la toxicidad, se examinó los niveles de
20 LDH en los medios de hepatocitos primarios de ratón después del tratamiento con Compuestos CDE como se describe en el ensayo de glucosa anterior.

En breve, los hepatocitos primarios de ratón se trataron
25 previamente con control (agua) o Compuestos CDE de selenio a las dosis de 150 y 300 ppb en medio DMEM/F12 que contiene suero, seguido de repetición del tratamiento con estos

compuestos de selenio en presencia o ausencia de insulina (10 y 100 nM) durante 6 horas. Luego, se recolectaron los medios de cultivo celular para el análisis toxicológico de LDH y las células unidas fueron sometidas a análisis de proteínas para
5 determinar los niveles de proteína en cada uno. El nivel de LDH en medio de cultivo obtenido se normalizó por su nivel de proteína en cada muestra.

Como se muestra en la figura 9C, el tratamiento con
10 Compuestos CDE, la insulina o ambos no provocó un aumento significativo de los niveles de LDH en los medios. En cambio, los niveles de LDH parecen estar ligeramente disminuidos en los hepatocitos después del tratamiento con Compuestos CDE a la dosis de 300 ppb, ya sea en la presencia o ausencia de
15 insulina, lo que indica que los Compuestos CDE a una dosis más alta pueden afectar incluso un efecto protector contra la descomposición celular.

Como tal, estos resultados demuestran que los Compuestos
20 CDE no son tóxicos para los hepatocitos de ratón primarios, lo cual es consistente con los efectos no tóxicos de los Compuestos CDE sobre la viabilidad de células AML-12 (figura 1). Adicionalmente, estos resultados también excluyen la posibilidad de que la disminución observada anteriormente de
25 la producción de glucosa y la expresión de *G6PC* (figuras 9A y 9B) es provocada por los hepatocitos menos saludables en hepatocitos primarios de ratón después del tratamiento con

Compuestos CDE.

En conjunto, los estudios anteriores demuestran que los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* y, más importante, la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón, sin ser tóxico para las células. Estos resultados son consistentes con la inhibición independiente de insulina de la expresión de *G6PC* y ninguna toxicidad para la supervivencia celular observada en células AML-12 de hígado de ratón establea (figura 1 y la figura 3).

Inhibición de la producción de glucosa y expresión de *G6PC* y mejora de la acción de la insulina en estos procesos en hepatocitos primarios de ratón bajo condiciones diabéticas simuladas (simulados por 8-CPT y Dex) por compuestos CDE

Los estudios descritos aquí demuestran que los Compuestos CDE en combinación puede imitar la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* y mejorar la acción de insulina en células AML-12 bajo el estímulo de 8-CPT/Dex (figura 4). Para investigar más a fondo los efectos de los Compuestos CDE, se examinaron la producción de glucosa y la expresión de ARNm en *G6PC* en los hepatocitos primarios de ratón cotratados con cAMP y Dex, dos estímulos bien conocidos de producción de glucosa y expresión de *G6PC* en el hígado.

En breve, los hepatocitos primarios de ratón se trataron

previamente con el control (agua) o 150 o 300 ppb de combinación de los Compuestos CDE en 10% de medio FBS DMEM/F12 durante 24 horas seguido de repetición del tratamiento de estos compuestos de selenio en presencia o
5 ausencia de insulina 10 o 100 nM, 8-CPT 0.1 mM y Dex 0.5 μ M en medio libre de suero durante 6 horas. Después de estos tratamientos, se recolectaron los medios de cultivo para ensayos de glucosa y LDH como se describió anteriormente. También un conjunto duplicado de hepatocitos primarios de
10 ratón (de la misma tanda de hepatocitos) después de los mismos tratamientos como se describió anteriormente se sometieron a análisis QRT-PCR de la expresión de *G6PC*. Los datos se presentan como medio $\pm$ EEM de 3-4 muestras. En las figuras. 10A-10B, letras diferentes (a vs b, a' vs b' vs c',
15 a'' vs b'' vs c'') significan una diferencia significativa entre aquellos dos grupos. En la figura 10C, el * $P < 0.05$ frente al grupo de tratamiento con vehículo (la primera barra en la gráfica).

20 Como se muestra en la figura 10A, el tratamiento con 8-CPT/Dex provocó un aumento significativo en la producción de glucosa en comparación con el grupo de tratamiento de solo control. Estos datos indicaron que los cultivos de hepatocitos primarios de ratón son funcionales. Los
25 tratamientos con ambas dosis de insulina disminuyeron significativamente la producción de glucosa 8 inducida por -CPT/Dex en los hepatocitos, en comparación con el grupo 8-CPT

/Dex (véase figura 10A). Es importante destacar el tratamiento con Compuestos CDE en la dosis de 150 ppb que tienden a inhibir la producción de glucosa estimulada con 8-CPT/ Dex en los hepatocitos. Más dramáticamente, Compuestos CDE a la dosis de 300 ppb inhibió significativamente la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/ Dex en los hepatocitos y el grado de disminución de la producción de glucosa era casi idéntica a los efectos de insulina 100 nM. Estos resultados sugieren que los Compuestos CDE a 300 ppb es tan efectivo como la insulina a la concentración de 100 nM para inhibir la producción de glucosa en hepatocitos primarios, incluso en condiciones similares a las condiciones diabéticas. Estos resultados son consistentes con los resultados observados en los hepatocitos primarios de ratón cotratados con 8-CPT diferente/Dex (figura 9A), lo que sugiere además que los Compuestos CDE en combinación imitarán la insulina, pero de una manera independiente de insulina, para inhibir la producción de glucosa.

Adicionalmente, los Compuestos CDE en ambas dosis ensayadas, en combinación con insulina 10 nM o 100 nM no sólo inhibió significativamente la producción de glucosa inducida por 8-CPT/Dex/en hepatocitos primarios de ratón en comparación con grupo de tratamiento 8-CPT /Dex, pero también aparece más efectividad en el proceso que los Compuestos CDE o insulina sola en las dosis probadas (figura 10A). Por ejemplo, el grado de disminución de la producción de glucosa

inducida por 8-CPT/Dex en los hepatocitos después del tratamiento con la combinación de 150 ppb de Compuestos CDE e insulina 10 nM fue más pronunciado de 150 ppb de Compuestos CDE o solo insulina 10 nM. Más evidentemente, la producción de glucosa se redujo aún más en los hepatocitos después del tratamiento de 300 ppb de Compuestos CDE y la insulina 100 nM (una disminución por debajo de los niveles de grupo de células tratados con control), a pesar de que los compuestos del CDE en 300 ppb o 100 nM de insulina solo eran muy eficaces en la inhibición de la producción de glucosa inducida por 8-CPT/Dex (figura 10A). Las combinaciones de insulina 10 nM y Compuestos CDE a 150 ppb o 300 ppb y la combinación de insulina 100 nM y Compuestos CDE a 150 ppb casi completamente inhibida por la producción de glucosa inducida por 8-CPT/Dex (una disminución cerca de los niveles de las células de control sin tratamiento de 8-CPT/Dex). Estos resultados demuestran que los Compuestos CDE pueden reemplazar o mejorar la acción de la insulina para inhibir la producción de glucosa inducida por 8-CPT/Dex en hepatocitos primarios de ratón.

Como se describió anteriormente, se encontró que los Compuestos CDE en combinación puede imitar la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/Dex y mejorar la acción de la insulina en el proceso en células AML-12 (véase figura 4). La inhibición de la expresión de *G6PC* podría dar lugar a una inhibición de la producción de glucosa

en hepatocitos primarios de ratón. Por lo tanto, los hepatocitos de ratón se trataron previamente con agua (control) o 150 o 300 ppb de la combinación de Compuestos CDE en 10% de medio FBS DMEM/F12 durante 24 horas seguido de repetición del tratamiento de estos compuestos de selenio en presencia o ausencia de insulina 10 o 100 nM, 8-CPT 0.1 mM y Dex 0.5 μ M en medio libre de suero durante 6 horas. Después de estos tratamientos, se recolectaron las células y se sometieron a análisis de QRT-PCR de expresión de *G6PC*.

10

Como se muestra en la figura 10B, el 8-CPT/Dex provocó un gran aumento (aumento de aproximadamente 130 veces) en la expresión de mRNA en *G6PC*. Estos datos confirman, adicionalmente, que los hepatocitos estaban funcionando correctamente. El tratamiento con ambas dosis de insulina disminuyó significativamente la expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/Dex en hepatocitos primarios de ratón, en comparación con grupo 8-CPT /Dex (en comparación con el grupo 8-CPT /Dex en el gráfico de barras en la figura 10B). Al igual que en los estudios de glucosa anteriores, el tratamiento de Compuestos CDE en la dosis de 150 ppb mostró una tendencia, aunque no significativa, para inhibir *G6PC* estimulada por 8-CPT/Dex en los hepatocitos (véase figura 10B). Sin embargo, los Compuestos CDE a la dosis de 300 ppb, inhibió significativamente la expresión de ARNm en *G6PC* inducida por 8-CPT/ Dex, pero esto no fue tan potente como las dosis probadas de la insulina (véase figura 10B). Estos

25

resultados demuestran claramente que los Compuestos CDE puede inhibir expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/Dex de una manera independiente de insulina, de forma similar a los resultados obtenidos en células AML-12 (figura 4).

5

El tratamiento de los compuestos de CDE en 300 ppb en combinación con insulina 10 nM o 100 nM inhibió significativamente más expresión de *G6PC* estimulada por 8-CPT/ Dex en los hepatocitos, en comparación con insulina 10 o 100 nM o 300 ppb de tratamiento Los compuestos de CDE. Estos resultados se indican en las figuras. 10B por a' vs b' o a'' vs b'' en el gráfico de barras. Estos resultados indican que la combinación de insulina y Compuestos CDE a 300 ppb era incluso más efectivos en la inhibición de la expresión aumentada de *G6PC* por 8-CPT/Dex.

Los estudios anteriores demuestran que los Compuestos CDE, especialmente a la dosis de 300 ppb, puede imitar la insulina, aunque menos efectivamente que la insulina, para inhibir la expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/Dex y mejorar la acción de insulina en el proceso en los hepatocitos primarios de ratón. Estos resultados coinciden en parte con los resultados observados en células AML-12 (figura 4). Debido a que se requiere *G6PC* para la producción de glucosa, la inhibición observada anteriormente de la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/Dex por los Compuestos CDE (figura 10A) es por lo menos en parte debido a su regulación

por descenso de la expresión de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón (figura 10B).

Los niveles de LDH en los medios cultivados de los hepatocitos tratados anteriores se examinó para investigar adicionalmente si los Compuestos CDE son tóxicos para los hepatocitos primarios cultivados en la presencia de 8-CPT/Dex y si la disminución observada anteriormente de la producción de glucosa y la expresión de *G6PC* por el Compuesto CDE (figura 10A-B) se debe a la toxicidad potencial (como se indica por los niveles elevados de LDH en el medio) de los Compuestos CDE en los hepatocitos.

Como se muestra en la figura 10C, los tratamientos de 8-CPT/Dex ya sea en ausencia o presencia de niveles de LDH ligeramente mejorados en insulina en comparación con el control del vehículo. Sin embargo, no hubo un aumento significativo de los niveles de LDH en los hepatocitos después del tratamiento con 8-CPT/Dex junto con Compuestos CDE en ambas dosis probadas en la ausencia o presencia de insulina (véase figura 10C). Adicionalmente, los niveles ligeramente elevados de LDH en los hepatocitos después del tratamiento con 8-CPT/Dex y la insulina no se observaron por el co-tratamiento con Compuestos CDE en ambas dosis probadas (véase figura 10C).

Estos resultados indican adicionalmente que los

Compuestos CDE no son tóxicos para los hepatocitos primarios cultivados en presencia de 8-CPT/Dex. También, estos resultados excluyen la posibilidad de que la disminución observada anteriormente de la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/ Dex y la expresión de *G6PC* (véase figuras 10A y 10B) es provocada por los hepatocitos menos saludables en hepatocitos primarios de ratón después del tratamiento de Compuestos CDE.

10 En resumen, los estudios anteriores demuestran que los Compuestos CDE puede imitar la insulina para inhibir la producción de glucosa y la expresión de *G6PC* y mejorar la acción de insulina en estos procesos sin toxicidad en hepatocitos primarios de ratón, incluso bajo condiciones
15 similares a las condiciones diabéticas (estimuladas por 8-CPT/Dex).

La inhibición de la producción de glucosa por Compuestos CDE (descrito anteriormente) se caracterizó en hepatocitos primarios de ratón tratados previamente con los compuestos de la presente descripción en medios que contienen suero. Para confirmar adicionalmente que los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para inhibir la producción de glucosa en un manera independiente de insulina e independientemente de otro
20 factor de crecimiento, se adoptaron condiciones de cultivo totalmente libres de suero para eliminar cualquier rastro potencial de insulina u otros factores de crecimiento en FBS.
25

Se examinaron los efectos de los Compuestos CDE en la producción de glucosa, así como su potencial efecto tóxico (es decir, el nivel de LDH en medio de cultivo) en hepatocitos primarios de ratón cultivados en condiciones
5 libres de suero.

En resumen, los hepatocitos primarios de ratón se privaron de suero durante la noche. Las células luego se trataron con control (agua), o 150 ppb o 300 ppb de
10 Compuestos CDE en presencia o ausencia de insulina, 8-CPT, y Dex en medios totalmente libre de suero durante un período de tiempo corto (es decir, 6 horas). Luego se recolectaron y se sometieron los medios a glucosa y análisis de LDH y células cultivadas para análisis de proteínas para la normalización
15 de producción de glucosa y nivel de LDH. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM de 3 muestras. En la figura 11A, el # $P < 0.05$ vs grupo de control basal (la primera barra en la gráfica) y el * $P < 0.05$ vs el grupo de tratamiento de 8-CPT/Dex (la primera barra llena en el gráfica.

20

Se investigaron los efectos de los Compuestos CDE sobre la producción de glucosa en hepatocitos co-tratamientos de 8-CPT/Dex (véase figuras 11A-11B). Como se muestra en la figura 11A, los tratamientos de ambas dosis de insulina sola inhiben
25 significativamente la producción de glucosa por aproximadamente 40-47% de disminución en los hepatocitos primarios de ratón. Estos resultados indican que esta tanda

de hepatocitos primarios de ratón son biológicamente funcionales.

Más importante aún, los tratamientos con Compuestos CDE a 150 ppb provocaron una disminución significativa de la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón tan eficazmente como insulina 100 nM, mientras que los Compuestos CDE a 300 ppb eran incluso más efectivos que insulina 100 nM en la inhibición de la producción de glucosa (véase la figura 11A). Los co-tratamientos con ambos Compuestos CDE e insulina también inhibieron significativamente la producción de glucosa, a pesar de que no había ningún aditivo o acción sinérgica entre la insulina y los Compuestos CDE en estos hepatocitos primarios. Estos resultados fueron consistentes con los resultados obtenidos a partir de los hepatocitos tratados previamente con Compuestos CDE en medio que contiene FBS (véase figura 9A). En conjunto, estos resultados demuestran claramente que los Compuestos CDE puede imitar la insulina, tan efectivamente como o incluso más efectivamente que la insulina en la concentración de 100 nM, para inhibir la producción de glucosa de una manera independiente de insulina y factor de crecimiento. También se puede concluir que los Compuestos CDE son efectivos en la inhibición de la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón después de un tiempo relativamente corto de tratamiento (es decir, 6 horas), similar a insulina.

Los Compuestos CDE también se ensayaron para ver si se inhibe la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/Dex en hepatocitos de ratón bajo condiciones de cultivo libre de suero. Como se muestra en la figura 11A, el tratamiento con 8-CPT/Dex provocó un aumento significativo en la producción de glucosa en comparación con un grupo de control basal (vehículo tratado), lo que indica adicionalmente que esta tanda de hepatocitos primarios de ratón están funcionando biológicamente. El tratamiento con insulina 10 nM inhibió significativamente la producción de glucosa, a pesar de que sólo había una tendencia de disminución de la producción de glucosa en los hepatocitos después de ser tratados con insulina 100 nM. Este último resultado se podría deber a un pequeño número de muestras analizadas ($n = 3$) en las que la producción de glucosa en una muestra era bastante grande en comparación con otras dos muestras en el mismo grupo (datos no mostrados).

Más importante aún, el tratamiento de Compuestos CDE a 150 ppb mostró una tendencia para inhibir la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/ Dex, mientras que los Compuestos CDE a la concentración de 300 ppb fue tan efectiva como la insulina a 10 nM para inhibir significativamente la producción de glucosa estimulada con 8-CPT/Dex en una forma independiente de insulina o independiente de otro factor de crecimiento (figura 11A). Cabe señalar que los Compuestos CDE a la concentración de 300 ppb abolió casi por completo los

efectos estimulantes de 8-CPT/Dex, como el nivel de glucosa en este grupo de tratamiento fue comparable a grupo de control basal sin estimulación 8-CPT/Dex.

5 Del mismo modo, los cotratamientos de ambos Compuestos CDE e insulina también inhibieron significativamente la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/Dex (véase figura 11A). Adicionalmente, hubo una disminución más pronunciada de la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/Dex por la
10 combinación de 150 ppb Compuestos CDE y insulina 100 nM, 150 ppb de Compuesto CDE o solo insulina 100 nM. Estos resultados indican que existe una acción aditiva entre los Compuestos CDE y la insulina en el proceso (figura 11A).

15 Los efectos de los compuestos CDE para inhibir la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/ Dex en cultivos libres de suero de hepatocitos primarios de ratón son consistentes con los hallazgos observados en los hepatocitos tratados previamente con Compuestos CDE en medios que
20 contienen suero (figura 10A). Debido a que los hepatocitos se privaron de suero y se trataron con Compuestos CDE en estado totalmente libre de suero, estos datos demuestran claramente que los Compuestos CDE puede imitar la insulina, por lo menos tan eficaz como insulina 10 nM, para inhibir la producción de
25 glucosa estimulada por 8-CPT/Dex de una manera independiente de la insulina e independiente del factor de crecimiento. También se puede concluir que los compuestos descritos aquí

actúan rápidamente, después de un tiempo de tratamiento relativamente muy corto, para inhibir la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/ Dex en estos hepatocitos primarios de ratón en cultivos libres de suero, similar a la acción de la insulina. También existe una acción aditivo o sinérgico entre Compuestos CDE e insulina, por lo menos entre 150 ppb de Compuestos CDE y dosis de insulina 100 nM, sobre la inhibición de la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/ Dex en estos hepatocitos primarios de ratón en cultivos libres de suero (véase figura 11A).

Finalmente, se probaron los Compuestos CDE para determinar cualquier toxicidad para los hepatocitos primarios de ratón que se cultivaron en condiciones sin suero. Los niveles de LDH en los medios de cultivo en hepatocitos primarios de ratón después de que examinaron los tratamientos anteriores y luego se normalizaron por sus niveles de proteína. Como se muestra en la figura 11B, no hubo un aumento significativo de los niveles de LDH en los hepatocitos después de todos los tratamientos anteriores en comparación con grupo de control basal que contiene un vehículo tratado con grupo de agua (es decir, la primera barra en la figura 11B). Estos resultados indicaron que no había daño celular o fuga de la membrana celular en los hepatocitos después de exposición al Compuesto CDE. En su lugar, se observó una disminución significativa del nivel de LDH en los hepatocitos después de ser tratados con una dosis

alta de 300 ppb de Compuestos CDE (véase figura 11B). Por lo tanto, los resultados sugieren que los Compuestos CDE no son tóxicos para los hepatocitos primarios y, en cambio, a una dosis mayor, pueden tener algún efecto protector contra la fuga de la membrana celular en estas células. Adicionalmente, estos resultados excluyen la posibilidad de que la inhibición observada anteriormente de producción de glucosa estimulada basal y por 8-CPT/Dex (véase figura 11A) es provocada por los hepatocitos menos saludables en hepatocitos primarios de ratón después del tratamiento con Compuestos CDE.

En conclusión, los estudios anteriores en de hepatocitos primarios de ratón en cultivos libres de suero demuestran que los Compuestos CDE puede imitar la insulina para inhibir tanto la producción de glucosa basal como estimulada por 8-CPT/Dex en una forma independiente de FBS, más específicamente independiente de insulina y del factor de crecimiento. También, estos resultados sugieren adicionalmente que los Compuestos CDE no tienen toxicidad en las células del hígado.

Compuestos CDE: activación independiente de insulina de señalización de PI3K/PDK1/Akt para mejorar la fosforilación Foxo1/3/4 en hepatocitos primarios de ratón

Nuestros estudios anteriores sobre células AML-12 sugieren que los Compuestos CDE puede imitar la insulina para

mejorar la fosforilación Foxo3 y Foxo4, lo que resulta en la inhibición de la expresión de *G6PC* para la producción de glucosa (figura 6A-6C, 7A-7C). Está bien documentado que la insulina actúa rápidamente en las células del hígado para

5 activar señalización PI3K/PDK1/AKT para inactivar factores de transcripción de Foxo1, Foxo3, y Foxo4 que reduce muy rápidamente la producción de glucosa.

Para investigar adicionalmente si los Compuestos CDE

10 imitarán la insulina pero actúan de una manera independiente de insulina para activar señalización de PDK1/Akt para mejorar posteriormente la fosforilación FOXO para la inhibición de la producción de glucosa, el estado de fosforilación de estas moléculas de señalización, clave para

15 la gluconeogénesis, fue investigada en hepatocitos primarios de ratón bajo dos condiciones de cultivo/tratamiento diferentes.

Fosforilación de Foxo1/3/4 objetivo a Compuestos CDE en

20 **hepatocitos primarios de ratón tratados previamente con Compuestos CDE en medios que contienen suero durante 24 horas, seguido por medio libre de suero durante 6 horas**

Para determinar si la combinación de Compuestos CDE puede imitar la insulina para regular la señalización

25 PI3K/PDK1/Akt/Foxo1/3/4, los hepatocitos primarios de ratón se trataron previamente con control (agua) o Compuestos CDE de selenio a dosis de 150 y 300 ppb en medio DMEM/F12 que

contiene suero durante 24 horas. Este tratamiento fue seguido por re-tratamientos con estos compuestos de selenio en medio libre de suero durante 6 horas. Los hepatocitos de control pretratados también se incubaron con insulina 100 nM durante 5 6 horas. Después de estos tratamientos, se recolectaron los medios de cultivo para el análisis de glucosa y LDH como se detalla en las figuras 9A-9C. Las células se recolectaron y se sometieron a análisis de proteínas para determinar los niveles de proteína total para el análisis de transferencia 10 de Western de varias moléculas de señalización PI3K/PDK1/Akt/Foxo1/3/4. Los niveles de expresión de proteínas de estas moléculas de señalización se normalizaron por los niveles de proteína por ACTB y se presentan como la media $\pm$ EEM de tres muestras en la figura 12B-F. Letras 15 diferentes en los gráficos de barras de la figura 12B-F significan una diferencia significativa entre los dos grupos ($P < 0.05$).

Como se muestra en la Figura 12A, el tratamiento con 20 insulina provocó un aumento significativo de las formas fosforiladas de PDK1, Akt en el residuo serina 473, Foxo1 en treonina 24 (pFoxo1T24), Foxo3 en treonina 32 (pFoxo3T32), pero no GSK3b en serina 9 (pGsk3bS9) mientras que los niveles de Foxo4 fosforilada en treonina 28 (pFoxo4T28) en estas 25 células después del tratamiento con insulina eran apenas detectables. Estos resultados sugieren que la insulina de hecho puede regular señalización PI3K/PDK1/Akt para inactivar

Foxo1 y Foxo3 en estos hepatocitos bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas. Más importante aún, los niveles de proteína de pPdk1, pAktS473, pFoxo1T24 y pFoxo3T32, pero no pGsk3bS9 fueron elevados visiblemente en estos hepatocitos después de los tratamientos de las dos dosis de Compuestos CDE (figura 12A). Adicionalmente, los niveles de pFoxo4T28 también se han incrementado considerablemente en los hepatocitos después de que el tratamiento de los compuestos CDE en 300 ppb (figura 12A).

10

El análisis cuantitativo mostró que había un aumento de aproximadamente 1.5 veces de pPdk1, aumento de 2.2-3 veces de pAktS473, aumento de 3-4 veces de pFoxo1T24 acerca de un aumento de 3 veces de pFoxo3T32, pero ningún aumento de pGsk3bS9 en Compuestos CDE tratados con hepatocitos primarios de ratón (figuras 12B-F). El aumento de expresión de pFoxo3T32 y pFoxo4T28 por Compuestos CDE en hepatocitos primarios de ratón era coherente con nuestra observación anterior en la células AML-12 (figuras 6A-6C, 7A-7C), a pesar de que no se observaron pPdk1 y pAkt mejorados en células AML-12 a 6 horas de tratamiento de Compuestos CDE (figuras 6A-6C, 7A-7C).

20

Los niveles de proteína pPdk1 y pAktS473 en estos hepatocitos provocados por insulina y compuestos del CDE en ambas dosis probadas indican que los Compuestos CDE, como la insulina, pueden activar la señalización PDK1/Akt. Aunque el

25

grado de aumento de la fosforilación de pAkt/Foxo1/3 por los Compuestos CDE no era tan fuerte como insulina 100 nM, los Compuestos CDE en ambas dosis probadas eran tan efectivas como insulina 100 nM para inhibir la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón bajo las mismas condiciones experimentales (figura 9A). Así, parece que un aumento de 3-4 veces aproximado de pFoxo1T24 y pFoxo3T32 por Compuestos CDE (figuras 12D-E) fue suficiente para inactivar Foxo1 y FOXO3, lo que lleva a la inhibición de la expresión de *G6PC* y producción de glucosa en estos hepatocitos primarios de ratón. Nuestros resultados demuestran claramente que los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para activar señalización PI3K/Pdk1/Akt para mejorar fosforilación Foxo1/3/4 en los hepatocitos primarios de ratón bajo las condiciones de cultivo y tratamiento descritas anteriormente.

Compuestos CDE actúan rápidamente para activar secuencialmente señalización de PDK1/Akt para mejorar fosforilación Foxo1/3 en hepatocitos primarios en condiciones libres de suero

Para investigar adicionalmente si los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para activar la señalización de PI3K para mejorar fosforilación Foxo1/3, se realizaron estudios de expresión del curso del tiempo de estas moléculas de señalización en hepatocitos primarios de ratón bajo condiciones libres de suero. En resumen, los hepatocitos primarios de ratón fueron se privaron de suero durante la

noche y después se incubaron con compuestos CDE de selenio a la dosis de 300 ppb en medio DMEM /F12 sin suero durante 0 minuto, 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 3 horas. Después de los tratamientos, se recolectaron los hepatocitos y se sometieron a análisis de transferencia Western.

Como se muestra en las figuras 13A-B, los niveles de PDK1 fosforilados tienden a ser aumentados en estos hepatocitos de cultivo libre de suero a los 5 minutos después de que el tratamiento con Compuestos CDE. Después de 30 minutos de tratamiento de Compuestos CDE, hubo un aumento robusto y significativa de los niveles pPdk1 en estos hepatocitos (figuras 13A-B). Estos resultados sugieren que los Compuestos CDE pueden activar rápidamente la señalización de PI3K/PDK1 en estos hepatocitos. Después de activación de PDK1, hubo una tendencia hacia el aumento de los niveles de pAktT308 en los hepatocitos a los 30 minutos de tratamiento Los Compuestos CDE y, más importante, un aumento robusto y significativo de pAktT308 después de 1 hora de tratamiento de Compuestos CDE (figuras 13A, C). Estos resultados sugieren que los Compuestos CDE posteriormente pueden activar Akt.

Los niveles tanto de pFoxo1T24 como pFoxo3T32, los objetivos en dirección 3' de señalización de PI3K/PDK1/Akt activada, no se vieron afectados en los hepatocitos por los Compuestos CDE antes de 30 minutos de incubación (figura 13A, D). En el tratamiento 1 hora con Compuestos CDE, hubo una

tendencia hacia el aumento de fosforilación de Foxo1 y Foxo3 en los hepatocitos (figura 13D). A las 2 y 3 horas de tratamiento, los Compuestos CDE mejoran de forma significativa la fosforilación de ambos Foxo1 y Foxo3 en
5 estos hepatocitos primarios de ratón cultivados en las condiciones libres de suero (figura 13A, D). Por lo tanto, existe una activación secuencial de PDK1 y Akt seguida por un aumento de fosforilación Foxo1 y Foxo3 por los Compuestos CDE en estos hepatocitos, y estos eventos se producen menos de
10 dos horas después del tratamiento con Compuestos CDE de una manera muy similar a la acción de insulina. Teniendo en cuenta que no existen factores de insulina o crecimiento en el medio DMEM/F12 normal, y no se agregó FBS en el medio de cultivo en estos experimentos, el aumento de la fosforilación
15 de PDK1, Akt, Foxo1 y Foxo3 por los Compuestos CDE en estos hepatocitos es independiente de FBS, factores de crecimiento o insulina. En otras palabras, los Compuestos CDE puede pasar por alto la insulina o acción de factores de crecimiento para activar rápidamente la señalización de PI3K/PDK1/Akt y
20 posteriormente inactivar Foxo1 y FOXO3 (fosforilación Foxo1/3 mejorada) en los hepatocitos primarios de ratón.

Resumen

Nuestros estudios demuestran que los Compuestos CDE
25 puede imitar la insulina para inhibir la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón de una manera independiente de insulina, sin ser tóxicos para las células

de hígado. Estos hallazgos se establecieron claramente a partir de los estudios en hepatocitos primarios de ratón que fueron cultivados bajo tres condiciones diferentes. En primer lugar, se encontró que la producción de glucosa fue notablemente disminuida por el pretratamiento con Compuestos CDE en medios que contienen suero durante 24 horas, seguido de repetición del tratamiento de estos compuestos en medio libre de suero durante 6 horas, con efectividad comparable a la dosis a la insulina de 100 nM (figura 9A). A continuación, también se encontró que la producción de glucosa se inhibe significativamente en hepatocitos primarios de ratón por el pretratamiento con Compuestos CDE en medios que contienen suero durante 24 horas, seguido de repetición del tratamiento de estos compuestos en medio libre de suero en presencia de 8-CPT/Dex (los estímulos de la producción de glucosa para imitar las condiciones de la diabetes) durante 6 horas, y que la eficacia de 300 ppb de Compuestos CDE en el proceso fue comparable con la insulina a una concentración de 100 nM (figura 10A). Por último, hemos adoptado la técnica de cultivo libre de suero y demostrado que los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para inhibir la producción de glucosa tanto basal como estimulada por 8-CPT/Dex en una forma independiente de FBS o, más específicamente, independiente de insulina y factor de crecimiento después de un corto tiempo de tratamiento (tratamiento de 6 hora) (figura 11A). También, la efectividad de los Compuestos CDE en la inhibición de la producción de glucosa era comparable

con la insulina, por lo menos, en la dosis de 10 nM (figura 11A). Adicionalmente, el tratamiento con Compuestos CDE no tenía un efecto tóxico (tal como que provoca fugas de membrana celular) en la salud de hepatocitos primarios de ratón cultivados bajo las tres condiciones descritas anteriormente diferentes, ya que no hubo un aumento significativo de LDH en el medio de cultivo después de tratamiento con Compuestos CDE (figuras 9C, 10C, 11B).

La producción de glucosa reducida observada en estos estudios por lo menos en parte se atribuye a la inhibición de la expresión de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón por Compuestos CDE. Se encontró que los Compuestos CDE a 300 ppb provocaron una disminución significativa (42% de disminución) de los niveles de ARNm en *G6PC* en los hepatocitos, mientras que una tendencia a la disminución de la expresión de *G6PC* (alrededor de 31% de disminución, aunque no estadísticamente significativa) también se observó en los hepatocitos después del tratamiento con 150 ppb de Compuestos CDE (figura 9B). Se obtuvieron resultados similares también en hepatocitos primarios de ratón estimulados por 8-CPT/Dex (figura 10B). Por lo tanto, estos resultados demuestran claramente que los Compuestos CDE pueden imitar la insulina para inhibir la expresión de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón, incluso en presencia de 8-CPT/Dex de una manera independiente de insulina. Estos resultados son consistentes con los hallazgos observados en células AML-12 (figuras 3-4).

Se debe tener en cuenta que el grado de reducción de la expresión de *G6PC* por Compuestos CDE a la dosis probada más alta era más pequeño que la insulina (10 nM) en hepatocitos primarios de ratón bajo las dos condiciones de cultivo anteriormente descritas (es decir, con o sin el cotratamiento de 8-CPT/Dex), mientras que los Compuestos CDE eran tan eficaces como insulina, por lo menos, a la dosis de 10 nM para inhibir la producción de glucosa basal y estimulada por Dex/8-CPT en los hepatocitos (figuras 9A, 10A, 11B). Así, es posible que además de *G6PC*, los Compuestos CDE pueden regular otras moléculas para reducir los niveles de glucosa en hepatocitos de ratón en cultivo. Independientemente, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la producción de glucosa en hepatocitos primarios de ratón por Compuestos CDE es por lo menos en parte debido a su inhibición de la expresión de *G6PC*.

Adicionalmente, los resultados también demuestran que los Compuestos CDE pueden mejorar o aumentar la acción de la insulina para inhibir la producción de glucosa y la expresión de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón bajo condiciones diabéticas simuladas (utilizando 8-CPT/Dex) (figuras 10A-B, 11A). Estos fueron apoyados por las siguientes observaciones:

25

(1) una disminución más pronunciada de la producción de glucosa inducida por 8-CPT/Dex en los hepatocitos por la

combinación de 150 ppb Compuestos CDE y insulina 10 nM que con 150 ppb Compuestos CDE o insulina 10 nM sola (figura 10A.);

5 (2) una disminución adicional de la producción de glucosa inducida por 8-CPT/Dex en los hepatocitos por la combinación de 300 ppb de Compuestos CDE y solo 100 nM de insulina con 300 ppb de Compuestos CDE o 100 nM de insulina (figura 10A.);

10

 (3) una disminución más pronunciada de la producción de glucosa estimulada por 8-CPT/Dex por la combinación de 150 ppb de Compuestos CDE y 100 nM de insulina de 150 ppb de Compuestos CDE o 100 nM de insulina sola en hepatocitos en
15 condición libre de suero (figura 11A); y

 (4) una disminución más pronunciada de expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/Dex por la combinación de 300 ppb de Compuestos CDE y la insulina (10 y 100 nM) con solo 300 ppb
20 de Compuestos CDE, insulina 10 o 100 nM (figura 10B).

 Una inhibición más pronunciada de expresión de *G6PC* inducida por 8-CPT/Dex por la combinación de Compuestos CDE y la insulina que los Compuestos CDE o solo insulina también se
25 observó en células AML-12 (figura 4). En conjunto, nuestros resultados demuestran que los Compuestos CDE pueden mejorar la acción de insulina para inhibir la producción de glucosa

inducida 8-CPT/Dex y expresión de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón.

Adicionalmente, los análisis de moléculas de
5 señalización demuestran que los Compuestos CDE puede imitar la insulina para activar rápidamente PI3K/PDK1/Akt de señalización para mejorar la fosforilación de Foxo1, 3 y 4 en hepatocitos primarios de ratón. El análisis de transferencia Western de las proteínas fosforiladas de estas moléculas en
10 hepatocitos de ratón o bien pretratados con Compuestos CDE en medios que contienen suero durante 24 horas seguido de repetición de tratamiento de estos compuestos en medio libre de suero durante 6 horas (figura 12A-12F), o tratado con estos compuestos en estado totalmente libre de suero durante
15 un breve periodo de tiempo de 5 a 180 minutos (figuras 13A-13D) apoyan esta conclusión.

En las células AML-12, también se encontró que los Compuestos CDE puede objetivar Foxo3/4 para mejorar su
20 fosforilación, a pesar de que la fosforilación de PDK1 y Akt no se observaron en células AML-12 en el periodo de tiempo probado (6 horas después del tratamiento de Compuestos CDE) (figuras 6A-6C, 7A-7C). Este último resultado se podría deber al potencial de activación transitoria de PDK1/Akt mediante
25 Compuestos CDE que puede ocurrir en un punto de tiempo anterior (antes de 6 horas).

Independientemente, los estudios en hepatocitos primarios de ratón demuestran claramente que los Compuestos CDE pueden pasar por alto la insulina o cualesquier factores de crecimiento para activar rápidamente la señalización de PI3K/PDK1/Akt y posteriormente mejorar fosforilación de Foxo1/3/4. Dado que las proteínas FOXO, especialmente Foxo1, en el hígado son importantes para la regulación de la expresión de *G6PC* y la producción de glucosa, la producción de glucosa inhibe y expresión de *G6PC* observada anteriormente en hepatocitos primarios de ratón por Compuestos CDE es muy probablemente provocada por la inactivación de Foxo1/3/4 resultante de la activación independiente de la insulina de señalización de PDK1/Akt y posteriormente fosforilación Foxo1/3/4 mejorada. También la mejora de la acción de insulina en el proceso anterior es también probable debido a efectos aditivos de fosforilación Foxo1/3/4 mejorada por Compuestos CDE e insulina.

En resumen, hemos descubierto una combinación de compuestos de selenio que puede pasar por alto la acción de insulina para inhibir la producción de glucosa y expresión de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón, incluso en presencia de estímulos para la producción de glucosa para diabéticos y sin ser tóxicos para las células del hígado. También, esta combinación de compuestos, los Compuestos CDE, puede mejorar la acción de la insulina para inhibir adicionalmente la producción de glucosa inducida por estímulos para diabéticos

y expresión de *G6PC* en hepatocitos primarios de ratón. Adicionalmente, esta combinación de compuestos también pueden imitar pero pasar la insulina para activar rápidamente la señalización de PI3K/PDK1/Akt, y posteriormente, aumentar la fosforilación Foxo1/3/4 en los hepatocitos. Por lo tanto, esta combinación de compuestos se puede utilizar no sólo como un medicamento de reemplazo insulina potente, sino también como una medicina que potencia la insulina para los tratamientos de diabéticos Tipo I y II. Los Compuestos CDE en combinación puede ser útil en el tratamiento de la obesidad sin pasar por la insulina para reducir la producción de glucosa hepática a través de inactivación independiente de insulina de Foxo1/3/4, inhibición de expresión de *G6PC* mediada por Foxo y/o mejora de la acción de insulina en estos procesos en el hígado o administrada para evitar que las células del hígado se conviertan en resistentes a insulina.

Ejemplo 7: Reducción de niveles de glucosa en la corriente sanguínea y la mejora de tolerancia a la glucosa en respuesta al tratamiento combinado con Compuestos CDE en ratones mutantes nulos espontáneos del receptor de leptina diabética resistentes a insulina (*Lepr*)

Materiales y métodos

25 Compuestos

El Compuesto C (5'-Metilselenoadenosina), Compuesto D (Se-Adenosil-L-homocisteína) y Compuesto E (Gama-glutamyl-

metilseleno-cisteína), se sintetizaron en el Laboratorio Clínico de Alltech, Inc. Las purezas de todos los compuestos probados se verifican que son $\geq 99\%$, según se determina mediante Espectrometría de Masas.

5

Animales y tratamientos

La mutación espontánea diabética heterocigota para ratones adultos (mutación del receptor de leptina) *Lepr^{db/+}* (cepa C57BL /6J) fueron adquiridos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) y luego se entrecruzan para generar ratones homocigóticos *Lepr^{db/db}* (determinado por genotipo del ratón). Se llevó a cabo el genotipado de ratón de la cola en el momento del destete (en el día postnatal 21), de acuerdo con el protocolo de The Jackson Laboratory. Estos ratones *Lepr^{db/db}* en el día postnatal 27 se inyectaron por vía intraperitoneal con solución salina fisiológica (NaCl 0.09%) o Compuestos CDE. Los Compuestos CDE comprenden el Compuesto C, Compuesto D y Compuesto E en combinación (5 μ g de selenio de cada compuesto por kilogramo de peso corporal equivalente a 5 ppb de cada compuesto de selenio por inyección) cada dos días hasta la edad de 3.5 meses, y después se somete a análisis de glucosa y ensayos de tolerancia a la glucosa. Los pesos corporales de los ratones tratados se encuentran registrados utilizando una balanza todas las semanas, y fueron controlados diariamente cualquier morfología de animales brutos anormales y se monitorizó el comportamiento de caminado.

Los ratones *Lepr^{db/db}* de 5 semanas de edad macho, fueron adquiridos de Jackson Laboratory y por vía intraperitoneal inyectados diariamente con solución salina fisiológica (NaCl 0.09%) o Compuestos CDE. Los Compuestos CDE comprenden el compuesto C, el Compuesto D y el Compuesto E en combinación (5 µg de selenio de cada compuesto por kilogramo de peso corporal, diluido en la solución salina fisiológica estéril) a partir del día postnatal 38 durante 28 días. Este experimento fue diseñado para probar el uso potencial de estos compuestos como un tratamiento para la diabetes aguda (ratones *Lepr^{db/db}* de > 35 días de edad tienen o desarrollarán hiperglucemia). La prueba de los ratones más jóvenes que habían sido inyectados durante un período más largo se intentó evaluar los compuestos más como una preparación preventiva para los sujetos prediabéticos o en situación de riesgo. También los pesos corporales de los ratones tratados anteriormente se registraron utilizando un equilibrio cada semana y se monitorizaron diariamente cualquier morfología anormal bruta en animales visible y el comportamiento de caminado.

Ensayo de glucosa de la sangre

Después de la última inyección de solución salina fisiológica o Compuestos CDE, los ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche. A continuación, una pequeña gota de sangre de estos ratones se recogió al cortar la punta de cola

del ratón y los niveles de glucosa en sangre se determinaron utilizando un Glucómetro con una capacidad máxima para la medición de glucosa de 600 mg/dL.

5 **Prueba de tolerancia a la glucosa y cuantificación de área bajo la curva (AUC)**

Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa como se describió previamente (Li et al, Int J Biol Sci 2008; 4: 29-36). Brevemente, ratones *Lepr^{db/db}* en ayunas durante noche
10 después de tratamiento con solución salina o Los Compuestos CDE se inyectaron por vía intraperitoneal con 2 gramos/kg de peso corporal de 20% de D-glucosa. Los niveles de glucosa en sangre en el momento 0 (inmediatamente antes de inyección de glucosa), 0.25, 0.5, 1 y 2 horas después de la inyección de
15 glucosa se determinaron utilizando un glucómetro con una capacidad máxima de medición de glucosa de 600 mg/dL. Debido a esto, se contaron niveles de glucosa en la sangre por encima de 600 mg/dl como 600 mg/dl en nuestro análisis de datos. La cuantificación del área bajo la curva (AUC) de cada
20 ratón en el ensayo de prueba de glucosa anterior se calcula al utilizar Microsoft Excel.

Análisis estadístico

En su caso, se utilizó una *prueba t de Student* para
25 determinar la significación estadística de la diferencia entre los grupos tratados con solución salina y Compuestos CDE compuestos con un valor *P* inferior menor de 0.05. Los

datos se presentan como media $\pm$ EEM de los números indicados de ratones en las figuras.

Resultados y discusión

5 Los ratones *Lepr^{db/db}* carecen de todas las isoformas conocidas del gen receptor de leptina (*Lepr*). Este modelo de ratón homocigoto es un modelo de ratón diabético tipo II agresivo con intolerancia a la glucosa, reducción de sensibilidad a la insulina, hiperglucemia e hiperinsulinemia.

10 Estos ratones muestran la obesidad bruta a alrededor de 3 a 4 semanas de edad, la elevación de la insulina en plasma a partir de 10 a 14 días y la hiperglucemia (es decir, niveles de azúcar en la sangre) en edad de 4 a ocho 8 (Coleman DL 1978 Diabetologia 14: 141. -8).

15

Los estudios sobre células AML-12 y hepatocitos de ratón primarios descritos aquí indican que los Compuestos CDE pueden imitar a la insulina, pero pasar insulina para inactivar Foxo1, Foxo3, y Foxo4 en células de hígado.

20 Adicionalmente, los Compuestos CDE puede inhibir la expresión de *G6PC* mediada por Foxo a producción de glucosa más baja sin ser tóxico para estas células del hígado (figuras 1, 2A-2B, 3, 4, 6A-6C, 7A-7C, 9A-9C, 10A-10C, 11A-11B, 12A-12F, 13A-13D, 14A-14B, 15A-15B). También, estos estudios in vitro

25 muestran que los Compuestos CDE puede mejorar la acción de insulina para disminuir la producción de glucosa y la expresión de *G6PC* en las células de hígado en condiciones

simuladas diabéticas (figuras 4, 10A-10C, 11A-11B). Por lo tanto, el modelo de ratón *Lepr^{db/db}* es un modelo ideal para investigar el uso de esta nueva combinación de compuesto en que reduce potencialmente la glucosa en la corriente
 5 sanguínea y la mejora de sensibilidad a insulina y la tolerancia de la glucosa contra la diabetes.

**Reducción de los niveles de glucosa en sangre en ratones *Lepr^{db/db}* después de la administración de Compuestos CDE tanto
 10 antes Y después de la aparición de hiperglucemia**

Se adoptaron dos regímenes de administración de Compuestos CDE para investigar el papel potencial de los Compuestos CDE en la prevención y tratamiento de la hiperglucemia como se muestra en ratones *Lepr^{db/db}*. Los
 15 compuestos descritos aquí fueron investigados para determinar si tenían algún efecto en la prevención del desarrollo de la hiperglucemia, que se desarrolla a la edad de 4 a 8 semanas en ratones *Lepr^{db/db}*. Los ratones se administraron con tratamientos por inyección intraperitoneal de los Compuestos
 20 CDE justo antes de la aparición de hiperglucemia.

En breve, se inyectaron ratones *Lepr^{db/db}* juveniles con edad de 27 días por vía intraperitoneal con los Compuestos CDE (5 µg de selenio de cada compuesto por kilogramo de peso
 25 corporal, equivalente a 5 ppb de cada compuesto por inyección en cada ratón) o solución salina fisiológica cada dos días hasta que los ratones alcanzan la edad de 3.5 meses. Al final

del tratamiento, los ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche y se sometieron a análisis de glucosa. Los pesos corporales de estos ratones tratados se registraron utilizando una balanza cada dos días para probar si hay algún efecto de estos compuestos sobre la ganancia de peso corporal durante el período de tiempo de tratamiento. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM del número indicado de ratones bajo los gráficos de barras en la figura 14A.

Se encontró que el tratamiento con Compuestos CDE no afectó las ganancias de peso corporal en estos ratones mutantes (datos no presentados), lo que indica que los Compuestos CDE probablemente tienen poco o nada de efectos inhibidores sobre el aumento anormal del apetito para el consumo de los alimentos que se muestra en ratones *Lepr^{db/db}*. Adicionalmente, no había ninguna diferencia visible en la morfología de los animales en bruto y el comportamiento de caminado entre ratones *Lepr^{db}* tratados con solución salina (control) y tratados con compuestos CDE durante el período de tratamiento (datos no mostrados). Estos resultados indican que los compuestos CDE en las dosis ensayadas no tuvieron efectos sobre el comportamiento o actividad animal.

Sin embargo, el tratamiento con Compuestos CDE provocó una disminución significativa, una reducción de aproximadamente 40% en comparación con los controles, los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo de ratones

Lepr^{db/db} (véase figura 14A) a pesar de que los niveles de glucosa en sangre en los ratones *Lepr^{db/db}* tratados con Compuestos CDE eran todavía más altos que los ratones de tipo salvaje normales a edad equivalente (alrededor de 100 mg/dL, 5 datos no presentados). Aunque los Compuestos CDE a la dosis probada no evitó completamente el desarrollo de la hiperglucemia en ratones *Lepr^{db/db}*, estos resultados demuestran claramente que los Compuestos CDE pueden reducir significativamente los niveles de glucosa en el torrente 10 sanguíneo en este modelo de ratón con diabetes de tipo II grave, lo que indica el potencial de los Compuestos CDE para la prevención de la hiperglucemia.

Para investigar adicionalmente la función de los 15 Compuestos CDE en la reducción de la producción de glucosa en estos ratones diabéticos *Lepr^{db/db}*, otro régimen de administración, en el que los Compuestos CDE se inyectaron por vía intraperitoneal después o durante la aparición de hiperglucemia en ratones *Lepr^{db/db}*, fue adoptado para examinar 20 la sangre los niveles de glucosa en estos ratones. En breve, los ratones *Lepr^{db/db}* macho con edad de 38 días se inyectaron por vía intraperitoneal con solución salina o Compuestos CDE (5 µg de selenio de cada compuesto por kilogramo de peso corporal) a diario durante 28 días. El peso corporal de ratón 25 y se registraron cualquier morfología o comportamiento de caminado o se monitorizaron diariamente.

Después de los tratamientos anteriores, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche y después se sometieron a análisis de glucosa en sangre. Al igual que en los estudios de animales anteriores, el tratamiento de los

5 Compuestos CDE no afectó la ganancia de peso corporal, morfología de animal en bruto y comportamiento de caminado en ratones *Lepr^{db/db}* durante el período de tiempo de tratamiento (datos no mostrados). Sin embargo, el tratamiento con

10 Compuestos CDE provocó una disminución significativa (reducción de 25%) de los niveles de glucosa en sangre en estos ratones *Lepr^{db/db}* en comparación con ratones tratados con solución salina (véase figura 14B). Estos estudios demuestran además que los Compuestos CDE pueden disminuir la producción de glucosa en estos ratones con diabetes tipo II severa, lo

15 que indica el potencial de estos compuestos para el tratamiento de hiperglucemia.

En resumen, estos resultados demuestran que los Compuestos CDE puede disminuir la producción de glucosa en

20 ratones *Lepr^{db/db}* por inyección intraperitoneal de estos compuestos antes y después de o durante la aparición de hiperglucemia en estos animales mutantes.

Adicionalmente, no hubo cambios de comportamiento

25 morfológico o de caminado visibles en ratones *Lepr^{db/db}* después de tratamientos de estos compuestos bajo los regímenes de inyección descritos anteriormente. De hecho, se examinaron

los efectos agudos de Compuestos CDE en la salud animal en ratones C57BL/6 normales de tipo silvestre, pero no hay observaciones de anomalías de comportamiento morfológicas y caminado en bruto anormales durante una semana después de que se produce inyección intraperitoneal de una dosis alta de Compuestos CDE (500 µg de selenio de cada compuesto por kilogramo de peso corporal, los datos no mostrados). Por lo tanto, los Compuestos CDE probablemente tienen poco o ningún de efecto tóxico en estos ratones.

10

En conjunto, estos resultados demuestran que los Compuestos CDE pueden reducir significativamente los niveles de glucosa en sangre en un modelo de ratón de diabetes Tipo II agresiva. Estos resultados indican el potencial de los Compuestos CDE tanto en la prevención como el tratamiento de hiperglucemia en sujetos diabéticos.

15

Tolerancia a glucosa mejorada en ratones *Lepr^{db/db}* diabéticos después de administración de los Compuestos CDE antes de la aparición de hiperglucemia

20

La prueba de tolerancia a la glucosa identifica anomalías en la forma en que el cuerpo maneja la glucosa después de una subida alta y rápida de azúcar en la sangre (por ejemplo, usualmente después de una comida). La insulina desempeña una función fundamental no sólo en la inhibición de la producción de glucosa en el hígado, sino también en la absorción de glucosa, almacenamiento y metabolismo en el

25

músculo, hígado y células de grasa, provocando un menor nivel de glucosa en el torrente sanguíneo.

Los pacientes diabéticos tienen una tolerancia a la glucosa muy bajo, ya sea debido a su incapacidad para producir insulina o responder a la insulina de manera eficiente para mantener la homeostasis de glucosa. Los estudios *in vitro* descritos aquí indican que los Compuestos CDE no sólo puede imitar la insulina, sino también pueden pasar por alto la insulina y mejorar la acción de insulina para inhibir la producción de glucosa y/o la expresión de *G6PC*, un gen clave para la producción de glucosa, en las células de hígado (figuras 2A 2B, 3, 4, 9A-9C, 10A-10C, 11A-11B). Los ratones *Lepr^{db/db}* son el modelo diabético Tipo II de ratón ideal para investigar la función de los Compuestos CDE en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, teniendo en cuenta que la alteración de la tolerancia a la glucosa y resistencia a insulina se muestran en estos ratones mutantes. Por lo tanto, se investigó el efecto de los Compuestos CDE en la mejora de tolerancia a la glucosa en ratones *Lepr^{db/db}* después de la inyección intraperitoneal de los Compuestos CDE en ratones de 27 días a 3.5 meses de edad.

Al igual que en los estudios descritos anteriormente, se inyectaron ratones *Lepr^{db/db}* con edad de 27 días por vía intraperitoneal con solución salina fisiológica o Compuestos CDE en combinación (5 µg de selenio de cada compuesto por

kilogramo de peso corporal equivalente a 5 ppb de cada compuesto por inyección en cada ratón) cada dos días hasta que los ratones alcanzan la edad de 3.5 meses. Al final del tratamiento, estos ratones se mantuvieron en ayunas durante la noche, se inyectaron con glucosa (2 g/kg de peso corporal) y los niveles de glucosa en sangre medidos a 0.25 horas (15 minutos), 0.5 horas (30 minutos), 1 hora (60 minutos) y 2 horas (120 minutos) de inyección posterior de glucosa. También se registraron los niveles de glucosa en sangre inmediatamente antes de la inyección de glucosa (denominado punto de tiempo cero). La media $\pm$ EEM. El * en la figura 15A indica que P se refiere a por lo menos <0.05 cuando se compara con grupo tratado con solución salina en el mismo punto de tiempo.

15

Como se muestra en la figura 15A, se observó un aumento significativo en los niveles de glucosa en sangre en *Lepr^{db/db}* ratones tratados con solución salina después de inyección de glucosa a partir de las 0,25 horas y en todos los siguientes puntos de tiempo ensayados. Como se ha indicado, el límite de medición de glucosa del glucómetro empleado por estos análisis fue 600 mg / dL. Por lo tanto, el exceso de niveles de glucosa en este límite todavía se tienen que registrar como 600 mg / dl. La razón para afirmar esto es señalar que las mediciones, en particular para los animales tratados con solución salina, también pueden representar subestimaciones de las verdaderas concentraciones de glucosa en sangre.

25

En ratones *Lepr^{db/db}* tratados con compuestos CDE, los niveles de glucosa en sangre fueron significativamente más bajos que los ratones tratados con solución salina antes de inyección de glucosa. Al igual que en los ratones tratados con solución salina, cinco de seis ratones tratados con compuestos CDE probados tenían niveles de glucosa en sangre cerca de o mayor de 600 mg/dL a 0,5 horas y 1 hora después de la inyección de glucosa (véase Figura 15A). Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre en todos los seis ratones *Lepr^{db/db}* probados después del tratamiento con compuestos CDE fueron significativamente menores que los compañeros de camada tratados con solución salina a las 2 horas después de inyección de glucosa (véase Figura 15A).

El análisis cuantitativo del área bajo la curva (AUC) de la gráfica anterior se muestra en la figura 15A demuestran que también hubo una disminución significativa de glucosa en sangre durante el período de tiempo de prueba después de inyección de glucosa en ratones *Lepr^{db} / db* tratados con compuestos CDE en comparación con ratones tratados con solución salina (véase Fig. 15B). Sin embargo, una vez más, debido al límite de la medición del glucómetro, es probable que esta disminución fuera más dramática que lo que se muestra en la figura 15B. Sin embargo, se debe enfatizar que la disminución aún fue significativamente diferente.

Se observó que los niveles de glucosa en ratones *Lep^{rd/db}* tratados con compuestos CDE a 2 horas después de inyección de glucosa fueron aún mayores que los niveles de glucosa antes de la inyección de glucosa (véase la Fig. 15A). Estos resultados sugieren que una desaparición completa de la glucosa administrada en el torrente sanguíneo de los ratones *Lep^{rd/db}* por compuestos CDE probablemente tomará más de 2 horas de periodo de seguimiento utilizada en este experimento.

10

En resumen, los estudios anteriores demuestran que los compuestos del CDE en la dosis probada puede mejorar significativamente la tolerancia a la glucosa en ratones *Lep^{rd/db}*. La acción de estos compuestos está probablemente mediada a través de la mejora de la sensibilidad a la insulina en la disminución de la glucosa en el hígado, así como otros órganos tales como los tejidos musculares y adiposos.

15

20 **Resumen**

Estos resultados demuestran por primera vez que los compuestos CDE no sólo pueden reducir los niveles de glucosa en ayunas (Figuras 14A-14B), sino también pueden mejorar la tolerancia a la glucosa (Figuras 15A-15B) en un modelo de ratón diabético tipo II agresivo. Sobre la base de un extenso trabajo de cultivo celular, el probable modo de acción del

25

Compuesto CDE en estos animales es (1) derivar insulina para inactivar Foxo1, Foxo3, Foxo4, que conduce a la reducción de expresión *G6PC* y producción de glucosa en células hepáticas, como se demuestra en hepatocitos primarios de ratón y células hepáticas AML-12 (véase las figuras 2A-2B, 3, 4, 6A-6C, 7A-7C, 9A-9C, 10A-10C, 11A-11B, 12A-12F, 13A-13D.); (2) mejorar la sensibilidad a la insulina mediante la inhibición de expresión *G6PC* mediada por Foxo1, Foxo3, Foxo4 y la producción de glucosa en el hígado, como también se indica por los estudios en células hepáticas cultivadas (las figuras 4, 10A-10C, 11A-11B); y / o (3) mejorar la acción de la insulina o derivar insulina para mejorar la absorción y / o metabolismo de glucosa en las células del hígado, músculo y grasa, como se sugiere en las figuras 15A-15B. Adicionalmente, la mejora en la sensibilidad a la insulina puede ser debido a la mejora de la expresión *Insr* y *Igf1r* por Compuestos CDE, como se indica por los estudios en células AML-12 de hígado de ratón (Figuras 5A-5D).

Independientemente, nuestros estudios demuestran que los compuestos CDE pueden inhibir la producción de glucosa y mejorar la tolerancia a la glucosa en un modelo de ratón diabético resistente a la insulina. Estos resultados sugieren que los compuestos CDE se pueden desarrollar para el tratamiento de hiperglucemia e insensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos. Adicionalmente, los Compuestos CDE también se pueden utilizar para prevenir el desarrollo de

hiperglucemia en sujetos pre-diabéticos por su capacidad de reducir la producción de glucosa en el torrente sanguíneo si se administra antes de la aparición de hiperglucemia en pacientes de riesgo. Adicionalmente, los compuestos CDE
5 también pueden ser útiles para el tratamiento de la obesidad debido a su capacidad de reducir los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la
10 presente solicitud se incorporan aquí por referencia. Varias modificaciones y variaciones de los métodos y composiciones descritos de la presente solicitud serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la presente solicitud. Aunque la presente solicitud ha
15 sido descrita en relación con las realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la presente solicitud tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la presente
20 solicitud que son obvias para los expertos en los campos pertinentes están destinadas a estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para reemplazar insulina en un sujeto que comprende:

5 administrar una composición al sujeto, la
composición
comprende por lo menos tres diferentes compuestos
seleccionados del grupo que consiste de 5'-
Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-
10 glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la
Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un
compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los
mismos; y un portador.

15 2. Un método para mejorar la actividad de insulina en un
sujeto que comprende:

 administrar una composición al sujeto, la
composición comprende por lo menos tres diferentes
compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-
20 Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-
glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la
Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un
compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los
mismos; y un portador.

25

3. El método de la reivindicación 2, que comprende
adicionalmente administrar insulina o un análogo o

derivado de la misma.

4. Un método para inhibir la producción de glucosa en un sujeto que comprende:

5 administrar una composición al sujeto, la
composición comprende por lo menos tres diferentes
compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-
Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-
glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la
10 Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un
compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los
mismos; y un portador.

5. Un método para modular el metabolismo de glucosa en un
15 sujeto que comprende:

 administrar una composición al sujeto, la
composición comprende por lo menos tres diferentes
compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-
Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-
20 glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la
Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un
compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los
mismos; y un portador.

25 6. El método de la reivindicación 1, en el que la
composición comprende 5'-Metilselenoadenosina, Se-
Adenosil-L-homocisteína y Gama-glutamil-metilseleno-

cisteína.

7. El método de la reivindicación 2, en el que la
composición comprende 5'-Metilselenoadenosina, Se-
5 Adenosil-L-homocisteína y Gama-glutamil-metilseleno-
cisteína.
8. El método de la reivindicación 3, en el que la
composición comprende 5'-Metilselenoadenosina, Se-
10 Adenosil-L-homocisteína y Gama-glutamil-metilseleno-
cisteína.
9. El método de la reivindicación 4, en el que la
composición comprende 5'-Metilselenoadenosina, Se-
15 Adenosil-L-homocisteína y Gama-glutamil-metilseleno-
cisteína.
10. El método de la reivindicación 5, en el que la
composición comprende 5'-Metilselenoadenosina, Se-
20 Adenosil-L-homocisteína y Gama-glutamil-metilseleno-
cisteína.
11. El método de la reivindicación 1, en el que la
composición comprende por lo menos 0.1% (p/v) de 5'-
25 Metilselenoadenosina.
12. El método de la reivindicación 2, en el que la

composición comprende por lo menos 0.1% (p/v) de 5'-Metilselenoadenosina.

13. El método de la reivindicación 3, en el que la
5 composición comprende por lo menos 0.1% (p/v) de 5'-Metilselenoadenosina.

14. El método de la reivindicación 4, en el que la
10 composición comprende por lo menos 0.1% (p/v) de 5'-Metilselenoadenosina.

15. El método de la reivindicación 5, en el que la
composición comprende por lo menos 0.1% (p/v) de 5'-Metilselenoadenosina.

15 16. El método de la reivindicación 1, en el que la
composición comprende adicionalmente insulina o un
análogo o derivado de la misma.

20 17. El método de la reivindicación 2, en el que la
composición comprende adicionalmente insulina o un
análogo o derivado de la misma.

25 18. El método de la reivindicación 3, en el que la
composición comprende adicionalmente insulina o un
análogo o derivado de la misma.

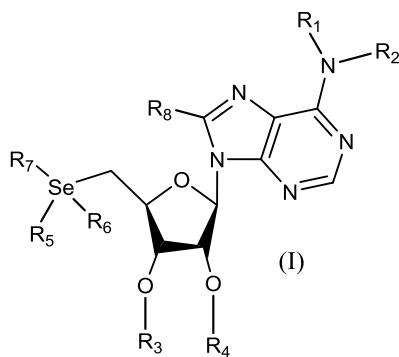
19. El método de la reivindicación 4, en el que la composición comprende adicionalmente insulina o un análogo o derivado de la misma.
- 5 20. El método de la reivindicación 5, en el que la composición comprende adicionalmente insulina o un análogo o derivado de la misma.
- 10 21. El método de la reivindicación 1, en el que la composición comprende adicionalmente un sensibilizador de insulina, un secretagogo de insulina, o un imitador de incretina.
- 15 22. El método de la reivindicación 2, en el que la composición comprende adicionalmente un sensibilizador de insulina, un secretagogo de insulina, o un imitador de incretina.
- 20 23. El método de la reivindicación 3, en el que la composición comprende adicionalmente un sensibilizador de insulina, un secretagogo de insulina, o un imitador de incretina.
- 25 24. El método de la reivindicación 4, en el que la composición comprende adicionalmente un sensibilizador de insulina, un secretagogo de insulina, o un imitador de incretina.

25. El método de la reivindicación 1, en el que la
composición excluye una o más de 5'-Metiltioadenosina,
S-Adenosil-L-homocisteína o Gama-glutamil-metil-
5 cisteína.
26. El método de la reivindicación 2, en el que la
composición excluye una o más de 5'-Metiltioadenosina,
S-Adenosil-L-homocisteína o Gama-glutamil-metil-
10 cisteína.
27. El método de la reivindicación 3, en el que la
composición excluye una o más de 5'-Metiltioadenosina,
S-Adenosil-L-homocisteína o Gama-glutamil-metil-
15 cisteína.
28. El método de la reivindicación 4, en el que la
composición excluye una o más de 5'-Metiltioadenosina,
S-Adenosil-L-homocisteína o Gama-glutamil-metil-
20 cisteína.
29. El método de la reivindicación 5, en el que la
composición excluye una o más de 5'-Metiltioadenosina,
S-Adenosil-L-homocisteína o Gama-glutamil-metil-
25 cisteína.
30. Una composición comprende por lo menos dos compuestos

diferentes seleccionados del grupo que consiste de 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II) un
 5 compuesto de la Fórmula (III), y combinaciones de los mismos; y un portador.

31. Una composición comprende por lo menos tres diferentes compuestos seleccionados del grupo que consiste de 5'-
 10 Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, y Gama-glutamyl-metilseleno-cisteína; un compuesto de la Fórmula (I), un compuesto de la Fórmula (II), un compuesto de la Fórmula (III), y un portador.

15 32. La composición de la reivindicación 30 comprende por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I):



20 o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R₁ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo,

aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_3 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_4 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR' , o está ausente; en el que R' se

selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

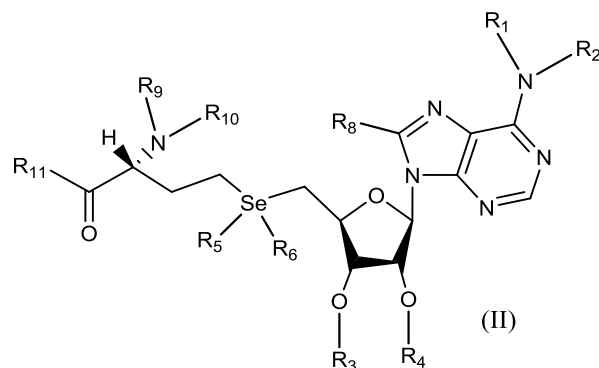
R_6 es oxo, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, OR', o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

R_7 es un alquilo C_3-C_{16} , en el que el alquilo C_3-C_{16} no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alquenilo, alquinilo, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR', Se-R', S- R', en el que R' para OR' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C_3-C_{16} , cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el que R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C_3-C_{16} , cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo; y

R_8 es hidrógeno, azido, alquilo, alquenilo, alquinilo; y un portador.

33. La composición de la reivindicación 30, comprende por lo

menos aproximadamente 0.033% (p/v) de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (II):



o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R_1 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_2 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_3 es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3

junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

5 R_4 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, cicloalquilo, carboxilo, o C-amido; o R_3 junto con R_4 y los átomos al cual se adhieren forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

10 R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

15 R_6 es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

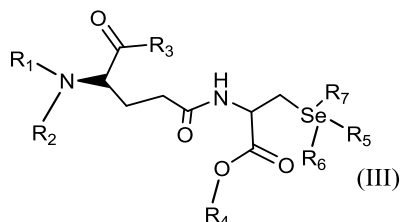
20 R_8 es hidrógeno, azido, alquilo, alqueno, alquino;

25 R_9 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' es alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_9 junto con R_{10} forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

R_{10} es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, donde R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_9 junto con R_{10} forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno; y

R_{11} es OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna; y un portador.

34. La composición de la reivindicación 30, comprende por lo menos aproximadamente 0.033% (p/v) de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (III):



o una sal, hidrato, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R_1 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un

heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

5 R_2 es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, carboxilo, cicloalquilo, $C(O)R'$, $C(O)OR'$, en el que R' se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, o heterociclilo; o R_1 junto con R_2 forman un anillo heterocíclico que tiene 4 a 8 miembros en el anillo con por lo menos un heteroátomo seleccionado de oxígeno o nitrógeno;

10 R_3 es OH, OR, alcoxi, aralcoxi, o amino, donde R se selecciona de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna;

15 R_4 es alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, o una sal farmacéuticamente aceptable, o sal interna;

R_5 es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo;

20 R_6 es oxo, hidroxilo, alquilo, alqueno, alquino, OR' , o está ausente; en el que R' se selecciona de alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, o aralquilo; y

25 R_7 es un alquilo C_3-C_{16} , en el que el alquilo C_3-C_{16} no es un alquilo sustituido que tiene un grupo carboxilo y un grupo amino, alqueno, alquino, cetona, alcohol amino, aminoácido seleccionado del

grupo que consiste de arginina, histidina, lisina, ácido
 aspártico, ácido glutámico, serina, treonina,
 asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína,
 glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina,
 5 metionina, fenilalanina, tirosina, y triptofano, OR',
 Se-R', S- R', en el que R' para OR' se selecciona del
 grupo que consiste de H, alquilo, cicloalquilo, arilo,
 aralquilo, y heterociclilo, donde R' para Se-R' se
 selecciona del grupo que consiste de H, alquilo C₃-C₁₆,
 10 cicloalquilo, arilo, aralquilo, y heterociclilo, en el
 que R' para S-R' se selecciona del grupo que consiste de
 H, alquilo C₃-C₁₆, cicloalquilo, arilo, aralquilo, y
 heterociclilo; y un portador.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La presente solicitud se relaciona con composiciones que comprenden compuestos de selenio, tales como 5'-Metilselenoadenosina, Se-Adenosil-L-homocisteína, Gama-
5 glutamil-metilseleno-cisteína, un compuesto de la Fórmula (I), Fórmula (II), o Fórmula (III), y combinaciones de los mismos, y métodos para utilizar los mismos para modular el metabolismo de glucosa en un sujeto.