

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 334**

51 Int. Cl.:  
**A61K 33/04** (2006.01)  
**A61K 36/06** (2006.01)  
**A61K 38/28** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05024235 .3**  
96 Fecha de presentación: **07.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1774972**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Uso de levaduras de selenio en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:  
14.10.2005 US 727015 P  
14.10.2005 US 726922 P  
14.10.2005 US 727018 P  
14.10.2005 US 726951 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2012**

73 Titular/es:  
**ALLTECH, INC.**  
**3031 CATNIP HILL PIKE**  
**NICHOLASVILLE, KY 40356, US**

72 Inventor/es:  
**Pearse Lyons, Thomas y**  
**Power, Ronan**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 382 334 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de levaduras de selenio en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para alterar la función celular. En concreto, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden selenio (p. ej., Sel-Plex) y a procedimientos de usar las mismas (p. ej., como tratamiento terapéutico y/o profiláctico para enfermedades neurodegenerativas). Además, la presente invención demuestra que formas específicas de selenio (p. ej., Sel-Plex) poseen la capacidad de alterar la expresión de genes asociados con enfermedad y/o envejecimiento.

**Antecedentes de la invención**

10 El selenio es un oligoelemento importante para el adecuado funcionamiento fisiológico del ser humano. El selenio se ingiere con la dieta, que puede tener un contenido variable de selenio. Por ejemplo, en grandes zonas del mundo se cultivan cosechas con escasos niveles de selenio por los bajos niveles de selenio en el suelo.

15 El selenio se incorpora en diferentes moléculas orgánicas, incluidos, por ejemplo, los aminoácidos, tales como 1-selenometionina, selenocisteína y selenocistina. Por tanto, el selenio puede formar parte de las proteínas, muchas de las cuales tienen una importancia estructural en el cuerpo. Además, el selenio es un ingrediente importante en numerosas enzimas que influyen sobre el metabolismo, la reproducción, la prevención del cáncer y la defensa inmunológica en seres humanos (véase, por ejemplo, Rayman, M, Lancet 356:233-241 (2000)).

20 Se han investigado múltiples formas de selenio. Estas incluyen selenio inorgánico, tal como selenita, y fuentes orgánicas, que incluyen la levadura de selenio. Existe una diferencia significativa entre la absorción y la toxicidad del selenio inorgánico y orgánico, siendo los compuestos inorgánicos absorbidos habitualmente y usados con menor eficacia, además de ser más tóxicos que las fuentes orgánicas de selenio.

25 En múltiples estudios se ha intentado revelar los posibles beneficios para la salud por la ingestión de niveles bajos de selenio. Por ejemplo, se ha demostrado que las concentraciones bajas de una forma inorgánica de selenio, selenito sódico, tienen algunos posibles beneficios para la salud (véase, por ejemplo, Fumsinn y col., Int. J of Obesity and Related Metab. Dis., 19, 458-463 (1995)). No obstante, a niveles de dosis elevadas, los efectos beneficiosos se invierten y se manifiesta una toxicidad peligrosa.

30 La investigación durante las últimas dos décadas ha sugerido que el selenio es eficaz en la reducción de la incidencia del cáncer cuando se proporciona a animales a dosis de únicamente 5 a 10 veces mayores que los requisitos nutricionales (véase, por ejemplo, E1-Bayoumy, The role of selenium in cancer prevention, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991). En los estudios de quimioprevención con selenio en sistemas de modelos animales se ha indicado que este elemento es eficaz para la mayoría, sino todos, los sistemas orgánicos y protege contra los efectos carcinogénicos de una amplia variedad de agresiones (véase, por ejemplo, E1-Bayoumy, The role of selenium in cancer prevention, Philadelphia, Lippincott, 1-15, 1991). Tanto los estudios epidemiológicos como de suplementación también han avalado su eficacia en la reducción de la incidencia de los cánceres hepático, de colon, de próstata y pulmonar (véase, por ejemplo, Yu y col. Biol Trace Elem Res, 56: 117-124 (1997); Clark y col., J Am Med Assoc, 276: 1957-1963 (1996); Yoshizawa y col., J Natl Cancer Inst, 90: 1219-1224, (1998); Brooks, y col., J Urol, 166: 2034-2038, (2001)). En otros estudios no se ha demostrado ningún efecto beneficioso para la reducción de selenio de los cánceres (véase, Garland y col., J. Am. Coll Nutr., 12: 400-11 (1993); Ghadirian y col., Cancer Detect Prev, 24: 305-13 (2000)).

40 También se ha demostrado que las enfermedades cardíacas se reducen en personas que consumen ciertas cantidades de selenio en su dieta. Los niveles de selenio en la circulación sanguínea se correlacionaron con el grado de progresión de la enfermedad cardiovascular con los de los pacientes que tienen los niveles más bajos de selenio que tienen el bloqueo más extenso de las arterias coronarias.

45 Existe la necesidad de identificar nuevas dianas para el tratamiento con selenio que proporcionen efectos beneficiosos a un sujeto. Además, existe la necesidad de información sobre qué formas de selenio pueden y no pueden usarse para producir estos efectos. Por ejemplo, sería muy valioso idear varios modos para usar diferentes formas de selenio (p. ej., orgánicas, inorgánicas o ambas) para beneficiar ciertos sistemas (p. ej., los sistemas nervioso, endocrino y metabólico) de un sujeto (p. ej., un ser humano, bovino u otro mamífero). Además, conocer cómo varias formas de selenio difieren en su capacidad para ejercer efectos sobre un sujeto proporciona la capacidad para personalizar tratamientos para sujetos que padecen, o están en riesgo de padecer, una enfermedad o trastorno, que podrían beneficiarse de dicho tratamiento (p. ej., formas específicas de selenio se pueden usar de forma independiente o con otros agentes conocidos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos). La identificación de efectos indeseados por el consumo de ciertas formas de selenio también se podrían identificar y evitar.

55

**Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y refiere a composiciones y procedimientos para alterar la función celular. En concreto, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden selenio (p. ej., Sel-Plex) y a procedimientos de usar las mismas (p. ej., como tratamiento terapéutico y/o profiláctico para enfermedades neurodegenerativas). Además, la presente invención demuestra que formas específicas de selenio (p. ej., Sel-Plex) poseen la capacidad de alterar la expresión de genes asociados con enfermedad y/o envejecimiento, mientras que otras formas de selenio (p. ej., selenometionina) no. En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o preventivo para la enfermedad de Alzheimer o la reducción de signos o síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer o prevenir o minimizar los acontecimientos biológicos asociados con el inicio o progresión de la enfermedad de Alzheimer o reducir la expresión génica de genes se correlacionó con el inicio o progresión de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto (p. ej., a un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer, a un sujeto con enfermedad de Alzheimer de inicio precoz, a un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer, a un sujeto que muestra signos o síntomas o una patología indicativa de enfermedad de Alzheimer, a un sujeto que se sospecha que tiene enfermedad de Alzheimer, a un sujeto que se sospecha que muestra signos o síntomas o una patología indicativa de enfermedad de Alzheimer, a un sujeto en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer (p. ej., a un sujeto predispuesto (p. ej., con antecedentes familiares o genéticamente predispuesto (p. ej., que posee una variante de la APO E) a la enfermedad de Alzheimer, etc.)), a un sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de enfermedad de Alzheimer, a un modelo animal de enfermedad de Alzheimer o a un sujeto sano que desea reducir el riesgo de enfermedad de Alzheimer) una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que se reduzca la expresión de un gen del complemento (p. ej., en la corteza cerebral) en el sujeto o en condiciones tales que se reduzcan o eliminen uno o más signos o síntomas de la enfermedad de Alzheimer o que se retrase o evite el inicio o la progresión de la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el tratamiento es profiláctico. En algunas realizaciones, la expresión génica del complemento está relacionada con la edad. En algunas realizaciones, el gen del complemento es Clq, Clq alfa, Clq beta, Clq gamma, Clqr u otro gen del complemento. En algunas realizaciones, el tratamiento profiláctico previene el inicio de signos y síntomas de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. En algunas realizaciones, la composición que comprende levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, comprende una o más formas adicionales de selenio. La presente invención no está limitada por el tipo de selenio coadministrado. De hecho, se contempla la utilidad de varias formas de selenio en la coadministración, incluidos, entre otras, selenometionina, selenocisteína, un compuesto de selenito, un compuesto de selenato, o derivados, sales o modificaciones de los mismos. En algunas realizaciones, proporcionar levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, y una o más formas diferentes de selenio proporciona una reducción aditiva en la expresión de un gen del complemento. En algunas realizaciones, proporcionar levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, y una o más formas diferentes de selenio proporciona una reducción sinérgica (p. ej., más que aditiva) en la expresión de un gen del complemento. En algunas realizaciones, proporcionar levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, y una o más formas diferentes de selenio proporciona la expresión alterada (p. ej., reducida) de más genes de los que se alteran (p. ej., reducen) con cualquier forma de selenio solo. En algunas realizaciones, la composición que comprende levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, se coadministra con un antioxidante. La presente invención no está limitada por el antioxidante usado. De hecho, se contempla que diversos antioxidantes son útiles para la coadministración con levadura enriquecida con selenio como se define en las reivindicaciones, incluidos, entre otros, difenilaminas alquiladas, N-fenilendiaminas alquiladas, fenil- $\alpha$ -naftilamina, fenil- $\alpha$ -naftilamina alquilada, dimetilquinolinas, trimetildihidroquinolinas, fenoles impedidos, hidroquinonas alquiladas, tiodifeniléteres hidroxilados, alquilidénbifenoles, tiopropionatos, ditiocarbamatos metálicos, 1,3,4-dimercaptotriazol, un compuesto de cobre soluble en aceite, NAUGALUBE 438, NAUGALUBE 438L, NAUGALUBE 640, NAUGALUBE 635, NAUGALUBE 680, NAUGALUBE AMS, NAUGALUBE APAN, Naugard PANA, NAUGALUBE TMQ, NAUGALUBE 531, NAUGALUBE 431, NAUGALUBE BHT, NAUGALUBE 403, NAUGALUBE 420, ácido ascórbico, tocoferoles, alfa-tocoferol, un compuesto de sulfhidrilo, metabisulfito sódico, N-acetil-cisteína, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, resveratrol, lactoferrina, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, polipéptido de ascorbilo, hidroxitolueno butilado, retinoides, retino, palmitato de retinilo, tocotrienoles, ubiquinona, un flavonoide, un isoflavonoide, genisteína, diadzeína, resveratrol, semilla de uva, té verde, corteza de pino, própolis, IRGANOX, antígeno P, SUMILIZER GA-80, beta-caroteno, licopeno, vitamina C, vitamina e y vitamina A. En algunas realizaciones, la composición que comprende levadura enriquecida con selenio como se define en las reivindicaciones se coadministra con un fármaco para la enfermedad de Alzheimer. La presente invención no está limitada a cualquier fármaco para la enfermedad de Alzheimer. De hecho, en la presente invención, se contempla que son útiles diversos fármacos para la enfermedad de Alzheimer, incluidos, entre otros, un antagonista de NMDA, un inhibidor de AChE, y un quelante metálico. En algunas realizaciones, el antagonista de NMDA es memantina. En algunas realizaciones, el inhibidor de AChE es tacrina, donepezilo, rivastigmina o galantamina. En algunas realizaciones, el quelante metálico es clioquinol. En algunas realizaciones, el clioquinol quela cinc y cobre.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que se altere la expresión de un gen (p. ej., Clq, Clq alpha, Clq beta, Clq gamma, Clqr, Catepsina B, Catepsina D, Catepsina Z y Catepsina O, calsenilina, presenilina 1, presenilina 2, nicastrina, Apbb1/Fe65, Aplp 1, y/o Apba1); y analizar la expresión del gen. La composición que

5 comprende selenio puede comprender Sel-Plex. Analizar la expresión del gen (p. ej., presenilina 1 o presenilina 2) puede comprender el uso de una sonda oligonucleotídica. Analizar la expresión de un gen (p. ej., presenilina 1 o presenilina 2) puede comprender el uso de PCR, por ejemplo RT-PCR. Por tanto, el análisis se puede realizar durante y/o después de la administración. El análisis puede ser para usos diagnósticos. El análisis puede ser para usos de investigación.

10 La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que se reduce la expresión de un gen de la catepsina (p. ej., en la corteza cerebral) en el sujeto. El tratamiento puede ser profiláctico. La expresión del gen de la catepsina puede estar relacionada con la edad. El gen de la catepsina puede ser catepsina B, catepsina D, catepsina Z, catepsina O u otro gen de catepsina. Reducir la expresión de un gen de catepsina puede reducir el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) en péptido  $\beta$  amiloide. La reducción de los niveles del péptido  $\beta$  amiloide puede reducir la formación de placas de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro del sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir el inicio o la progresión de signos y síntomas de enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

15 La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) de modo que se reduce la expresión de presenilina (p. ej., presenilina 1 o presenilina 2) (p. ej., en la corteza cerebral) en el sujeto. El tratamiento puede ser profiláctico. La expresión de presenilina puede estar relacionada con la edad. La reducción de la expresión de presenilina puede reducir el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) en péptido  $\beta$  amiloide. La reducción de los niveles del péptido  $\beta$  amiloide puede reducir la formación de placas de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro del sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir el inicio o la progresión de signos y síntomas de enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

20 La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) de modo que se reduce la expresión de nicastrina (p. ej., en la corteza cerebral) en el sujeto. El tratamiento puede ser profiláctico. La expresión de nicastrina puede estar relacionada con la edad. La reducción de la expresión de nicastrina puede reducir el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) en péptido  $\beta$  amiloide. La reducción de los niveles del péptido  $\beta$  amiloide puede reducir la formación de placas de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro del sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir el inicio o la progresión de signos y síntomas de enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

25 La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) de modo que se reduce la expresión de nicastrina y/o calsenilina (p. ej., en la corteza cerebral) en el sujeto. El tratamiento puede ser profiláctico. La expresión de nicastrina y/o calsenilina puede estar relacionada con la edad. La reducción de la expresión de nicastrina y/o calsenilina puede reducir el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) en péptido  $\beta$  amiloide. La reducción de los niveles del péptido  $\beta$  amiloide puede reducir la formación de placas de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro del sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir el inicio o la progresión de signos y síntomas de enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

30 La presente invención también se refiere a un procedimiento de inhibir la expresión de un gen implicado en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) de modo que se reduce la expresión de un gen implicado en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide. El gen implicado en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide puede ser Clq, Clq alfa, Clq beta, Clq gamma, Clqr, Catepsina B, Catepsina D, Catepsina Z y Catepsina O, presenilina 1, presenilina 2, nicastrina, calsenilina, Apbb1/Fe65, Aplp 1 y/o Apbal. La composición que comprende selenio se puede administrar al sujeto como tratamiento profiláctico o terapéutico para enfermedades neurodegenerativas. Los procedimientos, tal como se ha mencionado anteriormente, se pueden usar para tratar diversos sujetos, incluidos, entre otros, un sujeto en riesgo de mostrar una patología indicativa de enfermedad de Alzheimer y un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer. La composición que comprende selenio puede comprender Sel-Plex. La composición que comprende Sel-Plex puede comprender una o más formas de selenio. La composición que comprende selenio se puede coadministrar con un fármaco para Alzheimer. La administración de la composición que comprende selenio puede inhibir el inicio de signos y síntomas de Alzheimer en el sujeto. La composición que comprende selenio se puede coadministrar con un antioxidante.

35 La presente invención también se refiere a un procedimiento de inhibir la expresión de un gen implicado en la generación de péptido amiloide en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que se reduce la expresión de un gen implicado en la generación del péptido  $\beta$ -amiloide. El gen implicado en la generación del péptido  $\beta$ -amiloide puede ser Clq, Clq alfa, Clq beta, Clq gamma, Clqr, Catepsina B, Catepsina D, Catepsina Z y Catepsina O, presenilina 1, presenilina 2, nicastrina, calsenilina, Apbb1/Fe65, Aplp 1 y/o Apbal. La composición que comprende selenio se puede administrar al sujeto como tratamiento profiláctico o terapéutico para enfermedades

neurodegenerativas. Los procedimientos, tal como se ha mencionado anteriormente, se pueden usar para tratar diversos sujetos, incluidos, entre otros, un sujeto en riesgo de mostrar una patología indicativa de enfermedad de Alzheimer y un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer. La composición que comprende selenio puede comprender Sel-Plex. La composición que comprende Sel-Plex puede comprender una o más formas de selenio. La composición que comprende selenio se puede coadministrar con un fármaco para Alzheimer. La administración de la composición que comprende selenio puede inhibir el inicio de signos y síntomas de Alzheimer en el sujeto. La composición que comprende selenio se puede coadministrar con un antioxidante.

La presente invención también proporciona una composición que comprende Sel-Plex y un fármaco para la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, el fármaco para Alzheimer se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de NDMA, un inhibidor de AChE y un quelante metálico. En algunas realizaciones, el antagonista de NDMA es memantina. En algunas realizaciones, el inhibidor de AChE es tacrina, donepezilo, rivastigmina o galantamina. En algunas realizaciones, el quelante metálico es clioquinol.

La presente invención también proporciona una composición que comprende levadura enriquecida con selenio como se define en las reivindicaciones, un fármaco para la enfermedad de Alzheimer y un antioxidante. La composición que comprende selenio puede comprender Sel-Plex. En algunas realizaciones, el fármaco para Alzheimer se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de NDMA, un inhibidor de AChE y un quelante metálico.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de alteración de la función cognitiva o reducción de los signos o síntomas asociados con una disminución de la función cognitiva o prevenir profilácticamente o minimizar los acontecimientos biológicos asociados con el inicio de una disminución de la función cognitiva o alterar (p. ej., potenciar o reducir) la expresión génica de genes correlacionados con un incremento o disminución de la función cognitiva en un sujeto (p. ej., un sujeto que sufre una disminución de la función cognitiva, un sujeto que desea potenciar la función cognitiva, un sujeto que muestra signos o síntomas o la patología de una disminución de la función cognitiva, un sujeto del que se sospecha que tiene una disminución de la función cognitiva, un sujeto en riesgo de sufrir una disminución de la función cognitiva (p. ej., un sujeto anciano) o un modelo animal de función cognitiva), que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que la expresión de Lhx8 está potenciada en el sujeto o en condiciones tales que uno o más signos o síntomas de una disminución de la función cognitiva se reduce o elimina o que el inicio o la progresión de una disminución de la función cognitiva se retrasa o previene. La alteración de la función cognitiva puede inhibir la disminución de la función cognitiva del sujeto. La inhibición de la disminución de la función cognitiva en el sujeto puede comprender estimular el desarrollo de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo. La inhibición de la disminución de la función cognitiva en el sujeto puede comprender el mantenimiento de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede comprender una o más formas diferentes de selenio. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede coadministrarse con un antioxidante.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de alteración de la función cognitiva en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que la expresión de TGF $\beta$ 2 se potencia en el sujeto. La alteración de la función cognitiva puede inhibir la disminución de la función cognitiva del sujeto. La inhibición de la disminución de la función cognitiva en el sujeto puede comprender estimular la proliferación neuronal en el sujeto. La proliferación neuronal se puede producir en el cerebelo del sujeto. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede comprender una o más formas adicionales de selenio. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede coadministrarse con un antioxidante.

La presente invención también se refiere a un tratamiento profiláctico para inhibir la disminución de la función cognitiva en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende Sel-Plex. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse en condiciones tales que la expresión de Lhx8 se potencia en el sujeto. La expresión potenciada de Lhx8 puede estimular el desarrollo y/o mantenimiento de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse en condiciones tales que la expresión de TGF $\beta$ 2 se potencia en el sujeto. La expresión potenciada de TGF $\beta$ 2 puede estimular la proliferación neuronal en el sujeto. La proliferación neuronal se puede producir en el cerebelo del sujeto. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede comprender una o más formas adicionales de selenio. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede coadministrarse con un antioxidante. El tratamiento profiláctico puede prevenir (p. ej., puede prevenir el inicio, la recurrencia, y/o mejorar) los signos y síntomas de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir (p. ej., puede prevenir el inicio, la recurrencia, y/o mejorar) los signos y síntomas de la esclerosis múltiple en el sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir (p. ej., puede prevenir el inicio, la recurrencia, y/o mejorar) los signos y síntomas de la ELA en el sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir (p. ej., puede prevenir el inicio, la recurrencia, y/o mejorar) los signos y síntomas de la enfermedad de Parkinson en el sujeto. El tratamiento profiláctico puede prevenir (p. ej., puede prevenir el inicio, la recurrencia, y/o mejorar) los signos y síntomas de la enfermedad de Huntington en el sujeto. La

composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse en condiciones tales que la expresión un gen del complemento se reduce. Se ha demostrado que múltiples genes del complemento se reducen usando las composiciones de la presente invención, incluidos, entre otros, Clq, Clq alfa, Clq beta, Clq gamma y Clqr.

- 5 La presente invención no está limitada por la cantidad de levadura enriquecida con selenio como se define en las reivindicaciones, que se puede administrar a un sujeto. De hecho, se contempla que diversas dosis son útiles en la presente invención. En algunas realizaciones, la composición que comprende levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, se puede administrar al sujeto de modo que proporcione entre 25-800  $\mu\text{g}$  de selenio al sujeto cada día. En algunas realizaciones, la composición que comprende levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, se puede administrar al sujeto de modo que proporcione entre 200-400  $\mu\text{g}$  de selenio al sujeto cada día. En otras realizaciones, la composición que comprende levadura enriquecida con selenio, como se define en las reivindicaciones, se puede administrar al sujeto de modo que proporcione entre 25 y 75  $\mu\text{g}$  de selenio al sujeto cada día. Una composición que comprende dos o más formas diferentes de selenio (p. ej., selenometionina, selenito sódico (Sod-sel y/o Sel-Plex) se pueden administrar a un sujeto para proporcionar al sujeto entre 25 y 5000  $\mu\text{g}$  de selenio cada día.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de alterar la expresión asociada con la edad de un gen (p. ej., un gen del complemento o de catepsina) o reducir los signos o síntomas asociados con la edad o prevenir profílicamente o minimizar los acontecimientos biológicos asociados con el proceso de envejecimiento (p. ej., una disminución de la función cognitiva) o alterar (p. ej., potenciar o reducir) la expresión génica de genes correlacionados con un incremento de la edad en un sujeto (p. ej., un sujeto mayor de 16 años de edad o un sujeto mayor de 25 años de edad o, preferentemente, un sujeto mayor de 40 años de edad o, más preferentemente, un sujeto mayor de 50 años de edad o, incluso más preferentemente, un sujeto mayor de 60 años de edad, o un sujeto que sufre una disminución de la función cognitiva, o un sujeto que muestra signos o síntomas o patología (p. ej., una disminución de la función cognitiva) del proceso de envejecimiento, un modelo animal de envejecimiento o un sujeto que desea prevenir el inicio o progresión del proceso de envejecimiento) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que la expresión génica asociada con la edad (p. ej., genes del complemento o de catepsina) se reduce o en condiciones tales que uno o más signos o síntomas del envejecimiento (p. ej., una pérdida de la función cognitiva) se reduce o elimina o que el inicio o progresión del proceso de envejecimiento se retrasa o previene. Muchos genes cuya expresión se altera (p. ej., elevada) con la edad se observa que se altera (p. ej., reduce) con las composiciones de la presente invención, incluidos, entre otros, genes del complemento (p. ej., C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma, y C1qr), genes de catepsina (p. ej., Catepsina B, Catepsina D, Catepsina Z y Catepsina O) genes de factores de transcripción Junb y homeobox (Hox). La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse al sujeto para proporcionar 200  $\mu\text{g}$  de selenio al sujeto cada día. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse al sujeto para proporcionar entre 25 t 400  $\mu\text{g}$  de selenio al sujeto cada día. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede comprender una o más formas diferentes de selenio. La una o más formas diferentes de selenio pueden comprender selenito sódico. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede coadministrarse con un fármaco para la enfermedad de Alzheimer. La administración de la composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex) puede inhibir (p. ej., previene el inicio, la recurrencia y/o mejora) los signos y síntomas de enfermedad de Alzheimer en el sujeto. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede coadministrarse con un antioxidante. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse al sujeto como un tratamiento profiláctico o terapéutico para las enfermedades neurodegenerativas.

Una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse a un sujeto en combinación con una dieta restringida en calorías con el fin de prevenir el envejecimiento o el proceso de envejecimiento (p. ej., atenuar la expresión génica asociada con la edad). La presente invención se refiere además a un procedimiento de alteración de la función cognitiva (p. ej., cambios en el circuito neuronal) asociada con la edad que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que la expresión de Lhx8 está potenciada y/o elevada.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento o preventivo de la diabetes o la reducción de signos o síntomas asociados con la diabetes o prevenir profílicamente o minimizar los acontecimientos biológicos asociados con el inicio o progresión de la enfermedad de Alzheimer o reducir la expresión génica de genes se correlacionó con el inicio o progresión de la diabetes, que comprende administrar a un sujeto (p. ej., a un sujeto que padece diabetes, a un sujeto con diabetes de tipo I o de tipo II, a un sujeto que padece diabetes, a un sujeto que muestra signos o síntomas o una patología indicativa de diabetes, a un sujeto que se sospecha que tiene diabetes, a un sujeto que se sospecha que muestra signos o síntomas o una patología indicativa de diabetes, a un sujeto en riesgo de padecer diabetes (p. ej., a un sujeto predispuesto (p. ej., con antecedentes familiares o genéticamente predispuesto etc.)) a un sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de diabetes, a un

modelo animal de diabetes o a un sujeto sano que desea reducir el riesgo de diabetes) una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que se reduzca la expresión de neurogenina (Neurog3) se reduce en el sujeto o en condiciones tales que uno o más signos o síntomas de diabetes se reducen o eliminan o que el inicio o la progresión de la diabetes se retrasa o previene. El tratamiento puede ser profiláctico. La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para múltiples tipos de diabetes. La diabetes tratada con las composiciones de la presente invención puede ser diabetes de tipo I o de tipo II. El tratamiento profiláctico puede prevenir el inicio de los signos y síntomas de la diabetes en el sujeto. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede comprender una o más formas diferentes de selenio. La composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse con un fármaco para la diabetes. Múltiples fármacos para la diabetes encuentran utilidad con las composiciones de la presente invención, incluidos, entre otros, vanadio, metformina, tiazolidinodiona, TZD, insulina de acción intermedia, Hagedom de protamina neutra, NPH una insulina de acción prolongada, glargina, Lantus, insulina, insulina detemir, Levemir, mimético de incretina, Exenatida, Byetta, agente de sulfonilurea, clorpropamida, tolbutamida, tolbutamida, tolazamida, acetohexamida, gliburida, glicipizida, meglitinida, repaglinida, arandina, biguanidas, metformina, glucófago, inhibidor de la alfa-glucosidasa, AGI, acarbosa, precosa, miglitol, gliset, tiazolidindiona, pioglitazona, actos, rosiglitazona, Arandia, análogo de amilina, acetato de pramlintida y simlina.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) y un fármaco para la diabetes.

## 20 **Descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el peso corporal de ratones que reciben una dieta deficiente en selenio (def. Sel) o una dieta que comprende selenometionina (SeM), selenito sódico (Sod-Sel) o Sel-Plex.

La Figura 2 representa un cuadro de la cascada del complemento.

La Figura 3 muestra que la expresión génica del complemento disminuye después de tratar a un sujeto con una composición que comprende selenio. (\*) indica una reducción significativa,  $p < 0,01$ .

La Figura 4 representa un cuadro de los nervios eferentes periféricos.

## **Definiciones**

Como se usa en el presente documento, los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se refieren todos a una secuencia primaria de aminoácidos unidos covalentemente por “enlaces peptídicos” covalentes. En general, un péptido consiste en unos pocos aminoácidos, normalmente de 2-50 aminoácidos, y es más corto que una proteína. El término “polipéptido” abarca péptidos y proteínas. En algunas realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína es sintético, mientras que en otras realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína son recombinantes o naturales. Un péptido sintético es un péptido que se produce por medios artificiales in vitro (es decir, no se ha producido in vivo).

Los términos “muestra” y “especimen” se usan en su sentido más amplio y abarcan muestras o especímenes obtenidos de cualquier fuente. Como se usa en el presente documento, el término “muestra” se usa para hacer referencia a muestras biológicas obtenidas de animales (incluidos seres humanos) y abarca fluidos, sólidos, tejidos y gases. En algunas realizaciones de la presente invención, las muestras biológicas incluyen líquido cefalorraquídeo (LCR), fluido seroso, orina, saliva, sangre y productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. No obstante, estos ejemplos no se tienen que considerar como limitantes de los tipos de muestra que encuentran utilidad en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, los términos “levadura enriquecida con selenio” y “levadura selenizada” se refieren a cualquier levadura (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*) que se cultiva en un medio que contiene sales inorgánicas de selenio. La presente invención no está limitada por la sal de selenio usada. De hecho, en la presente invención, se contempla que son útiles diversas sales de selenio, incluidas, entre otros, selenito sódico, selenito sódico, selenito de cobalto o selenito de cobalto. También se puede usar selenometionina libre (p. ej., no asociada con una célula o levadura) como la fuente de selenio para levaduras enriquecidas con selenio, ya que la levadura no incorpora esta forma de selenio. Durante el cultivo, dada la similitud química entre el selenio y el azufre, la levadura incorpora selenio en lugar de azufre en lo que normalmente son compuestos orgánicos que contienen azufre dentro de la célula. Un compuesto que contiene selenio en dichas preparaciones de levadura es selenometionina, que estará presente en una forma que se incorpora en polipéptidos/proteínas. La cantidad de selenio celular total presente en forma de selenometionina en dichas preparaciones variará, pero puede estar entre 10 y 100 %, 20-60 %, 50-75 % y entre 60 y 75 %. El resto del selenio orgánico en las preparaciones de levadura selenizada está principalmente formado por intermedios en la vía de la biosíntesis de selenometionina. Estos incluyen, entre otros, selenocisteína, selenocistationina, selenohomocisteína y selenoadenosil-selenometionina. La cantidad de sal de selenio inorgánico residual en el producto terminado es, en general, bastante baja (p. ej.,  $< 2\%$ ). No obstante, la presente invención no está limitada por este porcentaje, como preparaciones que contienen más (p. ej., entre 2 y 70 %) o menos (p. ej., entre 0,1 y 2 %) que este porcentaje también están abarcadas por la invención.

Como se usa en el presente documento, el término “Sel-Plex” se refiere a una levadura enriquecida con selenio no viable y seca (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae* de número de registro CNCM I-3060, Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), Institut Pasteur, Paris, París, Francia) cultivada en una fermentación de alimentación discontinua que proporciona cantidades crecientes de melaza de caña y sales de selenio de un modo que minimiza los efectos perjudiciales de las sales de selenio sobre la tasa de crecimiento de la levadura y permite la incorporación óptima de selenio inorgánico en el material orgánico celular. El selenio inorgánico residual se elimina (p. ej., usando un proceso de lavado riguroso) y no supera el 2 % del contenido de selenio total.

Como se usa en el presente documento, la expresión “selenio orgánico” se refiere a un compuesto antisentido en el que el selenio sustituye al azufre. Por tanto, el selenio orgánico puede hacer referencia a cualquiera de estos compuestos biosintetizado en levaduras o puede hacer referencia a compuestos de selenio orgánicos libres que se sintetizan químicamente. Un ejemplo de esto último es selenometionina libre.

Como se usa en el presente documento, la expresión “selenio inorgánico” se refiere, en general, a cualquier sal de selenio (p. ej., selenito sódico, selenito sódico, selenito de cobalto y selenito de cobalto). También hay diversas otras fuentes de selenio inorgánico (véase, por ejemplo, enumerados en el índice de Merck). La levadura selenizada se puede generar usando una fuente de selenio inorgánico incluidas, entre otras, selenito sódico, selenito sódico, selenito de cobalto, selenito de cobalto, ácido selénico, ácido selenioso, bromuro de selenio, cloruro de selenio, hexafluoruro de selenio, óxido de selenio, oxibromuro de selenio, oxiclorigenato de selenio, oxifluoruro de selenio, sulfuros de selenio, tetrabromuro de selenio, tetrabromuro de selenio, tetracloruro de selenio y tetrafluoruro de selenio. Como se usa en el presente documento, el término “proteína  $\beta$  amiloide” se refiere a una proteína o péptido derivado proteolíticamente de la proteína precursora de amiloide (APP) transmembrana. Las proteínas  $\beta$  amiloides pueden formar un ensamblaje no fibrilar oligomérico de la proteína  $\beta$  amiloide (p. ej., ensamblaje oligomérico de la proteína  $\beta$  amiloide o ensamblaje oligomérico) y, en general, comprende entre 2-12 proteínas o péptidos  $\beta$  amiloides. Entre las proteínas  $\beta$  amiloides también pueden formar ensamblajes fibrilares que comprenden, en general, más de 12 proteínas o péptidos  $\beta$  amiloides. Las proteínas  $\beta$  amiloides (p. ej., individualmente o como se encuentran en las estructuras descritas anteriormente) están implicadas en la formación de placas, una de los rasgos característicos de la enfermedad de Alzheimer.

Como se usa en el presente documento, la expresión “estrés oxidativo” se refiere a los efectos citotóxicos de los radicales de oxígeno (p. ej., anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )), generados como, por ejemplo, subproductos de procesos metabólicos que usan oxígeno molecular (véase, por ejemplo Coyle y col., *Science* 262:689-695 (1993)).

Como se usa en el presente documento, los términos “huésped” “sujeto” y “paciente” se refieren a cualquier animal, incluidos, entre otros, animales humanos y no humanos (p. ej., perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, aves de corral, peces, crustáceos) que se estudian, analizan, someten a ensayo, diagnostican o tratan. Como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se usan de forma intercambiable, a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, los términos “enfermedad de Alzheimer” y “EA” se refieren a un trastorno neurodegenerativo y abarca enfermedad de Alzheimer familiar y enfermedad de Alzheimer esporádica. La expresión “enfermedad de Alzheimer familiar” se refiere a la enfermedad de Alzheimer asociada con factores genéticos (es decir, demuestra herencia), mientras que “enfermedad de Alzheimer esporádica” se refiere a la enfermedad de Alzheimer que no se asocia con antecedentes familiares de la enfermedad. Los síntomas indicativos de la enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos incluyen habitualmente, entre otros, demencia leve o grave, alteración progresiva de la memoria (que varía desde ligeros olvidos a desorientación y graves pérdidas de memoria), malas capacidades visuo-espaciales, cambios de personalidad, mal control de los impulsos, poco juicio, desconfianza en los demás, aumento de la soberbia, inquietud, mal capacidad de planificación, malas tomas de decisiones y retirada de las relaciones sociales. En los casos graves, los pacientes pierden la capacidad para usar el lenguaje y comunicarse, y requieren ayuda para la higiene personal, comer y vestirse, y, en última instancia, quedan confinados a la cama. Las patologías principales dentro del tejido cerebral incluyen placas de  $\beta$ -amiloide neuríticas extracelulares, marañas neurofibrilares, degeneración neurofibrilar, degeneración neuronal granulovascular, pérdida sináptica y amplia muerte de células neuronales.

Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad de Alzheimer de inicio precoz” se refiere a la clasificación usada en los casos de enfermedad de Alzheimer diagnosticada antes de los 65 años de edad. Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad de Alzheimer de inicio tardío” se refiere a la clasificación usada en los casos de enfermedad de Alzheimer diagnosticada después de los 65 años de edad.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto que padece enfermedad de Alzheimer” o “sujeto que muestra signos o síntomas o patología indicativa de enfermedad de Alzheimer” o “sujetos que se sospecha que muestran signos o síntomas o patología indicativa de enfermedad de Alzheimer” se refieren a un sujeto que se identifica como que padece, o es probable que padezca, enfermedad de Alzheimer e caso a signos, síntomas y patología conocidos de la enfermedad de Alzheimer.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de enfermedad de Alzheimer” y “sujeto en riesgo de enfermedad de Alzheimer” hacen referencia a un sujeto que se

identifica como que está en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer (p. ej., debido a la edad o a un patrón de herencia familiar de la enfermedad de Alzheimer en la familia del sujeto).

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “fármaco para el Alzheimer” se refiere a un agente usado para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer. Dichos agentes incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, fármacos, anticuerpos, productos farmacéuticos y similares. Por ejemplo, los agentes terapéuticos usados para tratar la enfermedad de Alzheimer incluyen, entre otros, antagonistas de NMDA (p. ej., memantina) e inhibidores de AChE (p. ej., tacrina (Cognex), donepezilo (Aricept), rivastigmina (Exelon), y galantamina (galantamina, Reminyl)).

10 Como se usa en el presente documento, el término “lesión” se refiere a una herida o daño o a un cambio patológico en un tejido. Por ejemplo, las lesiones de placas de  $\beta$ -amiloide observadas en los cerebros de pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer se consideran la patología predominante característica de la enfermedad.

15 Como se usa en el presente documento, las expresiones “esclerosis lateral amiotrófica” y ELA” se refieren a un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por un trastorno devastador de las células del cuerno anterior de la médula espinal y los núcleos craneales motores que conduce a una progresiva debilidad muscular y atrofia. Los síntomas indicativos de ELA en sujetos humanos normalmente incluyen, entre otros, debilidad leve o grave de los músculos bulbares o de uno o debilidad de las extremidades en varios grupos de músculos de las extremidades (p. ej., bilateral o simétrica), debilidad y atrofia de los músculos intrínsecos de la mano que progresan a afectar los antebrazos y los músculos de la cintura escapular y las extremidades inferiores. La afectación de las neuronas motoras superiores e inferiores es característica. Los pacientes desarrollan hiperreflexia variable, clonos, espasticidad, respuestas plantares extensoras y fasciculaciones de las extremidades o la lengua. La degeneración waleriana de los tractos corticoespinal y corticobulbar se puede demostrar mediante RM (lesiones en T2 de alta intensidad en los lóbulos frontales) o en la autopsia.

20 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto que padece ELA” o “sujeto que muestra signos o síntomas o patología indicativa de ELA” o “sujetos que se sospecha que muestran signos o síntomas o patología indicativa de ELA” se refieren a un sujeto que se identifica como que padece, o es probable que padezca, ELA en base a signos, síntomas y patología conocidos de ELA.

25 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de ELA” y “sujeto en riesgo de ELA” hacen referencia a un sujeto que se identifica como que está en riesgo de desarrollar ELA (p. ej., debido a la edad o a un patrón de herencia familiar de la ELA en la familia del sujeto).

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico para la ELA” se refiere a un agente usado para tratar o prevenir la ELA. Dichos agentes incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, fármacos, anticuerpos, productos farmacéuticos y similares. Por ejemplo, los agentes terapéuticos usados para tratar la ELA incluyen, entre otros, Riluzol, Baclofen (Lioresal) y Tizanidina (Zanaflex).

35 Como se usa en el presente documento, las expresiones “enfermedad de Huntington” y “EH” se refieren a un trastorno neurodegenerativo que es un trastorno hereditario autosómico dominante de inicio en adultos asociado con pérdida de células en una subpoblación específica de neuronas en los ganglios basales y la corteza. Los rasgos característicos de la EH incluyen movimientos involuntarios (p. ej., el corea, un estado de movimientos espontáneos excesivos, a tiempos irregulares, distribuidos aleatoriamente y abruptos, es un rasgo característico de la EH), demencia y cambios conductuales. La neuropatología en la EH se produce en el neocórtex, en el que la atrofia macroscópica del núcleo caudado y el putamen se acompañan de pérdida neuronal selectiva y astrogliosis. También se ve una marcada pérdida neuronal en las capas profundas de la corteza cerebral. Otras regiones, incluidos el globo pálido, el tálamo, el núcleo subtalámico, la sustancia negra y el cerebelo, muestran grados variables de atrofia en función del grado patológico.

40 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto que padece EH” o “sujeto que muestra signos o síntomas o patología indicativa de EH” o “sujetos que se sospecha que muestran signos o síntomas o patología indicativa de EH” se refieren a un sujeto que se identifica como que padece, o es probable que padezca, EH en base a signos, síntomas y patología conocidos de EH.

45 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de EH” y “sujeto en riesgo de EH” hacen referencia a un sujeto que se identifica como que está en riesgo de desarrollar EH (p. ej., debido a la edad o a un patrón de herencia familiar de la EH en la familia del sujeto).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico para la EH” se refiere a un agente usado para tratar o prevenir la EH. Dichos agentes incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, fármacos, anticuerpos, productos farmacéuticos y similares. Por ejemplo, los agentes terapéuticos usados para tratar la EH incluyen, entre otros, medicamentos anticonvulsivos, que incluyen, entre otros, ácido valproico (p. ej., Depakote, Depakene y Depacon) y benzodiazepinas, tales como clonazepam (p. ej., Klonopin), medicamentos antipsicóticos (p.ej., risperidona (p.ej., Risperdal), y haloperidol (p.ej.; Haldol)), alcaloides de Rauwolfia (p.ej., resperina) y antidepresivos (p. ej., paroxetina (p.ej., Paxil)).

Como se usa en el presente documento, los términos “enfermedad de Parkinson” y “EP” se refieren a un trastorno

neurodegenerativo, que es un trastorno neurodegenerativo progresivo asociado con una pérdida de neuronas nigroestriatales dopaminérgicas. Los rasgos característicos de la EP incluyen pérdida de neuronas dopaminérgicas pigmentadas en la sustancia negra y la presencia de cuerpos de Lewy.

5 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto que padece EP” o “sujeto que muestra signos o síntomas o patología indicativa de EP” o “sujetos que se sospecha que muestran signos o síntomas o patología indicativa de EP” se refieren a un sujeto que se identifica como que padece, o es probable que padezca, EP en base a signos, síntomas y patología conocidos de EP.

10 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de EP” y “sujeto en riesgo de EP” hacen referencia a un sujeto que se identifica como que está en riesgo de desarrollar EP (p. ej., debido a la edad o a un patrón de herencia familiar de la EP en la familia del sujeto).

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico para la EP” se refiere a un agente usado para tratar o prevenir la EP. Dichos agentes incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, fármacos, anticuerpos, productos farmacéuticos y similares. Por ejemplo, los agentes terapéuticos usados para tratar la EP incluyen, entre otros, profármacos de dopamina, tales como levodopa/PDI y levodopa/carbidopa (p. ej., Sinemet, Sinemet CR), agonistas dopaminérgicos tales como apomorfina (p. ej., Apokyn), bromocriptina (p. ej., Parlodel), pergolida (p. ej., Permax), pramipexol (p. ej., Mirapex) y ropinirol (p. ej., Requip), inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) tales como tolcapona (p. ej., Tasmar) y entacapona, (p. ej., Comtan), anticolinérgicos tales como trihexifenidil (p. ej., Artane, Trihexy) y mesilato de benzotropina (p. ej., Cogentin), inhibidores de la MAO-B tales como selegilina (p. ej., Eldepryl) y amantadina (p. ej., Symmetrel).

20 Como se usa en el presente documento, los términos “esclerosis múltiple” y “EM” se refieren a un trastorno neurodegenerativo que es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC). Las lesiones de la EM, caracterizadas por infiltración perivascular de monocitos y linfocitos, aparecen como zonas induradas en especímenes patológicos; de ahí la expresión “esclerosis en placas.” Los rasgos característicos de la EM incluyen infiltración perivenular de linfocitos y macrófagos en el parénquima del cerebro, tronco encefálico, nervios ópticos y médula espinal, formación casi constantes de lesiones y una evolución clínica progresiva que conduce a discapacidad física.

25 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto que padece EM o “sujeto que muestra signos o síntomas o patología indicativa de EM” o “sujetos que se sospecha que muestran signos o síntomas o patología indicativa de EM” se refieren a un sujeto que se identifica como que padece, o es probable que padezca, EM en base a signos, síntomas y patología conocidos de EM.

30 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de EM” y “sujeto en riesgo de EM” hacen referencia a un sujeto que se identifica como que está en riesgo de desarrollar EM.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico para la EM se refiere a un agente usado para tratar o prevenir la EM. Dichos agentes incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, fármacos, anticuerpos, productos farmacéuticos y similares. Por ejemplo, los agentes terapéuticos usados para tratar la EM incluyen, entre otros, inmunomoduladores (p. ej., interferón-1a (Avonex), Interferón beta-1a (Rebif), Interferón beta-1b (Betaseron), acetato de glatiramer (Copaxone), y Natalizumab (Tysabri)), corticosteroides (p.ej., metilprednisolona) e inmunosupresores (p. ej., Mitoxantrona (Novantrone), Ciclofosfamida (Cytosan, Neosar), Azatioprina (IMURAN), Metotrexato (Rheumatrex).

40 Como se usa en el presente documento, el término “diabetes” se refiere a una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza por necrosis de las células de los islotes pancreáticos y una falta de secreción de insulina. Por ejemplo, los pacientes con diabetes de tipo 1 dependen de insulina. Los rasgos característicos de la diabetes incluyen resistencia a la insulina periférica con un defecto de secreción de insulina que varía en gravedad y las complicaciones, que incluyen hipoglucemia e hiperglucemia, aumento del riesgo de infecciones, complicaciones microvasculares (p. ej., retinopatía, nefropatía), complicaciones neuropáticas y enfermedad macrovascular.

45 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto que padece diabetes” o “sujeto que muestra signos o síntomas o patología indicativa de DIABETES” o “sujetos que se sospecha que muestran signos o síntomas o patología indicativa de DIABETES” se refieren a un sujeto que se identifica como que padece, o es probable que padezca, DIABETES en base a signos, síntomas y patología conocidos de DIABETES.

50 Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de DIABETES” y “sujeto en riesgo de DIABETES” hacen referencia a un sujeto que se identifica como que está en riesgo de desarrollar DIABETES (p. ej., debido a la edad o a un patrón de herencia familiar de la DIABETES en la familia del sujeto).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico para la diabetes” se refiere a un agente usado para tratar o prevenir la diabetes. Dichos agentes incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, fármacos, anticuerpos, productos farmacéuticos y similares. Por ejemplo, los agentes terapéuticos usados para tratar la diabetes incluyen, entre otras, medicación oral para incrementar la sensibilidad a la insulina (p. ej., metformina, una

tiazolidinodiona, TZD), insulina de acción intermedia (p. ej., protamina neutra Hagedom (NPH)), una insulina de acción prolongada (p. ej., glargina (Lantus), insulina, insulina detemit (Levemir), miméticos de incretina (p. ej., Exenatida (Byetta)), agentes de sulfonilurea (p. ej., clorpropamida, tolbutamida, tolbutamida, tolazamida, acetohexamida, gliburida, glicipizida y glimerpirida), meglitinida (p. ej., repaglinida (Prandin)), biguanidas (p. ej., metformina (Glucophage)), inhibidores de la alfa-glucosidasa (AGI) (p. ej., acarbosa (Precose), miglitol (Glyset), tiazolidindionas (p. ej., pioglitazona (Actos), rosiglitazona (Avandia) y análogos de amilina (p. ej., acetato de pramlintida (Symlin)).

Como se usa en el presente documento, las expresiones “sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de ictus” y “sujeto en riesgo de ictus” hacen referencia a un sujeto que se identifica como que está en riesgo de desarrollar ictus (p. ej., debido a la edad o a un patrón de herencia familiar de la ictus en la familia del sujeto).

Como se usa en el presente documento, la expresión “función cognitiva” se refiere, en general, a la capacidad para pensar, razonar, concentrarse o recordar. En consecuencia, la expresión “disminución de la función cognitiva” se refiere al deterioro o falta de capacidad para pensar, razonar, concentrarse o recordar.

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” (o “anticuerpos”) se refiere a cualquier inmunoglobulina que se une específicamente a un determinante antigénico y que se une específicamente a proteínas idénticas o estructuralmente relacionadas con el determinante antigénico que estimuló su producción. Por tanto, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos para detectar el antígeno que estimuló su producción. Los anticuerpos monoclonales derivan de un único clon de linfocitos B (es decir, células B) y, en general, son de estructura homogénea y con especificidad antigénica. Los anticuerpos policlonales proceden de muchos clones diferentes de células productoras de anticuerpos y, por tanto, son heterogéneos en su estructura y especificidad de epítipo, pero todos reconocen el mismo antígeno. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales y policlonales se usan como preparaciones en bruto, mientras que en las realizaciones preferidas estos anticuerpos se purifican. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usan los anticuerpos policlonales contenidos en antisuero bruto. Asimismo, se pretende que el término “anticuerpo” abarque cualquier inmunoglobulina (p. ej., IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.) obtenida de cualquier fuente (p. ej., seres humanos, roedores, primates no humanos, lagomorfos, caprinos, morfinos, equinos, ovinos etc.).

Como se usa en el presente documento, los términos “autoanticuerpos” o “autoanticuerpos” se refieren a cualquier inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno que sea nativo para el organismo huésped que produjeron el anticuerpo (es decir, el antígeno está dirigido contra los antígenos “propios”. La presencia de autoanticuerpos se denomina en el presente documento “autoinmunidad”).

Como se usa en el presente documento, el término “antígeno” se refiere a cualquier sustancia que pueda ser reconocida por un anticuerpo. Se pretende que este término abarque cualquier antígeno e “inmunógeno” (es decir, una sustancia que induce la formación de anticuerpos). Por tanto, en una reacción inmunogénica, los anticuerpos se producen en respuesta a la presencia de un antígeno o porción de un antígeno. Los términos “antígeno” e “inmunógeno” se usan para hacer referencia a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Se pretende que los términos antígeno e inmunógeno abarquen moléculas proteicas o porciones de moléculas proteicas que contienen uno o más epítopos. En muchos casos, los antígenos son también inmunógenos, por tanto, el término “antígeno” a menudo se usa de forma intercambiable con el término “inmunógeno”. En algunas realizaciones preferidas, sustancias inmunogénicas se usan como antígenos en ensayos para detectar la presencia de anticuerpos adecuados en el suero de un animal inmunizado.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “fragmento antigénico” y “porción de un antígeno” y similares se usan en referencia a una porción de un antígeno. Los fragmentos antigénicos o porciones normalmente varían en tamaño, desde un pequeño porcentaje de todo el antígeno hasta un gran porcentaje, pero el 100 %, del antígeno. No obstante, en citaciones en las que se especifica al menos una porción de un antígeno, se contempla que también está presente todo el antígeno (p. ej., no se pretende que la muestra analizada contenga solo una porción de un antígeno). En algunas realizaciones, los fragmentos antigénicos y/o porciones de los mismos comprenden un “epítipo” reconocido por un anticuerpo, mientras que en otras realizaciones estos fragmentos y/o porciones no comprenden un epítipo reconocido por un anticuerpo. Además, en algunas realizaciones, los fragmentos antigénicos y/o porciones no son inmunogénicos, mientras que en realizaciones preferidas los fragmentos antigénicos y/o porciones son inmunogénicos.

Las expresiones “determinante antigénico” y “epítipo”, como se usan en el presente documento, se refieren a la porción del antígeno que entra en contacto con una región variante de un anticuerpo concreto. Cuando una proteína o fragmento (o porción) de una proteína se usa para inmunizar un animal huésped, es probable que numerosas regiones de la proteína induzcan la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada o estructura tridimensional sobre la proteína (estas regiones /o estructuras se denominan “determinantes antigénicos”). En algunos contextos, los determinantes antigénicos compiten con el antígeno intacto (es decir, el “inmunógeno” usado para producir la respuesta inmunitaria) para unirse a un anticuerpo.

Las expresiones “unión específica” y “que se une específicamente”, cuando se usan en referencia a la interacción entre un anticuerpo y un antígeno, describen una interacción que depende de la presencia de una estructura

concreta (es decir, el determinante antigénico o epítipo) sobre el antígeno. En otras palabras, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica única para el antígeno, en lugar de unirse a todas las proteínas en general (es decir, unión inespecífica).

5 Como se usa en el presente documento, “inmunoensayo” se refiere a cualquier ensayo que usa al menos un anticuerpo específico para la detección o cuantificación de un antígeno. Los inmunoensayos incluyen, entre otros, transferencias de tipo Western, ELISA, radioinmunoensayos y ensayos de inmunofluorescencia.

10 Las expresiones, “transferencia de tipo Western” “inmunotransferencias de tipo Western” y “Western” se refiere al análisis inmunológico de proteína(s), polipéptidos o péptidos que se han inmovilizado sobre un soporte de membrana. Las proteínas se resuelven primero mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (es decir, SDS-PAGE) para separar las proteínas, seguido de transferencia de la proteína del gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nylon. Después, las proteínas inmovilizadas se exponen a un anticuerpo que tiene reactividad contra un antígeno de interés. La unión del anticuerpo (es decir, al anticuerpo primario) se detecta mediante el uso de un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario. Normalmente, el anticuerpo secundario se conjuga con una enzima que permite la visualización del complejo antígeno-anticuerpo mediante la producción de un producto de la reacción coloreado o cataliza una reacción enzimática luminiscente (p. ej., el reactivo ECL, Amersham).

20 Como se usa en el presente documento, el término ELISA se refiere a un ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (EIA). En la técnica se conocen numerosos procedimientos y aplicaciones de ELISA y se describen en muchas referencias (véase, por ejemplo, Crowther, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA),” in Molecular Biomethods Handbook, Rapley y col. (eds.), pp. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N.J. (1998); Harlow y Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, Ch. 11, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)). Además, hay numerosos sistemas de ensayo ELISA comercialmente disponibles.

25 Como se usa en el presente documento, las expresiones “reactivo indicador”, “molécula indicadora”, “sustrato de detección” y “reactivo de detección” se usan en referencia a los reactivos que permiten la detección y/o cuantificación de un anticuerpo unido a un antígeno. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el reactivo indicador es un sustrato colorimétrico para una enzima que se ha conjugado a un anticuerpo. Además de un sustrato adecuado para el conjugado anticuerpo-enzima tiene como resultado la producción de una señal colorimétrica o fluorimétrica (p. ej., tras la unión del anticuerpo conjugado al antígeno de interés). Otros reactivos indicadores incluyen, entre otros, compuestos radioactivos. Esta definición también abarca el uso de compuestos basados en biotina y en avidina (p. ej., incluidos, entre otros, neutravidina y estreptavidina) como parte del sistema de detección.

30 Como se usa en el presente documento, el término “señal” se usa generalmente en referencia a cualquier procedimiento detectable que indique se ha producido una reacción, por ejemplo la unión de anticuerpo al antígeno. Se contempla que las señales en forma de radioactividad, productos/reactivos fluorimétricos o colorimétricos encontrarán utilidad con la presente invención. En varias realizaciones de la presente invención, la señal se evalúa de forma cualitativa, mientras que en realizaciones alternativas, la señal se evalúa de forma cuantitativa.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “soporte sólido” se usa en referencia a cualquier sólido o material inmóvil al que se unen reactivos tales como anticuerpos, antígenos u otros componentes de ensayo. Por ejemplo, en un procedimiento de ELISA, los pocillos de las placas de microtitulación proporcionan soportes sólidos. Otros ejemplos de soportes sólidos incluyen portaobjetos de microscopio, cubreobjetos, perlas, partículas matraces de cultivo celular, así como otros muchos elementos adecuados.

Como se usa en este documento, la expresión “que caracteriza tejido en un sujeto” se refiere a la identificación de una o más propiedades de una muestra tisular. En algunas realizaciones, los tejidos se caracterizan mediante la identificación de la expresión, o falta de la misma, de varios genes descritos con detalle en el presente documento.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión “reactivo(s) capaces de detectar específicamente expresión génica” se refiere a los reactivos capaces de o suficientes para detectar la expresión de varios genes descritos con detalle en el presente documento (p. ej., incluidos, entre otros, SelW, Sepn1, SelR, Sod2, Dio2, Glo1, Phb, Lhx8, TGF-β2, Neurog3, Spry2, Gstt2, Gstt1, Gsta3, Gsta4, Gstm1, Gstm2, o Gstm3, C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma, CORS-26, catepsina B, catepsina D, catepsina Z, catepsina O, nicastrina, presenilina 1, presenilina 2, calsenilina, Apbb1/Fe65, Aplp 1, Apba1, Gstp1, Gstz1, Gstm7, Gadd45glp, Gadd45b). Ejemplos de reactivos adecuados incluyen, entre otros, sondas de ácido nucleico capaces de hibridar específicamente con ARNm o ADNc, y anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales o policlonales).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una composición (p. ej., que comprende selenio, por ejemplo Sel-Plex) suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende que esté limitada a una formulación o vía de administración concreta.

55 Como se usa en el presente documento, los términos “administración” y “que administra” se refieren a la acción de dar un fármaco, profármaco u otro agente o tratamiento terapéutico (p. ej., composiciones de la presente invención)

a un sujeto (p. ej., un sujeto o células, tejidos y órganos in vivo, in vitro o ex vivo). Ejemplos de vías de administración al cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (tópica o transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalación), mucosa oral (bucal), oído, rectal, vaginal, mediante inyección (p. ej., por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal etc.) y similares.

5 Como se usa en el presente documento, los términos “coadministración” y “que coadministra” se refieren a la administración de al menos dos agentes (p. ej., composición que comprende Sel-Plex y uno o más agentes adicionales, por ejemplo un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer o una segunda forma de selenio) o terapias a un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias usadas pueden variar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la dosificación adecuada para la coadministración. En algunas realizaciones, cuando los agentes o terapias se coadministran, los respectivos agentes o terapias se administran a dosis menores que las adecuadas para su administración en monoterapia. Por tanto, la coadministración es especialmente deseable en las realizaciones en las que la coadministración de los agentes o terapias disminuye la dosis requerida de un agente(s) potencialmente dañino (p. ej., tóxico) y/o cuando la coadministración de dos o más agentes tiene como resultado la sensibilización de un sujeto a los efectos beneficiosos de uno de los agentes mediante coadministración del otro agente.

20 Como se usa en el presente documento, el término “tratamiento”, o sus equivalentes gramáticos, abarcan la mejora y/o inversión de los síntomas de enfermedad (p. ej., enfermedad neurodegenerativa). Un compuesto que produce una mejora en cualquier parámetro asociado con la enfermedad cuando se usa en los procedimientos de detección selectiva de la presente invención puede identificarse de este modo como un compuesto terapéutico. El término “tratamiento” se refiere a tratamiento profiláctico y/o terapéutico o medidas preventivas. Por ejemplo, los que se pueden beneficiar del tratamiento con composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen aquéllos con una enfermedad y/o trastorno (p. ej., enfermedad neurodegenerativa, diabetes o falta o pérdida de la función cognitiva), así como aquéllos en los que una enfermedad y/o trastorno se va a prevenir (p. ej., usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “en riesgo de enfermedad” se refiere a un sujeto (p. ej., un ser humano) que está predisuesto a experimentar una enfermedad concreta. Esta predisposición puede ser genética (p. ej., una tendencia genética concreta a experimentar la enfermedad, tal como trastornos hereditarios) o debido a otros factores (p. ej., edad, peso, condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales presentes en el ambiente etc.). Por tanto, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún riesgo concreto ni se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna enfermedad concreta.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “que sufre enfermedad” se refiere a un sujeto (p. ej., un ser humano) que está experimentando una enfermedad concreta. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún signo o síntoma concreto ni a ninguna enfermedad concreta. Por tanto, se pretende que la presente invención abarca sujetos que estén experimentando cualquier gama de enfermedades (p. ej., desde manifestación subclínica hasta la enfermedad en toda su amplitud), en la que el sujeto exhibe al menos algunos de los indicios (p. ej., signos y síntomas) asociados con la enfermedad concreta.

40 Como se usa en el presente documento, los términos “enfermedad” y “afección patológica” se usan de forma intercambiable describir un estado, signos y/o síntomas que estén asociados con cualquier alteración del estado normal de un animal vivo o de cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el funcionamiento de las funciones normales, y puede ser una respuesta a factores ambientales (tales como malnutrición, riesgos industriales o clima), a agentes infecciosos específicos (tales como gusanos, bacterias o virus), a defectos inherentes del organismo (tal como varias anomalías genéticas) o a combinaciones de estos y otros factores.

45 El término “compuesto” se refiere a cualquier entidad química, sustancia farmacéutica, fármaco y similares que se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad, patología, afección o trastorno de la función corporal. Los compuestos comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Se puede determinar que un compuesto es terapéutico mediante detección selectiva usando procedimientos de detección selectiva de la presente invención. Un “compuesto terapéutico conocido” se refiere a un compuesto terapéutico que se ha demostrado (p. ej., mediante ensayos con animales o experiencia previa con administración a seres humanos) que es eficaz en dicho tratamiento. En otras palabras, un compuesto terapéutico no está limitado a un compuesto eficaz en el tratamiento de enfermedad (p. ej., enfermedad neurodegenerativa).

55 Como se usa en el presente documento, el término “kit” se usa en referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla que el kit puede incluir reactivos, tales como nutrientes y fármacos, así como medios de administración. No se pretende que el término “kit” esté limitado a una combinación concreta de reactivos y/u otros materiales.

Como se usa en el presente documento, el término “tóxico” se refiere a cualquier efecto perjudicial o dañino en un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración del tóxico.

Como se usa en el presente documento, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a la combinación de un agente activo (p. ej., composición que comprende Sel-Plex) con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

- 5 Las expresiones “farmacéuticamente aceptable” o “o farmacológicamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas, por ejemplo reacciones tóxicas, alérgicas o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término “tópicamente” se refiere a la aplicación de las composiciones de la presente invención a la superficie de la piel y las células y tejidos mucosos (p. ej., mucosa alveolar, bucal, lingual, masticatoria o nasal, y otros tejidos y células que revisten órganos huecos o cavidades corporales).

- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, incluidos, entre otros, solución salina taponada con fosfato, agua, emulsiones (p. ej., tal como emulsiones de aceite/agua o agua/aceite) y varios tipos de agentes humectantes, cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, laurilsulfato sódico, agentes retardantes isotónicos y de la absorción, disgregantes (p. ej., almidón de patata o glicolato de almidón sódico), y similares. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Por ejemplo, vehículos, estabilizantes y adyuvantes. (Véase por ejemplo, Martin, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975)).

- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier sal (p. ej., obtenido mediante reacción con un ácido o una base) o un compuesto de la presente invención que es fisiológicamente tolerado en el sujeto diana (p. ej., un sujeto mamífero y/o células, tejidos y órganos *in vivo* o *ex vivo*). Las “sales” de los compuestos de la presente invención pueden derivar de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos. Ejemplos de ácidos incluyen, entre otros, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico y similares. Otros ácidos, tales como el oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como compuestos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos de bases incluyen, entre otras, hidróxidos de metales alcalinos (p. ej., sodio), hidróxidos de metales alcalino térreos (p. ej., magnesio), amoníaco y compuestos de fórmula  $NW_4^+$ , en la que W es alquilo  $C_{1-4}$ , y similares.

- 30 Ejemplos de sales incluyen, entre otras: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención combinados con un catión adecuado, tal como  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  y  $NW_4^+$  (en la que W es un grupo alquilo  $C_{1-4}$ ) y similares. Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de la presente invención se contemplan como farmacéuticamente aceptables. No obstante, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar utilidad en, por ejemplo, la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de la presente invención se contemplan como farmacéuticamente aceptables. No obstante, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar utilidad en, por ejemplo, la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión “molécula de ácido nucleico” se refiere a cualquier molécula que contiene ácido nucleico, incluidos ARN o ADN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN, incluidos, entre otros, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, seudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster etílico de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, seudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

- 55 El término “gen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico (p. ej., ADN), que comprende secuencias de codificación necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (p. ej., ARN<sub>r</sub>, ARN<sub>t</sub>). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia de codificación de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia de codificación siempre se conserven la actividad deseada o las propiedades funcionales (p. ej., actividad

enzimática, unión del ligando, transducción de la señal, inmunogenicidad etc.) de I longitud completa o del fragmento. El término también abarca la región de codificación de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región de codificación en los extremos tanto 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cualquier extremo de modo que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región de codificación y presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas en 3' o cadena abajo de la región de codificación y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región de codificación interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcribe a ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores, como los potenciadores. Los intrones se eliminan o "cortan" del transcrito nuclear o primario; por tanto, los intrones no están en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u ordenar los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "expresión génica" y "expresión" se refieren al proceso de convertir la información genética codificada en un gen en ARN (p. ej., ARNm, ARNr, ARNt o ARNsn) mediante la "transcripción" del gen (es decir, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa) y para genes de codificación de proteínas, en la proteína mediante la "traducción" del ARNm. La expresión génica se puede regular en muchas etapas del proceso. La "regulación por aumento" o "activación" se refiere a la regulación que aumenta y/o potencia la producción de los productos de expresión génica (p. ej., ARN o proteína), mientras que la "regulación por disminución" o "represión" se refieren a la regulación que disminuye la producción. Las moléculas (p. ej., factores de transcripción) que están implicadas en la regulación por aumento o la regulación por disminución a menudo se denominan "activadores" y "represores", respectivamente.

Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas en ambos extremos, 5' y 3', de las secuencias presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se localizan en 5' o 3' de las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARN.). La región flanqueante en 5' puede contener secuencias reguladoras, tales como promotores y potenciadores, que controlen o influyan sobre la transcripción del gen. La región flanqueante en 3' puede contener secuencias que dirijan la terminación de la transcripción, la escisión postranscripcional y la poliadenilación.

La expresión "de tipo silvestre" se refiere a un gen o producto génico aislado de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es el que se observa más frecuentemente en una población y, por lo tanto, se denomina arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen. Por el contrario, el término "modificado" o "mutante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico de tipo silvestre. Cabe destacar que se pueden aislar mutantes de origen natural; los mismos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas (incluidas secuencias de ácido nucleico alteradas) cuando se compararon con el gen o producto génico de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de ácido nucleico codificante", "secuencia de ADN codificante" y "ADN codificante" se refieren a el orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una hebra de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteína). Por tanto, la secuencia de ADN codifica la secuencia de aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" y "polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" significan una secuencia de ácido nucleico que comprende la región de codificación de un gen o, en otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico. La región de codificación puede estar presente en una forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario (es decir, la hebra sentido) o bicatenario. Elementos de control adecuados, tales como potenciadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación etc., pueden colocarse cerca de la región de codificación del gen si es necesario para permitir el inicio adecuado de la transcripción y/o el correcto procesamiento del transcrito de ARN primario. Como alternativa, la región de codificación usada en los vectores de expresión de la presente invención puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de corte y empalme, secuencias intermedias, señales de poliadenilación etc., o una combinación de elementos de control tanto endógenos como exógenos.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una cadena polinucleotídica monocatenaria de longitud corta. Normalmente, los oligonucleótidos tienen 200 residuos de longitud (p. ej., entre 15 y 100), no obstante, como se usan en el presente documento, el término también pretende abarcar cadenas polinucleotídicas más largas. A menudo se hace referencia a los oligonucleótidos por su longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido de 24 residuos se denomina un "24-mer". Los oligonucleótidos pueden formar estructuras secundarias y terciarias mediante autohibridación o mediante hibridación con otros polinucleótidos. Dichas estructuras pueden incluir, entre otras, dúplex, horquillas, cruces, estructuras dobladas y triples.

Como se usa en el presente documento, los términos “complementario” o “complementariedad” se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia 5'-A-G-T-3'" es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'." La complementariedad puede ser “parcial”, en la que sólo algunas de las bases nucleotídicas están apareadas de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O puede haber complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre hebras de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

El término “homología” se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una molécula de ácido nucleico que inhibe al menos parcialmente la hibridación de una molécula de ácido nucleico completamente complementaria con un ácido nucleico diana que es “sustancialmente homólogo”. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana se puede analizar usando un ensayo de hibridación (de transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de rigurosidad baja. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga a una diana en condiciones de rigurosidad baja. Cabe mencionar que las condiciones de rigurosidad baja son tales que se permita la unión inespecífica; las condiciones de rigurosidad baja requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión inespecífica puede analizarse mediante el uso de una segunda diana que es sustancialmente no complementaria (p. ej., una identidad de aproximadamente el 30 %); en ausencia de unión inespecífica, la sonda no hibridará con la segunda diana no complementaria.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico bicatenario, tal como un ADNc o clon genómico, la expresión “sustancialmente homólogo” se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con una o ambas hebras de la secuencia de ácido nucleico bicatenario en condiciones de baja rigurosidad, como se ha descrito anteriormente.

Un gen puede producir múltiples especies de ARN que se generan mediante corte y empalme diferencial del transcrito de ARN primario. Los ADNc que son variantes de corte y empalme del mismo gen contendrán regiones de identidad de secuencia u homología completa (que representan la presencia del mismo exón o porción del mismo exón sobre ambos ADNc) y regiones de no identidad completa (por ejemplo, que representan la presencia del exón “A” sobre el ADNc 1 en el que el ADNc2 contiene el exón “B” en su lugar). Dado que los dos ADNc contienen regiones de identidad de secuencia, ambos hibridarán con una sonda que proceda de todo el gen o de porciones del gen que contienen secuencias encontradas en ambos ADNc; las dos variantes de corte y empalme son, por tanto, sustancialmente homólogas a dicha sonda y entre sí.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico monocatenario, la expresión “sustancialmente homólogo” se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar (es decir, es la complementaria de) con la secuencia de ácido nucleico bicatenario en condiciones de baja rigurosidad, como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término “hibridación” se usa con referencia al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) están influidas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas y la T<sub>m</sub> del híbrido formado y la proporción G:C dentro de los ácidos nucleicos. Se dice que una molécula sencilla que contiene apareamiento de ácidos nucleicos complementarios dentro de su estructura se “autohibrida”.

Como se usa en el presente documento, el término “T<sub>m</sub>” se usa con referencia a la “temperatura de fusión”. La temperatura de fusión es la temperatura a la que la población de moléculas de ácido nucleico bicatenario se disocia a la mitad en hélices únicas. La ecuación para calcular la T<sub>m</sub> de ácidos nucleicos. Como se indica por referencias convencionales, una estimación simple del valor T<sub>m</sub> se puede calcular con la ecuación:  $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$ , cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a NaCl 1 M (véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization (1985). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características estructurales, así como características de secuencia para el cálculo de T<sub>m</sub>.

Como se usa en el presente documento, el término “rigurosidad” se usa con referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y presencia de otros compuestos, tales como disolventes orgánicos, en las que se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. En “condiciones de rigurosidad baja”, una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará con su complementaria exacta, secuencias con apareamientos erróneos de una sola base, secuencias estrechamente relacionadas (p. ej., secuencias con una homología del 90 % o mayor) y secuencias que solo tienen homología parcial (p. ej., secuencias con una homología del 50-90 %). En “condiciones de rigurosidad media”, una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará solo con su complementaria exacta, secuencias con apareamientos erróneos de una sola base y secuencias de relación estrecha (p. ej., con una homología del 90 % o mayor). En “condiciones de rigurosidad alta”, una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará solo con su complementaria exacta y (dependiendo de condiciones tales como la temperatura) secuencias con apareamientos erróneos de una sola base. En otras palabras, en condiciones de rigurosidad alta, la temperatura

se puede elevar de modo que se excluya la hibridación con las secuencias con apareamientos erróneos de una sola base.

5 "condiciones de rigurosidad alta", cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5 % de SDS, 5X reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón seguido de lavado en una solución que comprende 0,1X SSPE, 1,0 % SDS a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

10 "Condiciones de rigurosidad media", cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos, comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5 % de SDS, 5X reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN desnaturalizado de esperma de salmón seguido de lavado en una solución que comprende 1,0X SSPE, 1,0 % SDS a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

15 "Condiciones de rigurosidad baja" comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,1 % SDS, 5X reactivo de Denhardt (50X reactivo de Denhardt contiene por 500 ml: 5 g de Ficoll (Tipo400, Pharamcia), 5 g de BSA (Fracción V; Sigma) y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una solución que comprende 5X SSPE, 0,1 % SDS a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

20 En la técnica se sabe que se pueden emplear numerosas condiciones equivalentes para comprender condiciones de rigurosidad baja; se consideran factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición en bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición en bases, presente en solución o inmovilizados etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (p. ej., la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la solución de hibridación se puede variar para generar condiciones de hibridación de rigurosidad baja diferentes, pero equivalentes, de las condiciones enumeradas anteriormente. Además, en la técnica se conocen condiciones que estimulan la hibridación en condiciones de rigurosidad alta (p. ej., incrementar la temperaturas de la hibridación y/o etapas de lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación etc.) (véase la definición anterior de "rigurosidad").

30 Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se introduce en las condiciones en las que la síntesis de un producto de extensión del cebador, que es complementario a una hebra de ácido nucleico, se induce, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. Preferentemente, el cebador es monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación, pero, como alternativa, puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar las hebras antes de usar para preparar productos de extensión.

35 Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo bastante largo como para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluidos la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento.

40 Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sean naturales como en un digesto de restricción purificado, o producidos de forma sintética, de forma recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser bicatenaria o monocatenaria. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas concretas. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención esté marcada con cualquier "molécula indicadora", de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección,

45 incluidos, entre otros, enzimas (p. ej., ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), sistemas fluorescentes, radioactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema de detección o marcador concreto.

50 El término "aislado", cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" o "polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un componente o contaminante con el que normalmente se asocia en su forma natural. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o contexto que es diferente del que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, presentes en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN diana (p. ej., un gen) se encuentra en los cromosomas de células huésped en proximidad a los genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARN, específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con otros numerosos ARN, que codifican una multitud de proteínas. No obstante, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína dada incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que habitualmente expresan la proteína dada cuando el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales o, por otro lado, está flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente de la encontrada en la naturaleza. El ácido nucleico

60 oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando un

ácido nucleico oligonucleótido o polinucleótido aislado se va a usar para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la hebra sentido o de codificación (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener las hebras sentido y antisentido (Es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

5 Como se usa en este documento, el término “purificado” o “para purificar” se refiere a la eliminación de componentes (p. ej., contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos se purifican mediante eliminación de proteínas no inmunoglobulínicas contaminantes; también se purifican mediante eliminación de inmunoglobulina que no se une a la molécula diana. La eliminación de proteínas no inmunoglobulínicas y/o la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a la molécula diana tienen como resultado un incremento en el porcentaje de las inmunoglobulinas reactivas a la diana en la muestra. En otro ejemplo, los polipéptidos recombinantes se expresan en células huésped bacterianas y los polipéptidos se purifican mediante la eliminación de proteínas de célula huésped; de este modo se incrementa el porcentaje los de polipéptidos recombinantes en la muestra.

10 Como se usa en el presente documento, el término “vector” se usa con referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento(s) de ADN de una célula a otra. El término “vehículo” se usa, en ocasiones, de forma intercambiable con “vector”. A menudo los vectores derivan de plásmidos, bacteriófagos o virus de plantas o de animales.

15 La expresión “vector de expresión”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia de codificación deseada y secuencias de ácido nucleico adecuadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación unida operablemente en un organismo huésped concreto. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas normalmente incluyen un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión al ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación y de terminación.

20 El término “transfección”, como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de ADN extraño en células eucariotas. La transfección se puede acompañar de varios medios conocidos en la técnica, incluidos coprecipitación de fosfato cálcico-ADN, transfección mediada por DEAE dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección con retrovirus y biolística.

25 La expresión “transfección estable” o “transfeccionado de forma estable” se refiere a la introducción e integración de ADN extraño en el genoma de la célula transfeccionada. La expresión “transfectante estable” se refiere a una célula que ha integrado de forma estable el ADN extraño en el ADN genómico.

30 La expresión “transfección transitoria” o “transfeccionado de forma transitoria” se refiere a la introducción de ADN extraño en una célula en la que el ADN extraño no se integra en el genoma de la célula transfeccionada. El ADN extraño se queda en el núcleo de la célula transfeccionada durante varios días. Durante este tiempo, el ADN extraño está sujeto a los controles reguladores que gobiernan la expresión de genes endógenos en los cromosomas. La expresión “transfectante transitorio” se refiere a una célula que han captado ADN extraño pero que han integrado este ADN.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “marcador seleccionable” se refiere al uso de un gen que codifica una actividad enzimática que confiere la capacidad de crecer en medio que carece de lo que, de otro modo, sería un nutriente esencial (p. ej., el gen HIS3 en células de levadura), además, un marcador seleccionable puede conferir resistencia a un antibiótico o fármaco a la célula en la que se expresa el marcador seleccionable. Los marcadores seleccionables pueden ser “dominantes”; un marcador seleccionable dominante codifica una actividad enzimática que se puede detectar en cualquier línea celular eucariota. Ejemplos de marcadores seleccionables dominantes incluyen el gen de la aminoglicósido 3' transferasa bacteriana (también denominado el gen neo) que confiere resistencia al fármaco G418 en células de mamífero, el gen de la higromicina G fosfotransferasa (hyg) bacteriana que confiere resistencia al antibiótico higromicina y el gen de la xantina-guanina fosforibosiltransferasa bacteriana (también denominado el gen gpt) que confiere la capacidad para crecer en presencia de ácido micofenólico. Otros marcadores seleccionables no son dominantes en cuanto a que su uso debe ser junto con una línea celular que carece de la actividad enzimática relevante. Ejemplos de marcadores seleccionables no dominantes incluyen el gen de la timidina quinasa (tk) que se usa junto con las líneas celulares tk, el gen CAD que se usa junto con células deficientes en CAD y el gen de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (hprt) de mamífero que se usa junto con las líneas celulares hprt. Una revisión del uso de marcadores seleccionables en líneas celulares de mamífero se proporciona en Sambrook, J. y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) pág.16.9-16.15.

40 Como se usa en la presente memoria, la expresión “cultivo celular” se refiere a cualquier cultivo de células in Vitro. Incluidas en esta expresión se encuentran las líneas celulares contiguas (p. ej., con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (p. ej., células no transformadas) y cualquier otra población celular mantenida in Vitro.

45 Como se usa en el presente documento, el término “eucariota” se refiere a organismos distinguibles de “procariotas”.

Se pretende que el término abarque todos los organismos con células que exhiben las características habituales de los eucariotas, tales como la presencia de un núcleo verdadero unido por una membrana nuclear, dentro del cual están los cromosomas, la presencia de orgánulos unidos a la membrana y otras características observadas habitualmente en los organismos eucariotas. Por tanto, el término incluye, entre otros, organismos tales como hongos, protozoos y animales (p. ej., seres humanos).

Como se usa en el presente documento, el término "in Vitro" se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un ambiente artificial. Los ambientes in Vitro pueden consistir en, entre otros, tubos de ensayo y cultivo celular. El término "in vivo" se refiere al ambiente natural (p. ej., un animal o una célula) y a procesos o reacciones que se producen dentro de un ambiente natural.

Las expresiones "compuesto de ensayo" y "compuesto candidato" se refieren a cualquier entidad química, sustancia farmacéutica, fármaco y similares que es un candidato para usar para tratar o prevenir una enfermedad, patología, afección o trastorno de la función corporal (p. ej., enfermedad de Alzheimer, ELA, enfermedad de Parkinson etc.). Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Se puede determinar que un compuesto de ensayo es terapéutico mediante detección selectiva usando procedimientos de detección selectiva de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se usa en su sentido más amplio. En un sentido, se pretende incluir un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas se pueden obtener de animales (incluidos seres humanos) y abarcan fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos sanguíneos, tales como plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental, tal como materia de superficie, suelo, agua, cristales y muestras industriales. No obstante, estos ejemplos no se tienen que considerar como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención.

La expresión "ARN de interferencia" o "ARNi" se refiere a la silenciación o disminución de la expresión génica por parte de ARNsi. Es el proceso de silenciación génica específica de secuencia postranscripcional en animales y plantas, iniciado por ARNsi homólogo en su región dúplex a la secuencia del gen silenciado. El gen puede ser endógeno o exógeno al organismo, estar presente integrado en un cromosoma o presente en un vector de transcripción que no está integrado en el genoma. La expresión del gen se inhibe completa o parcialmente. El ARNi también se puede considerar que inhibe la función de un ARN diana; la función del ARN diana puede ser completa o parcial.

El término "ARNsi" se refiere a ARN de interferencia cortos. En algunas realizaciones, los ARNsi comprenden una región dúplex, o bicatenaria, de aproximadamente 18-25 nucleótidos de longitud; a menudo los ARNsi contienen de aproximadamente dos a cuatro nucleótidos sin aparear en el extremo 3' de cada hebra. Al menos una hebra de la región dúplex o bicatenaria de un ARNsi es sustancialmente homóloga a o sustancialmente complementaria a una molécula de ARN diana. La hebra complementaria a una molécula de ARN diana es la "hebra antisentido". La hebra homóloga a la molécula de ARN diana es la "hebra sentido" y también es complementaria a la hebra antisentido del ARNsi. Los ARNsi pueden también contener secuencias adicionales; ejemplos no limitantes de dichas secuencias incluyen secuencias de unión, o bucles, así como una estructura troncal y otras plegadas. Los ARNsi parecen funcionar como intermediarios clave en el desencadenamiento del ARN de interferencia en invertebrados y en vertebrados y en el desencadenamiento de la degradación de ARN específica de secuencia durante la silenciación génica postranscripcional en plantas.

La expresión "molécula de ARN diana" se refiere a una molécula de ARN con la que al menos una hebra de la región bicatenaria corta de un ARNsi es homóloga o complementaria. Normalmente, cuando dicha homología o complementariedad es de aproximadamente el 100 %, el ARNsi puede silenciar o inhibir la expresión de la molécula de ARN diana. Aunque se cree que el ARNm procesado es una diana del ARNsi, la presente invención no se limita a ninguna hipótesis concreta, y dicha hipótesis no necesariamente se practican en la presente invención. Por tanto, se contempla que otras moléculas de ARN también pueden ser dianas de ARNsi. Dichas dianas incluyen genomas de ARNm sin procesar, ARN ribosómico y ARN viral.

### **Descripción detallada de la invención**

El selenio es un oligoelemento implicado en la regulación de aspectos de los mecanismos de defensa de antioxidantes en todos los tejidos vivos al interactuar con el glutatión (GSH) del cuerpo y sus principales enzimas antioxidantes que contienen Se, glutatión peroxidasa (GPX) y tioredoxina reductasa (véase, por ejemplo, Goehring y col., J. Anim. Sci. 59, 725-732 (1984); Gerloff y col., J. Anim. Sci. 70, 3934-3940 (1992)). El glutatión y la GPX tienen la capacidad para proteger la integridad de los enlaces insaturados de los fosfolípidos de membrana extinguiendo los ataques de los radicales libres capaces de iniciar y propagar la oxidación de los lípidos (véase, por ejemplo, Meister y Anderson, Annu. Rev. Biochem. 52, 711-760 (1983); Deleve y Kaplowitz, Pharm. Ther. 52, 287-305 (1991); Palmer y Paulson, Nutr. Rev. 55, 353-361 (1997)).

El selenio también se ha asociado con reducción del riesgo de cáncer en estudios epidemiológicos (véase, p. ej., Salonen y col., Am. J. Epidemiol. 120: 342-349 (1984); Willett y col., Lancet 2: 130-134 (1983); Virtamo y col.,

Cancer 60: 145-148 (1987)). Varios compuestos de selenio de origen natural y sintético se ha demostrado que inhiben el desarrollo tumoral en estudios animales en una amplia gama de dosis (véase, por ejemplo, Ip., J. Nutr. 128: 1845-1854 (1998)). Aunque en la mayoría de los estudios se han usado dosis farmacológicas de selenio (>2 mg/kg) en quimioprevención del cáncer (véase, p. ej., Ip., J. Nutr. 128: 1845-1854 (1998)), también se ha demostrado que la deficiencia de selenio potencia la carcinogénesis mamaria (véase, p. ej., Ip and Daniel, Cancer Res. 45: 61-65 (1985)) y de piel inducido por UVB (véase, p. ej., Pence y col., 102: 759-761 (1994)).

En un reciente ensayo doble ciego y aleatorizado de prevención del cáncer en seres humanos que implica dosis fisiológicas (0,2 mg) de selenio se demostró una reducción de la incidencia de los cánceres de pulmón, próstata e intestinal (véase, por ejemplo, Clark y col., J. Am. Med. Assoc. 276:1957-1963 (1996)).

A pesar de las décadas de investigación en los mecanismos de acción del selenio, se sabe poco o nada sobre otras potenciales dianas del selenio (p. ej., genes o vías reguladoras) y los efectos beneficiosos que podrían proporcionarse a un sujeto a través de la administración de selenio. También se carece de información sobre qué formas de selenio (p. ej., orgánico, inorgánico o ambas) pueden y no pueden usarse para producir estos efectos. Por tanto, sería muy valioso idear varios modos para usar diferentes formas de selenio para beneficiar ciertos sistemas (p. ej., los sistemas nervioso, endocrino y metabólico) de un sujeto (p. ej., un ser humano, bovino u otro mamífero). Además, conocer cómo varias formas de selenio difieren en su capacidad para ejercer efectos sobre un sujeto proporciona la capacidad para personalizar tratamientos para sujetos que padecen, o están en riesgo de padecer, una enfermedad o trastorno, que podrían beneficiarse de dicho tratamiento (p. ej., formas específicas de selenio se pueden usar de forma independiente o con otros agentes conocidos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos).

En consecuencia, la presente solicitud demuestra cómo formas específicas de selenio (p. ej., selenometionina (SeM), selenito sódico (Sod-sel) y Sel-Plex) se pueden usar para beneficiar a un sujeto. En concreto, la presente solicitud demuestra que las composiciones de la presente invención se pueden usar para estabilizar o aumentar la salud general y la función cognitiva de un sujeto. Por ejemplo, como se describe con detalle en el presente documento, la presente solicitud proporciona composiciones y procedimientos que alterna la función celular, de modo que proporciona efectos beneficiosos a múltiples sistemas de un sujeto, incluidos, entre otros, el sistema neurológico, el sistema nervioso, el sistema endocrino, el sistema metabólico y el sistema inmunológico. La presente solicitud proporciona procedimientos de usar selenio con otros agentes para tratar o prevenir enfermedades. Por tanto, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden selenio (p. ej., Sel-Plex) y a procedimientos de usar las mismas como tratamiento terapéutico y/o profiláctico (p. ej., para enfermedades neurodegenerativas, para potenciar la función cognitiva o retrasar la expresión génica asociada con la edad). Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ilustrar múltiples formas por las cuales se pueden usar las composiciones y los procedimientos, con el fin de proporcionar un efecto beneficioso al sujeto.

#### I. Enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención se refiere a la administración de selenio, de forma independiente o en combinación, con uno o más agentes adicionales, para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades neurodegenerativas. La presente invención se refiere a un tratamiento profiláctico que comprende administrar una composición que comprende selenio a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, de modo que se previene la enfermedad neurodegenerativa. La presente invención se refiere a un procedimiento de tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa, que comprende proporcionar a un sujeto un agente usado para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa en combinación con una composición que comprende selenio. Se ha demostrado por primera vez que ciertas formas de selenio pueden ser compatibles con los procedimientos mencionados anteriormente, mientras que otras formas de selenio pueden no serlo. Por tanto, la presente invención se refiere a una o más formas de selenio (p. ej., Sel-Plex y/o Sod-sel) que está biológicamente disponible y se administra solo o se coadministra con un agente usado para el tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, en el que la forma de selenio escoge funciones para tratar o prevenir la enfermedad neurodegenerativa.

La forma de selenio administrada a un sujeto dependerá de la diana (p. ej., un gen) que se quiere tratar. Como demuestra la presente solicitud, la presencia y el nivel de efecto beneficioso obtenido varía en función de la forma de selenio usada (véanse los Ejemplos 2-10). El selenio se puede proporcionar en forma de Sel-Plex o como selenito sódico, como selenometionina o levadura enriquecida con selenio. El selenio se puede proporcionar como selenocisteína o como un compuesto de selenito. El selenio puede estar químicamente unido a un agente (p. ej., un agente usado para tratar una enfermedad neurodegenerativa) para formar un agente derivado de selenio.

Una vez que la forma deseada de selenio se ha escogido, se puede administrar sola o en combinación con uno o más agentes usados para la prevención o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. El agente puede ser uno aprobado por una autoridad reguladora para dicho tratamiento (p. ej., la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. o la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA)). Se contempla que las composiciones de la presente invención son útiles para el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluidas, entre otras, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, ataxias espinocerebelosas, ataxia de Friedreich y distrofia miotónica.

## A. Enfermedad de Alzheimer

Las composiciones de la presente invención se usan en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (EA) es una causa frecuente de demencia, que es una alteración adquirida cognitiva y de la conducta de gravedad suficiente como para interferir marcadamente en el funcionamiento social y laboral.

5 La EA afecta a aproximadamente 5 millones de personas en EE.UU. y a más de 30 millones de personas en todo el mundo. Un número mayor de individuos presentan niveles menores de alteración cognitiva (p. ej., alteración cognitiva mínima) que con frecuencia evoluciona a una demencia completa, de modo que se incrementa el número de personas afectadas. Cabe esperar que la prevalencia de la EA aumente considerablemente durante este siglo porque afecta preferentemente a ancianos, que constituyen el grupo de edad de crecimiento más rápido en muchos países, especialmente en los industrializados. Las proyecciones estadísticas indican que el número de personas afectadas por el trastorno en EE.UU. casi se triplicará para el año 2050.

10 Asimismo, la EA es un problema de salud pública muy importante desde la perspectiva económica. En EE.UU., los costes de los cuidados de pacientes con EA fueron más de 110 billones de dólares al año en ancianos en la década de 1990, y el coste anula medio por paciente es de aproximadamente 45.00 dólares. Dado que estos procedimientos para evaluar los efectos económicos de los trastornos neurodegenerativos todavía no están desarrollados, es probable que esas cifras se hayan subestimado.

15 La anatomo-patología de la EA incluye marañas de neurofibrillas (NFT), placas seniles (SP) a nivel microscópico y atrofia cerebrocortical, que afecta principalmente a las regiones de asociación y, en contrario, al lado interno del lóbulo temporal. Aunque las NFT y las PS son características de la EA, no son patognomónicas. De hecho, muchas otras afecciones neurodegenerativas distintas de la EA se caracterizan por NFT (p. ej., la parálisis supranuclear progresiva, la demencia pugilística) o SP (p. ej., el envejecimiento normal). Por tanto, la mera presencia de estas lesiones no basta para diagnosticar EA. Estas lesiones pueden estar presentes en un número suficiente y en una distribución topográfica característica para cumplir los criterios histopatológicos actuales de la EA.

20 Además de las NFT y las SP, se han reconocido muchas otras lesiones de la EA desde que se publicaron los artículos iniciales sobre Alzheimer. Estos incluyen (1) degeneración granulovacuolar de Shimkowicz; (2) hilos del neurópilo de Braak y col.; y (3) pérdida de neuronas y degeneración sináptica, que se piensa que, en última instancia, median en las manifestaciones cognitivas y conductuales del trastorno.

25 La EA es el trastorno neurodegenerativo más frecuente en todo el mundo. En la EA, las neuronas del hipocampo y la corteza cerebral se pierden de forma selectiva. Los cerebros de individuos con EA manifiestan dos lesiones características: placas de amiloide extracelular (o senil) u marañas de neurofibrillas intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (véase, por ejemplo, Selkoe, *Nature* 426, 900-904 (2003)). Las placas de amiloide contienen pequeños productos de escisión tóxicos (denominados A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42) de la proteína precursora del amiloide (APP). El genotipo de apoE4 (apolipoproteína E4) es un potente factor de riesgo para el desarrollo de la EA y, posiblemente, afecte a la deposición de la proteína  $\beta$ -amiloide(A $\beta$ ) y a la formación de marañas de neurofibrillas (véase, por ejemplo, Roses, *Curr. Opin. Neurol.* 4, 265-270 (1996)). Las mutaciones en tres genes que se heredan según un rasgo autosómico dominante se han relacionado con formas raras familiares de inicio precoz de la EA. Estos genes incluyen los que codifican APP, presenilina 1 (PS1) y presenilina 2 (PS2). Un acontecimiento común en ambos tipos de EA, familiar y esporádica, es el incremento de la producción y acumulación de la proteína  $\beta$ -amiloide tóxica. Esta observación ha llevado a la "hipótesis de la cascada del amiloide" que dice que una producción excesiva de A $\beta$  es la causa principal de la enfermedad.

30 La APP es una proteína de membrana de tipo I y contiene una región extracelular grande, una hélice transmembrana y una cola citoplásmica corta. El A $\beta$  tóxico se origina a partir de la protrólisis intramembrana regulada de la APP por un complejo de secretasas. La primera escisión de la APP está mediada por la  $\beta$ - o  $\alpha$ -secretasa, que libera la mayor parte de la porción extracelular de la APP como dos fragmentos, APPs- $\alpha$  y APPs- $\beta$ , que deja atrás el fragmento en C-terminal unido a la membrana. Esta porción de la APP se escinde después mediante un complejo proteico grande,  $\gamma$ -secretasa, en varios sitios, incluidos los aminoácidos (aa) 711 (A $\beta$ 40) y al menos tres subsitios adicionales en aa713 (A $\beta$ 42), aa714 (A $\beta$ 43) y aa720 (A $\beta$ 49). Varias mutaciones en la APP, tal como la mutación Swedish, se agrupan en los sitios de escisión de la  $\gamma$ -secretasa; estas mutaciones dan como resultado mayores cantidades del péptido A $\beta$  y formación de protofibrillas (véase, por ejemplo, Singleton y col., *Hum. Mol. Genet.* 13 (Spec. no. 1), R123-R126 (2004)).

35 La composición precisa del complejo  $\gamma$ -secretasa todavía no se conoce, pero parece que se requieren presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2), nicastrina, Aph-1 y Pen-2 (véase, por ejemplo, Haas y Steiner, *Trends Cell Biol.* 12, 556-562 (2002); Edbauer y col., *Nat. Cell Biol.* 5,486-488 (2003); Haass, *EMBO J.* 23, 483-488 (2004)). PS1 es un dominio transmembrana de aspartil proteasa que escinde sus sustratos en la región que atraviesa la membrana. Es probable que la PS1 sea responsable de la generación de fragmentos de A $\beta$ . Una proteína adicional implicada es la calsenilina. La Calsenilina se sobreexpresa (p. ej., está regulada por aumento) en las neuronas y los astrocitos en un cerebro afectado por Alzheimer (véase, por ejemplo, Jin y col., *Neuroreport* 16, 451-455 (2005)). La sobreexpresión de calsenilina potencia la actividad de la  $\gamma$ -secretasa, lo que demuestra que la calsenilina es un factor regulador de la  $\gamma$ -secretasa (véase, por ejemplo, Jo y col., *Neurosci Lett.* 378, 59-64 (2005)).

- En la EA familiar rara de inicio precoz se han identificado más de 100 mutaciones de sentido erróneo en PS2 y PS2 (véase, por ejemplo, Hutton y col., *Essays Biochem.* 33, 117-131 (1998)). Los experimentos en cultivos y ratones transgénicos revelan que estas mutaciones dan lugar a un aumento de la producción de A $\beta$  (véase, por ejemplo, Scheuner. y col., *Nat. Med.* 2, 864-870 (1996); Borchelt y col., *Neuron* 19, 939-945 (1997)). Por el contrario, los ratones que carecen de PS2 tienen una menor producción de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 (véase, por ejemplo, De Strooper, y col., *Nature* 391, 387-390 (1998); Naruse, y col., 21, 1213-1221 (1998)), La escisión en C-terminal de la APP por las enzimas caspasas también puede ser necesaria para la toxicidad (véase, por ejemplo, Lu y col., *Nat. Med.* 6, 385-386 (2000)).
- Se han propuesto varios mecanismos sobre como produce su daño el A $\beta$ . Una visión sugiere que las protofibrillas de A $\beta$  activan las microglías, de modo que se induce una respuesta inflamatoria y la liberación de citocinas neurotóxicas. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), incluido el ibuprofeno, retrasan el inicio de la EA (véase, por ejemplo, Stewart y col., *Neurology* 48, 626-632 (1997)). Además, los NSA reducen la producción de A $\beta$ 42 (véase, por ejemplo, Weggen y col., *Nature* 414, 212-216 (2001)).
- En una segunda visión, las protofibrillas de A $\beta$  desencadenan la liberación excesiva de aminoácidos excitatorios como el glutamato a partir de las células de la glía, que pueden dañar las neuronas cercanas por excitotoxicidad. La hiperactivación de los receptores de glutamato del tipo la N-metil-D-aspartato (NMDA) tiene como resultado un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, que activa la óxido nítrico sintasa neuronal y, en consecuencia, genera óxido nítrico (NO). Cuando se genera en exceso, el NO se combina con el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y forma el producto altamente reactivo y neurotóxico peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que conduce a más estrés oxidativo y nitrosativo, en parte mediante lesión mitocondrial. De hecho, los ensayos de fase III positivos con seres humanos del bloqueante no competitivo de canales del receptor de NMDA, memantina, condujeron a la reciente aprobación para el tratamiento de la EA (véase, por ejemplo, Lipton, *Nature* 428, 473 (2004)).
- La transmisión colinérgica y la densidad sináptica disminuyen considerablemente en los pacientes de EA. El mecanismo del daño sináptico se desconoce, pero las formas oligoméricas difundibles del A $\beta$  pueden ser importantes. Es probable que la disfunción sináptica contribuya a la pérdida de memoria y a los déficit cognitivos en la EA. De hecho, los ratones transgénicos APP manifiestan signos celulares, bioquímicos y electrofisiológicos de déficit sinápticos antes de la deposición de A $\beta$ , incluidos los reducidos potenciales postsinápticos excitatorios y la potenciación a largo plazo considerada como una correlación del aprendizaje y la memoria (véase, por ejemplo, Chapman y col., *Nat. Neurosci.* 2, 271-276 (1999)). La inhibición de la  $\gamma$ -secretasa disminuye los déficit de A $\beta$  y LTP (véase, por ejemplo, Walsh y col., *Nature* 416, 535-539 (2002)).
- A $\beta$  puede también participar en los efectos dañinos mediante a unión de metales reactivos redox, que a su vez liberan radicales libres (véase, por ejemplo, Bush y col., *J. Biol. Chem.* 268, 16109-16112 (1993); Bush y col., *Science* 265, 1464-1467 (1994); Lovell y col., *J. Neurol. Sci.* 158, 47-52 (1998); Dong y col., *Biochemistry* 42, 2768-2773 (2003); Opazo y col., *J. Biol. Chem.* 277, 40302-40308 (2002); Bush y col., *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17, 147-150 (2003); 36 Huang y col., *Biochemistry* 38, 7609-7616 (1999)). La quelación del cinc y el cobre proporciona efectos neuroprotectores (véase, por ejemplo, Bush, *Aging* 23, 1031-1038 (2002)). Por ejemplo, el clioquinol (CQ), un antibiótico que también quela el cinc y el cobre, atraviesa la barrera hematoencefálica, disminuye la deposición de A $\beta$  en el cerebro y mejora el aprendizaje en ratones transgénicos APP mutantes (véase, por ejemplo, Cherny y col., *Neuron* 30, 665-676 (2001)).
- En EE.UU. se ha estimado que el riesgo durante la vida de sufrir AE es 1:4-1:2. Más del 14 % de los individuos mayores de 65 años de edad tienen EA y la prevalencia aumenta hasta al menos el 40 % en individuos mayores de 80 años. Se han notificado prevalencias similares a las de EE.UU. en los países industrializados. Los países que experimentan rápidos incrementos en los segmentos de ancianos en su población tienen índices que se acercan a los de EE.UU.
- La EA afecta tanto a mujeres como a varones. Muchos estudios indican que el riesgo de EA es significativamente mayor en mujeres que en varones. Algunas autoridades han postulado que esta diferencia se debe a la pérdida del efecto neurotrópico de los estrógenos en mujeres posmenopáusicas. Otros factores también pueden afectar a esta diferencia relativa.
- Generalmente, la EA se diagnostica por los síntomas cognitivos. Al evaluar la EA, las RM o las TAC muestran atrofia cerebelar y/o cortical difusa. Estos estudios también se usan para descartar otra enfermedad del SNC. Los ensayos de EEG y la proteína tau también se usan para confirmar el diagnóstico y descartar otras enfermedades que producen demencia.
- La piedra angular de la terapia de la EA es el uso de inhibidores de la colinesterasa de acción central para paliar la depleción de ACh en la corteza cerebral y el hipocampo. Dado que se cree que las manifestaciones clínicas de la EA se deben parcialmente a una pérdida de la innervación colinérgica en la corteza cerebral, se han desarrollado compuestos para paliar el defecto colinérgico interfiriendo en la degradación de la ACh por la AChE, la forma sináptica (o específica) de la colinesterasa. Algunos de los compuestos disponibles más recientemente son sustancias que también inhiben las colinesterasas no sinápticas (o inespecíficas), que con frecuencia se denominan BuChE

Los inhibidores de la ACHE aprobados por la FDA para usar en etapas tempranas e intermedias de la EA son tacrina (Cognex), donepezil (Aricept), rivastigmina (Exelon) y galantamina (galantamina, Reminyl). Entre estos, solo tacrina y rivastigmina también inhiben la BuChE. Esto puede ser importante para su eficacia terapéutica porque los niveles de BuChE aumentan durante el curso de la EA y están presentes en algunas lesiones de EA, incluidas las placas seniles. En la actualidad, la tacrina apenas se usa porque ha sido sustituida por otros tratamientos.

Un número creciente de estudios clínicos demuestra que la inhibición de la colinesterasa puede tener efectos modestos, pero detectables, tales como la mejora del funcionamiento cognitivo, medido mediante herramientas tales como la subescala cognitiva de la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer (ADAS-cog). Indicios más recientes indican que ChE pueden también aliviar las manifestaciones no cognitivas de la EA. Por ejemplo, no pueden mejorar las manifestaciones conductuales, evaluadas usando herramientas tales como el Inventario de Neuropsiquiatría, y pueden mejorar el funcionamiento de las actividades de la vida diaria, evaluado usando la Escala del Deterioro Progresivo.

En general, los beneficios son temporales porque las ChEI no abordan la causa subyacente de la degeneración de las neuronas colinérgicas, que continúa durante la enfermedad. Aunque inicialmente cabía esperar que la cada vez mayor familia de ChEu ayudara únicamente en las etapas tempranas e intermedias de la EA, los resultados indican que (1) mejoran el funcionamiento cognitivo en estadios avanzados; (2) mejoran significativamente las manifestaciones conductuales (p. ej., deambulación, agitación, comportamiento socialmente inadecuado asociado con los estadios avanzados); y (3) ayudan en pacientes con supuestos componentes vasculares añadidos a la demencia por EA, así como en pacientes con DLB, que a menudo aparece al mismo tiempo o se solapa con la EA (variante de la EA con cuerpos de Lewy).

Las ChEI comparten un perfil de efectos adversos común, los más frecuentes de los cuales son náuseas, vómitos, diarrea y mareos. Normalmente estos están relacionados con la dosis y pueden mitigarse con un lento aumento hasta la dosis de mantenimiento deseada. El uso de fármacos cuyos picos de absorción disminuyen con alimentos (p. ej., rivastigmina) pueden ayudar a mitigar los efectos adversos y mejorar la tolerabilidad del tratamiento con ChEI.

Los antagonistas de NMDA son la clase más nueva de agentes indicados para el tratamiento de la EA. A partir de octubre de 2003, le único fármaco aprobado en esta clase es la memantina. Estos agentes se pueden usar aislados o en combinación con inhibidores de la AChE. En consecuencia, en algunas realizaciones, las composiciones y procedimientos de la presente invención se usan en combinación con los agentes descritos anteriormente para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la EA.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al paciente con enfermedad de Alzheimer una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reducen los síntomas (p. ej., los descritos anteriormente) de la enfermedad de Alzheimer. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a ningún mecanismo de acción concreto, la administración de una composición que comprende levadura enriquecida con selenio como se define en las reivindicaciones a un sujeto con Alzheimer reduce los síntomas asociados con el Alzheimer a través de la reducción de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) (p. ej., Nicastrina, presenilina 1, presenilina 2, calsenilina, Catepsina B, Catepsina D, Catepsina Z, o Catepsina O) (véase el Ejemplo 10). En otras realizaciones preferidas, la expresión de los genes implicados en la generación del péptido beta amiloide (p. ej., A $\beta$ 1, Aplp 1, and Apba1) se altera (p. ej., reduce) usando composiciones de la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención se usan como tratamiento profiláctico con el fin de prevenir la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan en combinación con otros tratamientos terapéuticos conocidos (p. ej., los descritos anteriormente) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento profiláctico y/o terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer, que comprende coadministrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex), un agente terapéutico para el Alzheimer y uno o más antioxidantes. Las composiciones de la presente invención se pueden usar para prevenir y/o tratar la neurodegeneración asociada con la enfermedad de Alzheimer, que comprende inhibir la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide, genes implicados en la generación del péptido  $\beta$ -amiloide y los genes asociados con el complemento (Nicastrina, presenilina 1, presenilina 2, calsenilina, Catepsina B, Catepsina D, Catepsina Z, Catepsina O, A $\beta$ 1, Aplp 1, Apba1; C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma, y C1q $\gamma$ , véase el Ejemplo 10). Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de inhibir la expresión de genes implicados en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) de modo que se reduce la expresión de los genes implicados en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide. La presente invención también se refiere a un procedimiento de inhibir la expresión de genes implicados en la generación del péptido  $\beta$ -amiloide en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reduce la expresión de los genes implicados en la generación del péptido  $\beta$ -amiloide. La presente invención también se refiere a un procedimiento de inhibir la expresión de genes del complemento (p. ej., C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma y C1q $\gamma$ ) (véase el Ejemplo 10) implicados en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio en condiciones tales que se reduce la expresión de los genes del complemento. La composición que comprende

selenio puede comprender Sel-Plex. La composición que comprende Sel-Plex puede comprender también otras formas de selenio, por ejemplo selenito sódico (Sod-sel), de modo que potencian la regulación por disminución de la expresión de los genes mencionados anteriormente.

#### B. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

- 5 Las composiciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ELA es un trastorno devastador de las células del cuerno anterior de la médula espinal y de los núcleos craneales motores, que conduce a una debilidad y atrofia muscular progresiva.

10 La frecuencia de la ELA en EE.UU. es de aproximadamente 5 casos por 100.000 de la población. La ELA produce la muerte en diez años. En la mayoría de los casos, la muerte se produce en 5 años. Se ha notificado que algunos pacientes con ELA familiar de inicio en la juventud sobreviven durante periodos más largos (2-3 décadas). En EE.UU., la ELA afecta a personas de raza blanca más a menudo que de otra raza, la proporción entre raza blanca-no blanca es de 1,6:1. La proporción entre varones y mujeres afectados por ELA es de 1,5:1. El inicio se produce a los cuatro-siete décadas de vida.

15 La ELA implica degeneración de neuronas motoras, que tiene como resultado debilidad y emaciación muscular progresiva que culmina en parálisis, insuficiencia respiratoria y muerte. Quizá el 10 % de los casos son familiares y, de estos, aproximadamente 2-3 % se deben a mutaciones en el gen que codifica la Cu/Zn superóxido dismutasa-1 (SOD1), que produce una ganancia tóxica de la función en lugar de una pérdida de la función (catalítica) (véase, por ejemplo, Rosen y col., Nature 362, 59-62 (1993)). El mecanismo patogénico preciso no está claro, pero en la disfunción y muerte de las neuronas motoras están implicados el plegamiento erróneo y la agregación de las proteínas, un transporte axonal defectuoso, disfunción mitocondrial y excitotoxicidad por un fallo en la recaptación de glutamato en las células de glía. Las recientes pruebas estructurales sugieren que algunas mutaciones de la Cu/Zn SOD1 tienen como resultado la desestabilización de dímeros normales de la enzima y ayudan a la agregación, formando amiloides o poros en función de las condiciones, no al contrario que la polineuropatía amiloide familiar (véase, por ejemplo, Hough y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 5976-5981 (2004); Koo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9989-9990 (1999)). Por tanto, la estabilización de los dímeros se ha propuesto como una intervención terapéutica (véase, por ejemplo, Ray y Lansbury, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 5701-5702 (2004)).

20 Un informe reciente sobre ELA esporádica (que representa la gran mayoría de los casos) reveló una edición anormal del ARN en las subunidades de los receptores de glutamato, lo que produce un incremento en la entrada de  $Ca^{2+}$  en las neuronas (véase, por ejemplo, Kawahara y col., Nature 427, 801 (2004); Lipton, Nat. Med. 10, 347 (2004)). Este mecanismo puede contribuir a desaparición de neuronas, lo que sugiere posibles dianas terapéuticas, tal como contrarrestar la hiperactividad de los receptores de glutamato permeables al calcio o compensando las enzimas de edición de ARN potencialmente disfuncionales.

25 Los pacientes pueden presentar debilidad de músculos bulbares o de uno o múltiples grupos musculares de las extremidades. La presentación no siempre es bilateral o simétrica. Una forma predominantemente bulbar suele conducir a un deterioro más rápido y a la muerte. La debilidad de las extremidades es fundamentalmente distal. La debilidad y la atrofia de los músculos intrínsecos de la mano son prominentes. La debilidad progresa hasta afectar a los antebrazos y los músculos de la cintura escapular y las extremidades inferiores.

30 La afectación de las neuronas motoras superiores e inferiores es característica. Los pacientes desarrollan hiperreflexia variable, clonos, espasticidad, respuestas plantares extensoras y fasciculaciones de las extremidades o la lengua. La degeneración waleriana de los tractos corticoespinal y corticobulbar se puede demostrar mediante RM (lesiones en T2 de alta intensidad en los lóbulos frontales) o en la autopsia. Normalmente no afecta a los músculos extraoculares y a los músculos de la vejiga urinaria y del esfínter anal.

35 Casi el 10 % de los casos de ELA son familiares; la enfermedad se transmite de un modo autosómico dominante. El gen de la cobre/cinc SOD1 está mutado en el 10-20 % de estos casos familiares. Aunque el principal mecanismo de la lesión neural mediada por la SOD1 se desconoce actualmente, se piensa que la apoptosis, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo desempeñan papeles cruciales en la patogenia. La ELA esporádica comparte características clínicas con la ELA familiar. No obstante, en estos pacientes no se han identificado mutaciones ni polimorfismos en la SOD1. Las vías comunes de la patogenia de la enfermedad pueden desempeñar un papel, con diferentes anomalías moleculares que conducen a fenotipos similares.

40 Los ratones defectivos para la SOD1 exhiben atrofia y debilidad muscular progresiva típica con daños selectivos a las neuronas motoras que se asemeja estrechamente a la ELA de seres humanos. Parece haber una relación causal entre la secreción de SOD1 mutante y la toxicidad neural (p. ej., la proteína mutante no se secreta). No obstante, la infusión de la SOD silvestre en un modelo de rata de ELA retrasa significativamente el inicio de la enfermedad (véase, por ejemplo, Neurosci, 25, 108-117 (2005)). Además, se ha demostrado que se requiere una chaperona de cobre (Cu) para una carga eficiente de Cu en la SOD (véase, por ejemplo, Nat. Neurosci, 5, 301-307 (2002)). Por tanto, la capacidad para mantener niveles normales de SOD silvestre o potenciar la expresión o la función de la misma puede proporcionar un efecto terapéutico beneficioso para los sujetos con ELA.

Además, Se ha demostrado que en varias zonas del cerebro de sujetos con ELA aparecen números regresivos de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal (véase, por ejemplo, Neurochem Int. 46, 357-368, (2005)). Por tanto, la capacidad para regular por aumento los genes implicados en el crecimiento de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal y/o el mantenimiento puede proporcionar efectos beneficiosos para un sujeto con ELA.

5 Aunque puede haber un proceso inflamatorio, nuevas pruebas apuntan hacia múltiples mecanismos que promuevan la muerte de las células neuronales en el SNC como la base subyacente de la ELA. La reciente demostración de las mutaciones de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en modelos de ELA familiar humana y de ELA murina avalan la visión de que el estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y las vías de excitotoxicidad pueden estar implicados en el proceso de la muerte celular neuronal.

10 La ELA comienza de forma insidiosa como debilidad, atrofia o fasciculaciones en 1 o más extremidades. Normalmente, las manifestaciones son distales, pero gradualmente progresan para afectar a los músculos más proximales. Se pueden observar fasciculaciones y la atrofia de la lengua. Normalmente, la insuficiencia respiratoria es un acontecimiento tardío. La exploración física revela debilidad y atrofia de los músculos intrínsecos de la mano, hiperreflexia con respuestas plantares extensoras y clonos. Las fasciculaciones en el muslo son frecuentes. La hiperreflexia puede ser variable y, en algunos casos, estar ausente. La afectación sensorial, si existe, es mínima. Los pacientes pueden presentar incapacidad para escribir debido a la debilidad. La función de la marcha puede estar conservada.

20 El EMG con aguja y los estudios de conducción nerviosa son las pruebas de elección para confirmar el diagnóstico de ELA. La confirmación de la ELA se facilita a través de la demostración de signos de deservación difusa, disminución de la amplitud de los potenciales de acción de los músculos y velocidades de conducción normales. No obstante, para una confirmación más detallada del ELA, un subcomité de la Federación Mundial de neurología se han desarrollado criterios electrofisiológicos más estrictos y se denominan los criterios "E1 Escorial" para la enfermedad de las neuronas motoras.

25 Riluzol es el único medicamento que ha demostrado eficacia terapéutica para la ELA. Se piensa que riluzol contrarresta las vías excitatorias de los aminoácidos (glutaminérgicas), pero su mecanismo de acción exacto en la ELA se desconoce. En 2 ensayos aleatorizados se ha demostrado que prolonga la supervivencia sin traqueotomía en comparación con el placebo. No obstante, no se reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa en las tasas de mortalidad al final de estos estudios. En otros ensayos clínicos, también se ha mostrado que la creatina, la IGF-1 recombinante humana y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) son prometedores.

30 También se usan agentes antiespásticos para aliviar la espasticidad y los espasmos musculares en pacientes con síntomas de rigidez de las extremidades. Ejemplos incluyen Baclofen (Lioresal) y Tizanidina (Zanaflex). Se puede usar Sel-Plex en combinación con los agentes descritos anteriormente.

35 En consecuencia, las composiciones de la presente invención se usan en combinación con otros tratamientos terapéuticos conocidos (p. ej., los descritos anteriormente) para el tratamiento del ELA. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a un sujeto que se sospecha que padece ELA potencia la expresión de genes (p. ej., genes de la SOD, Lhx8, TGFβ-2 u otros genes descritos en el presente documento) en el sujeto, tratando de este modo la ELA. La presente invención también se refiere a un procedimiento de potenciar la expresión de los genes de la SOD (p. ej., SOD1 y SOD1) en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se potencia la expresión de los genes de SOD. La composición que comprende selenio puede comprender Sel-Plex (véase el Ejemplo 4). La composición que comprende Sel-Plex puede comprender también otras formas de selenio, por ejemplo Sod-sel, de modo que potencian la regulación por disminución de la expresión de los genes de la SOD.

### C. Enfermedad de Parkinson

45 Las composiciones de la presente invención que comprenden Sel-Plex se pueden usar en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la Enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson (en adelante EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo asociado con una pérdida de neuronas nigroestriatales dopaminérgicas. La EP está reconocida como un trastorno neurológico frecuente que afecta a aproximadamente el 1 % de los individuos mayores de 60 años de edad. Las características clínicas incluyen temblores en reposo, rigidez, bradiquinesia e inestabilidad postural. Los síntomas de la EP se deben a una degeneración progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) pigmentadas en la parte compacta de la sustancia negra.

55 Los hallazgos neuropatológicos de la EP incluyen pérdida de neuronas dopaminérgicas pigmentadas en la sustancia negra y la presencia de cuerpos de Lewy. La pérdida de neuronas dopaminérgicas se produce principalmente en la sustancia negra ventrolateral. Aproximadamente el 60-80 % de las neuronas dopaminérgicas se pierden antes de que aparezcan los síntomas clínicos de la EP. Los cuerpos de Lewy son inclusiones concéntricas, eosinófilas y citoplasmáticas con halos periféricos y núcleos densos. La presencia de cuerpos de Lewy dentro de las neuronas pigmentadas de la sustancia negra es característica, pero no patognomónica, de la EP idiopática. Los cuerpos de Lewy también se encuentran en la corteza, el núcleo basal, el locus cerúleo, la columna intermediolateral de la

médula espinal y otras zonas. Los cuerpos de Lewy no son específicos de la EP, ya que se encuentran en algunos casos de parkinsonismo atípico, enfermedad de Hallervorden-Spatz y otros trastornos. Cuerpos de Lewy accidentales se encuentran en autopsias de pacientes sin signos clínicos de parkinsonismo. La prevalencia de los cuerpos de Lewy accidentales aumenta con la edad. Se ha hipotetizado que los cuerpos de Lewy accidentales representan la fase presintomática de la EP. La alfa-sinucleína es un componente estructural de los cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy se tiñen para alfa-sinucleína y, la mayoría, también para ubiquitina.

El circuito motor de los ganglios basales modula el gasto cortical necesario para un movimiento normal. Las señales procedentes de la corteza cerebral se procesan a través del circuito motor talamocortical-ganglios basales y retornan a la misma área a través de una vía de retroalimentación. El gasto de circuito motor se dirige a través del segmento interno del globo pálido (GPi) y el pars reticulata de la sustancia negra (SNr). Este gasto inhibitorio está dirigido a la vía talamocortical y suprime el movimiento.

Existen dos vías dentro del circuito de los ganglios basales; se denominan las vías directa e indirecta. En la vía directa, la salida del núcleo estriado inhibe directamente el GPi y el SNr. La vía indirecta comprende conexiones inhibitorias entre el estriado y el segmento externo del globo pálido (GPe) y el GPe y el núcleo subtalámico (STN). El núcleo subtalámico ejerce una influencia excitatoria sobre el GPi y el SNr. El GPi y el SNr envía señales inhibitorias al núcleo ventrolateral (VL) del tálamo. Las neuronas estriatales que contienen receptores D1 constituyen la vía directa y se proyectan hacia el GPi/SNr. Las neuronas estriatales que contienen receptores D2 forman parte de la vía indirecta y se proyectan hacia el GPe.

La dopamina se libera de las neuronas nigroestriales (SNc) para activar la vía directa e inhibir la vía indirecta. En la EP, la dopamina estriatal disminuida producir un incremento de la señal inhibitoria del GPi/SNr. Esta mayor inhibición de la vía talamocortical suprime el movimiento. A través de la vía directa, la menor estimulación de la dopamina estriatal produce disminución de la inhibición de GPi/SNr. A través de la vía indirecta, la disminución de la inhibición de la dopamina aumenta la inhibición del GPe, lo que tiene como resultado la desinhibición del STN. El incremento de la señal del STN aumenta la señal inhibitoria de GPi/SNr del tálamo.

Las formas hereditarias raras de la EP han proporcionado ideas sobre las vías moleculares de este trastorno (véase, por ejemplo, Hardy y col., *Lancet Neurol.* 2, 221-228 (2003)). Las mutaciones en al menos cuatro genes se han vinculado con la EP, incluida la -sinucleína (PARK1), parkina (PARK2), DJ-1 (PARK7), y PTEN quinasa 1 inducida (homólogo de la fosfatasa y tensina deletado en el cromosoma 10)-(PINK1, también conocido como PARK6) (véase, por ejemplo, Polymeropoulos, et al, *Science* 276, 2045-2047 (1997); Kitada y col., *Nature* 392, 605-608 (1998); Bonifati y col., *Science* 299, 256-259 (2003); Valente y col., *Science* 304, 1158-1160 (2004)) La parkina es una E3 ligasa que cataliza la adición de ubiquitina a sustratos específicos a los que está dirigida para la degradación del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). La parkina es una diana del estrés oxidativo y nitrosativo en la EP esporádica. Los residuos de la cisteína en los dominios RING son sensibles a las modificaciones oxidativas y nitrosativas, que alteran la función proteica. Los nuevos hallazgos indican que la actividad de E3 ligada de la parkina está modificada por la NO, de modo que vincula el estrés ambiental con una anomalía molecular en un fenotipo clínico similar al observado en formas hereditarias del EP (véase, por ejemplo, Chung y col., *Science* 304, 1328-1331 (2004)).

Las composiciones de la presente invención que comprenden Sel-Plex se pueden administrar con otras intervenciones terapéuticas para tratar la EP. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar junto con intervención quirúrgica en el tratamiento de la EP. Las intervenciones quirúrgicas útiles en el tratamiento de la EP incluyen, entre otros, cirugía estereotáctica (p. ej., talamotomía, estimulación cerebral profunda talámica, palidotomía, estimulación palidal, subtalamotomía, estimulación subtalámica y trasplante neuronal). Las composiciones de la presente invención se pueden administrar junto con profármacos de dopamina en el tratamiento de la PE útil. Profármacos dopaminérgicos útiles en el tratamiento de la EP incluyen, entre otros, levodopa/PDI y levodopa/carbidopa (p. ej., Sinemet, Sinemet CR). Los tratamientos actuales, tales como administración de L-DOPA para producir dopamina son únicamente sintomáticos y no detienen ni retrasan la pérdida progresiva de neuronas. De hecho, en algunos estudios se ha sugerido que la lesión oxidativa por la dopamina puede producir daños neuronales adicionales (véase, por ejemplo, Xu y col., *Nat. Med.* 8, 600-606 (2002)). Por tanto, las composiciones de la presente invención se pueden administrar junto con un agente terapéutico de la EP (p. ej., L-DOPA) y un antioxidante. Los antioxidantes adecuados para coadministración se describen en el presente documento.

Las composiciones que comprende selenio de la presente invención se pueden administrar junto con agonistas de dopamina en el tratamiento de la EP. Los agonistas de dopamina útiles en el tratamiento de la EP incluyen, entre otros, apomorfina (p. ej., Apokyn), bromocriptina (p. ej., Parlodel), pergolida (p. ej., Permax), pramipexol (p. ej., Mirapex), y ropinirol (p. ej., Requip). Los compuestos de la presente invención se pueden administrar junto con inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMT) en el tratamiento de la EP. Los inhibidores de la COMT útiles en el tratamiento de la EP incluyen, entre otros, tolcapona (p.ej., Tasmar) y entacapona (p.ej., Comtan).. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar junto con anticolinérgicos en el tratamiento de la EP. Los anticolinérgicos útiles en el tratamiento de la EP incluyen, entre otros, trihexifenidil (p.ej., Artane, Trihexy), y mesilato de benzotropina (p.ej., Cogentin). Los compuestos de la presente invención se pueden administrar junto con inhibidores de MAO-B en el tratamiento de la EP. Los inhibidores de MAO-B útiles en el tratamiento de la EP incluyen, entre otros, selegilina (p.ej., Eldepryl). Los compuestos de la presente invención se pueden administrar

junto con amantadina (p. ej., (p. ej., Symmetrel) en el tratamiento de la EP.

#### D. Enfermedad de Huntington

Las composiciones de la presente invención que comprenden Sel-Plex se pueden usar en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la enfermedad de Huntington. La enfermedad de Huntington (en adelante "EH") es un trastorno neurodegenerativo hereditario autosómico dominante que afecta a 1 de cada 10.000 individuos. Se debe a una inserción de múltiples repeticiones CAG en el gen huntingtina. Esto tiene como resultado una expansión en N-terminal de poliglutamina (poliQ) de la proteína grande huntingtina (Htt), similar a otros trastornos neurodegenerativos relacionados con poliQ. La gravedad de la enfermedad depende de la longitud de la extensión de poliQ, con repeticiones superiores a 40 claramente vinculadas a la EH. Se piensa que la expansión de poliQ confiere una ganancia tóxica de la función con pérdida selectiva de neuronas en el estriado y la corteza cerebral.

Los rasgos característicos de la EH incluyen movimientos involuntarios, demencia y cambios conductuales. La neuropatología en la EH se produce en el neocórtex, en el que la atrofia macrosocópica del núcleo caudado y el putamen se acompaña de pérdida neuronal selectiva y astrogliosis. También se ve una marcada pérdida neuronal en las capas profundas de la corteza cerebral. Otras regiones, incluidos el globo pálido, el tálamo, el núcleo subtalámico, la sustancia negra y el cerebelo, muestran grados variables de atrofia en función del grado patológico.

La función de la huntingtina no se conoce. Normalmente se localiza en el citoplasma. La asociación de la huntingtina con la superficie citoplásmica de diversos orgánulos, incluidas vesículas de transporte, vesículas sinápticas, microtúbulos y mitocondrias, plantea la posibilidad o la aparición de interacciones celulares normales que podrían ser relevantes para la neurodegeneración. Los fragmentos en N-terminal de la huntingtina mutante se acumulan y forman inclusiones en el núcleo celular en los cerebros de pacientes con EH, así como en varios modelos de células y animales de la EH.

Los pacientes con EH presentan un patrón mixto de anomalías neurológicas y psiquiátricas. El corea, un estado de movimientos espontáneos excesivos, a tiempos irregulares, distribuidos aleatoriamente y abruptos, es un rasgo característico de la EH. La gravedad del corea puede variar desde inquietud con exageración intermitente leve de los gestos y la expresión, movimientos nerviosos de las manos y marcha inestable de tipo baile a un flujo continuo de movimientos violentos discapacitantes. Características clínicas adicionales de la EH incluyen, por ejemplo, bradiquinesia, aquinesia, distonía, anomalías en los movimientos oculares, demencia, depresión y otras manifestaciones psiquiátricas.

Las calpaínas son proteasas que desempeñan un papel fundamental en la proteólisis de Huntington y la patología de la enfermedad. Los miembros de la familia de la calpaína, incluida la calpaína-5, tienen niveles aumentados o están activados en el cultivo tisular de EH y modelos de ratón transgénico (véase, p. ej., J Biol Chem, 279, 20211-20220 (2004)).

Las composiciones de la presente invención se analizaron para determinar si eran capaces de alterar los niveles de expresión de los genes de la calpaína. Las composiciones que comprenden varias formas de selenio (p. ej., SeM, Sod-sel, and Sel-Plex) se administraron a sujetos y los niveles de expresión de los genes de la calpaína se monitorizaron. El nivel de expresión de la calpaína-5 se alteró mediante el tratamiento de las siguientes formas: Selenometionina libre SM) +1,32\*, Sod-sel -1,07, Sel-Plex -1,44\*.

Las composiciones que comprenden selenio de la presente invención, como se definen en las reivindicaciones, se usa para tratar la EH. La presente invención se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto con EH que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio en condiciones tales que se reduce la expresión de un gen de calpaína. El gen de la calpaína puede ser calpaína-5. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar con otros agentes terapéuticos para tratar la EH.

Las composiciones que comprenden selenio se pueden administrar con medicamentos anticonvulsivos en el tratamiento de la EH. La medicación anticonvulsiva útil en el tratamiento de la EH incluye, entre otros, ácido valproico (p. ej., Depakote, Depakene, y Depacon) y benzodiazepinas tales como clonazepam (p. ej., Klonopin) Las composiciones que comprenden selenio se pueden administrar con medicamentos antipsicóticos en el tratamiento de la EH. La medicación antipsicótica útil en el tratamiento de la EH incluye, entre otros, risperidona (p. ej., Risperdal), yhaloperidol (p. ej., Haldol. Las composiciones que comprenden selenio se pueden administrar con alcaloides de rauwolfia en el tratamiento de la EH. Los alcaloides de rauwolfia útiles en el tratamiento de la EH incluyen, entre otros, resperina. Las composiciones que comprenden selenio se pueden administrar con antidepresivos en el tratamiento de la EH. Los antidepresivos útiles en el tratamiento de la EH incluyen, entre otros, paroxetina (p. ej., Paxil)..

#### E. Esclerosis Múltiple

Las composiciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC). Las lesiones de la EM, caracterizadas por infiltración perivascular de monocitos y linfocitos, aparecen como zonas induradas en especímenes patológicos; de ahí la expresión "esclerosis en placas."

La EM es una enfermedad dinámica, con formación de lesiones casi constante y una evolución clínica progresiva que conduce a discapacidad física. Por cada 8-10 lesiones nuevas detectadas en la resonancia magnética (RMN), normalmente solo se puede demostrar una manifestación clínica. Los pacientes con EM remitente recidivante tienen una media de 20 lesiones nuevas al año y de una a dos exacerbaciones clínicas.

5 Con la llegada de la RMN, la capacidad para confirmar el diagnóstico de la EM ha mejorado espectacularmente. La RM muestra de forma característica lesiones de alta intensidad de señal en T2 de localización variable en la materia blanca del cerebro, el tronco encefálico, los nervios ópticos o la médula espinal. En casos típicos, las lesiones tienden a producirse en áreas periventriculares y se pueden producir el cuerpo calloso. Las técnicas de RMN más nuevas (p. ej., transferencia con magnetización, recuperación por inversión atenuada de fluidos (FLAIR),  
10 espectroscopia RM (EMR), prometen dar información importante sobre la heterogeneidad de la EM, el pronóstico y los efectos del tratamiento.

A pesar de los intensos esfuerzos para encontrar el origen de la enfermedad no se ha identificado ningún agente etiológico de la EM. Posiblemente la enfermedad se exacerbe por cambios hormonales durante el periodo posparto. Algunas personas argumentan que la EM podría ser un trastorno heterogéneo desencadenado por varios agentes ambientales diferentes. De hecho, solo 1 de cada 4 ataques de EM se asocia con una infección vírica.  
15

La enfermedad puede presentarse de formas diferentes, tales como los fenotipos primaria progresiva, remitente recidivante, recidivante progresiva y secundaria progresiva. Los factores de susceptibilidad genética pueden desempeñar un papel, ya que la enfermedad es más frecuente en poblaciones caucásicas que viven en latitudes del norte. Esta susceptibilidad puede formar parte de un complejo y heterogéneo grupo de factores que afectan, junto  
20 con los factores ambientales, al inicio y mantenimiento de la enfermedad. Además, se sabe que la migración a áreas de alto riesgo antes de los 15 años de edad aumenta el riesgo de desarrollar EM, lo que avala la hipótesis del factor ambiental.

La EM se caracteriza por infiltración perivascular de linfocitos y macrófagos en el parénquima cerebral, el tronco del encéfalo, los nervios ópticos y la médula espinal. La expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie parece subrayar la capacidad de estas células inflamatorias para atravesar la barrera hematoencefálica. Los niveles elevados de inmunoglobulina G (IgG) en el líquido cefalorraquídeo (LCR), que se puede demostrar por un patrón en banda oligoclonal en la electroforesis, sugiere un importante componente humoral (es decir, activación de células B) en la EM. De hecho, se han demostrado grados variables de infiltración de células plasmáticas productoras de anticuerpos en las lesiones de la EM (véase la Imagen 1). Los estudios moleculares del tejido de la placa en la  
25 materia blanca han mostrado que la interleucina 12 (IL-12), una potente sustancia proinflamatoria, se expresa a niveles altos en las lesiones formadas al principio.

En EE.UU., la EM tiene una prevalencia de casi 350.000 casos en EE.UU. solo. Todos los años, aproximadamente 10.000 personas reciben un diagnóstico nuevo de EM. Más de un millón en todo el mundo están afectados. La EM produce una discapacidad considerable en el grupo de edad de trabajadores. Las personas con EM suelen morir de complicaciones, en lugar de por la propia EM, incluidas las infecciones recurrentes (especialmente en pacientes confinados en cama). Los pacientes con EM tienen una esperanza de vida media 7 años más corta que los de la población general.  
30

La EM aparece con más frecuencia en poblaciones con ascendientes del norte de Europa. El hecho de si la gravedad de la enfermedad también puede depender de diferencias raciales es controvertido. La tasa de concordancia para la EM es de 20-40% entre gemelos monocigóticos, lo que sugiere la presencia de factores genéticos predisponentes de herencia no mendeliana.  
35

La EM afecta a mujeres más que a varones (1.6-2:1), pero la base de esta diferencia se desconoce. Esta proporción es todavía mayor (3:1) entre pacientes en los que la EM se inicia antes de los 15 años de edad o tras los 50 años de edad, lo que sugiere un componente hormonal del proceso de la enfermedad. Los varones tienen una tendencia mayor a desarrollar EM primaria progresiva, mientras que las mujeres tienden a experimentar más recaídas. La EM afecta con mayor frecuencia a personas de edades comprendidas entre los 18 y los 50 años de edad, pero puede afectar a cualquier grupo de edad.  
40

Se han descrito oligodendrocitos activados por complemento inmunorreactivo-D4s (C4d-CAOs) en la EM (véase, por ejemplo, Schwab y McGeer, *Experimental Neurology*, 174, 81-88 (2002)). Se ha notificado que los C4d-CAO delimitan placas pequeñas de EM de 30-500  $\mu\text{m}$ . En las lesiones grandes de EM, se identificaron fibras inmunorreactivas que corresponden a los componentes C1q - C9 de la cascada del complemento que indican que la activación completa de la cascada del complemento está presente en las lesiones de EM. La asociación de C4d-CAO con áreas de desmielinización demostraron un ataque directo sobre las células de oligodendroglía por los componentes tempranos del complemento como acontecimiento de inicio de la EM. Además, la activación incompleta del complemento indicó que esta etapa puede ser reversible (véase, por ejemplo, Schwab and McGeer, *Experimental Neurology*, 174, 81-88 (2002)).  
45

La terapia farmacológica busca retrasar la progresión a discapacidad, reducir la tasa de recaídas, incrementar el número de pacientes sin recaídas e incrementar el tiempo hasta la primera recaída, así como disminuir la carga de

lesiones en la RM, atrofia y “orificios en T1” o la presencia de lesiones nuevas.

En consecuencia, las composiciones que comprenden selenio de la presente invención, como se definen en las reivindicaciones, se pueden usar para tratar y/o prevenir la EM. La presente invención se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto con EM que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio en condiciones tales que se reduce la expresión de un gen del complemento. El gen del complemento puede comprender C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma y/o C1qr. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar con otros agentes terapéuticos para tratar la EM. Las composiciones que comprenden selenio se pueden administrar con inmunomoduladores (p. ej., interferón-beta-1a (Avonex), Interferón beta-1a (Rebif), Interferón beta-1b (Betaseron), acetato de glatiramer (Copaxone), y Natalizumab (Tysabri)), que retrasan la progresión a discapacidad y reducen el número de nuevas lesiones de EM por RM, corticosteroides (p.ej., metilprednisolona), que se usan para reducir la inflamación aguda y acelerar la recuperación de exacerbaciones agudas de EM e inmunosupresores (p. ej., Mitoxantrona (Novantrone), Ciclofosfamida (Cytoxan, Neosar), Azatioprina (IMURAN), Metotrexato (Rheumatrex), que se usan para suprimir las reacciones inmunitarias. Fármacos adicionales se pueden usar para tratar afecciones secundarias comunes, tales como depresión, espasticidad, espasmos tónicos, fatiga, disfunción urinaria y disfunción eréctil. Las composiciones que comprenden selenio se pueden usar en combinación con los agentes descritos anteriormente.

## II. Función cognitiva

El sistema nervioso central consiste en el cerebro y la médula espinal. Todos los restantes nervios del organismo comprenden el sistema nervioso periférico. Los nervios eferentes transportan mensajes desde el sistema nervioso central a todas las partes del cuerpo (periferia). Los nervios aferentes transportan información, tal como intensidad del dolor, desde la periferia al sistema nervioso central. Existen dos tipos nervios eferentes: somáticos, que van a los músculos esqueléticos, y autónomos, que van a los músculos lisos, las glándulas y el corazón. Los mensajes en forma de actividad eléctrica son conducidos a lo largo de las fibras nerviosas o axones. Entre el extremo del axón y el músculo o glándula que controla el nervio (inerva), existe un espacio denominado sinapsis o hendidura sináptica. Cuando el impulso eléctrico conducido (potencial de acción) alcanza el extremo del nervio, provoca la liberación de sustancias químicas denominadas neurotransmisores. Estas sustancias químicas se difunden a través de la hendidura sináptica y reaccionan con una estructura especializada (receptor) sobre la membrana postunión. Se dice que el receptor está activado o excitado y su activación desencadena una serie de acontecimientos químicos que tienen como resultado, en última instancia, una respuesta biológica, tal como la contracción muscular. Los procesos que implican liberación de neurotransmisores, difusión y activación del receptor se denominan, en conjunto, transmisión. Existen muchos tipos de transmisión y se denominan según el neurotransmisor específico implicado. Por tanto, la transmisión colinérgica implica la liberación del neurotransmisor acetilcolina y su activación del receptor posináptico. Las sustancias que se unen y activan los receptores se denominan agonistas. Por tanto, la acetilcolina es el agonista endógeno de todos los receptores colinérgicos.

Después de salir del sistema nervioso central, los nervios somáticos a los músculos esqueléticos solo tienen una sinapsis, a saber entre el extremo del nervio y el músculo que inerva. El neurotransmisor en la sinapsis es acetilcolina. Por tanto, esta unión mio (por músculo)neural es un sitio de transmisión colinérgica. El receptor postunión se denomina la placa final motora. Los nervios autónomos, en contraste con los nervios somáticos, tienen una sinapsis adicional entre el sistema nervioso central y la estructura inervada (órgano final). Tres sinapsis están en las estructuras denominados ganglios y éstas son uniones nervio-nervio en lugar de uniones nervio-órgano final. No obstante, como los nervios somáticos, los nervios autónomos también tienen una sinapsis nervio-órgano final. El neurotransmisor en los ganglios autónomos también es acetilcolina; por tanto, representa otro sitio de transmisión colinérgica. La placa motora final y los receptores ganglionares también se pueden activar con nicotina añadida de forma exógena. Por tanto, la nicotina es un agonista para esta subfamilia concreta de receptores colinérgicos que se denominan receptores nicotínicos, colinérgicos.

Hay dos divisiones anatómicas y funcionalmente distintas del sistema nervioso central. la división simpática y la división parasimpática. Las fibras preganglionares de las dos divisiones son funcionalmente idénticas e inervan los receptores nicotínicos, colinérgicos en los ganglios para iniciar potenciales de acción en las fibras posganglionares. Por tanto, todos los ganglios se crean más o menos iguales. Sólo las fibras posganglionares de la división parasimpática, no obstante son colinérgicas. Las fibras posganglionares de la división simpática generalmente, aunque no siempre, secretan norepinefrina. Los receptores colinérgicos inervados por las fibras posganglionares de la división parasimpática del sistema nervioso autónomo también se pueden activar mediante muscarina añadida exógenamente, y un agonista que se encuentra en cantidades pequeñas en el hongo venenoso Amanita muscaria. Estos constituyen una segunda subpoblación de receptores colinérgicos que se denominan receptores colinérgicos muscarínicos.

Aunque los receptores en los ganglios y la placa motora final responden a la nicotina, en realidad constituyen dos subgrupos distintos de receptores nicotínicos. Cada una de las tres familias de receptores colinérgicos se puede bloquear mediante antagonistas específicos de receptores para prevenir la activación por la acetilcolina indígena o agonistas añadidos. Por tanto, se conocen bloqueantes específicos para receptores colinérgicos muscarínicos inervados por fibras posganglionares de la división parasimpática del sistema nervioso autónomo, para receptores colinérgicos nicotínicos en los ganglios simpáticos y parasimpáticos, y para receptores colinérgicos nicotínicos en la

unión mioneural (placas motoras finales) del sistema nervioso somático. Cuando estos receptores se bloquean se pierde la actividad biológica en curso asociada con su activación normal y continúa. Por ejemplo, el bloqueo de la placa motora final produce parálisis flácida generalizada.

5 Hay algunas fibras anómalas en la división simpática del sistema nervioso autónomo. Por ejemplo, los nervios posganglionares simpáticos que van a las glándulas sudoríparas son colinérgicos en lugar de adrenérgicos como la mayoría de las demás fibras simpáticas, e inervan los receptores muscarínicos. El nervio simpático que llega a la glándula suprarrenal inerva un receptor que es nicotínico, como todos los ganglios autónomos, pero no hay fibra posganglionar. La propia glándula es análoga a la fibra posganglionar simpática, pero, en lugar de secretar un neurotransmisor, secreta epinefrina y norepinefrina en la circulación sanguínea, donde funcionan como hormonas.

10 Estas hormonas activan los receptores adrenérgicos en el organismo. Los receptores nicotínicos y muscarínicos del sistema nervioso central todavía no se conocen por completo.

15 Los fármacos colinérgicos son medicamentos que producen los mismos efectos en el sistema nervioso parasimpático. Los fármacos colinérgicos producen los mismos efectos que la acetilcolina. La acetilcolina es la neurohormona más frecuente del sistema nervioso parasimpático, la parte del sistema nervioso periférico responsable del trabajo diario del organismo. Mientras que el sistema nervioso simpático actúa durante tiempos de excitación, el sistema parasimpático trata con las actividades diarias, tales como salivación, digestión y relajación muscular.

20 Los fármacos colinérgicos se pueden usar de varios modos. Los estimulantes musculares colinérgicos se usan para diagnosticar y tratar la miastenia gravis, una enfermedad que produce una debilidad muscular intensa. Esta clase de fármacos incluye cloruro de ambenonio (Mytelase), cloruro de edrofonio (Tensilon), neostigmina (Prostigmina) y piridogstamina (Mestinon). Estos fármacos también se usan ampliamente en cirugía, tanto para reducir el riesgo de retención urinaria como para invertir los efectos de los fármacos relajantes musculares que se usan en cirugía.

25 Los fármacos colinérgicos también se usan en el control del glaucoma, una enfermedad que se produce por el incremento de la presión dentro del ojo. Los fármacos más frecuentes usados para este fin son demecario (Humorsol) y ehtiofato (yoduro de fosfolina).

30 Normalmente, los fármacos colinérgicos actúan de uno de dos modos. Algunos simulan directamente el efecto de la acetilcolina, mientras que otros bloquean los efectos de la acetilcolinesterasa. La acetilcolinesterasa es una enzima que destruye la acetilcolina natural. Bloqueando la enzima la acetilcolina natural tiene una acción más prolongada. Los fármacos colinérgicos solo están disponibles bajo prescripción médica. Pueden estar disponibles como gotas oculares, cápsulas, comprimidos o inyecciones.

Se ha demostrado que la función cognitiva disminuye o se deteriora en varias enfermedades, como la EM, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, ELA, entre otras,

35 En la EM, por ejemplo, la función cognitiva con mayor probabilidad de verse afectada es la memoria. Otras funciones cognitivas afectadas con frecuencia en sujetos con una enfermedad neurodegenerativa incluyen la velocidad de procesamiento de la información, las funciones ejecutivas (planificación y priorización), funciones visuoespaciales (deterioro de la percepción visual y las capacidades de construcción), razonamiento abstracto y resolución de problemas, la atención y concentración, especialmente la concentración sostenida, y la capacidad para dividir la atención en tareas distintas. Uno de los déficits cognitivos más desconcertante observado en la EM es dificultades para encontrar palabras, la experiencia de tener una palabra en la punta de la lengua, pero no ser capaz de recordarla.

40

45 Los primeros signos de disfunción o disminución cognitiva pueden ser sutiles. La persona puede tener dificultades para encontrar las palabras adecuadas o tener problemas para recordar qué hacer en el trabajo o durante las rutinas diarias del hogar. Las decisiones que una vez eran fáciles de tomar, ahora demuestran poco juicio. A menudo la familia es la primera en darse cuenta del problema, nota los cambios en el comportamiento y los hábitos personales. La disfunción cognitiva puede afectar al funcionamiento en casa y en el trabajo. La función cognitiva también se puede ver afectada por el envejecimiento o por medicamentos.

50 Considerables pruebas biológicas avalan la importancia de los estrógenos en la función cognitiva. Se han identificado receptores de estrógenos en el cerebro y parecen particularmente concentrados en el prosencéfalo basal. El prosencéfalo basal es de especial interés, ya que es la fuente principal de inervación colinérgica en el hipocampo. El sistema colinérgico es un sistema de neurotransmisores importantes para la regulación de la memoria y el aprendizaje, mientras que el hipocampo es la región principal del cerebro que participa en la función cognitiva. En experimentos con modelos animales y líneas celulares se han identificado varios mecanismos por los que los estrógenos pueden afectar a la función cognitiva.

55 Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (BFCN) están implicadas en las funciones cognitivas, como el aprendizaje y la memoria, y están afectadas en varias enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA). El gen 8 de la proteína LIM homeobox (Lhx8) es importante para el adecuado desarrollo y mantenimiento de las BFCN (véase, por ejemplo, Mori y col., Eur. J. Neurosci., 19, 3129 (2004)).

Los ratones con una mutación nula en el gen *Lhx8* son deficientes en el desarrollo de neuronas colinérgicas del prosencéfalo (Zhao y col. Proc. Nat. Acad. Sci. 100: 9005 (2003)). Los mutantes *Lhx8* carecían del núcleo basal, como fuente principal de la entrada colinérgica en la corteza cerebral.

5 Usando composiciones de la presente invención, el nivel de expresión observado de *Lhx8* no era significativamente diferente entre sujetos deficientes en Se y el de los sujetos que reciben ciertas formas de selenio (p. ej., SeM o Sod-sel). No obstante, cuando se administró a los sujetos (p. ej., suplemento recibido y de la dieta) una composición que comprende Sel-Plex, la expresión de *Lhx8* se reguló por aumento, 12,9 veces ( $p < 0,01$  (véase el Ejemplo 5)). Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de mantenimiento y/o estabilización de la función neurológica (p. ej., crecimiento de neuronas colinérgicas y la función asociada con la función cognitiva) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex. Se puede administrar Sel-Plex al sujeto en condiciones tales que la expresión de *Lhx8* se potencia. Las composiciones de la presente invención se pueden usar como tratamiento profiláctico con el fin de prevenir la pérdida de la función cognitiva. Aunque no es necesario comprender el mecanismo, prevenir la pérdida de la función cognitiva se puede producir debido a la estimulación del desarrollo de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal o, simplemente, el mantenimiento (p. ej., falta de apoptosis) de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Una composición que comprende Sel-Plex se puede administrar a un sujeto que se sospecha que tiene miastenia gravis para el tratamiento de la miastenia gravis. Una composición que comprende selenio se puede coadministrar en combinación con otros tratamientos terapéuticos conocidos (p. ej., los descritos anteriormente) para el tratamiento de la miastenia gravis. La presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento profiláctico y/o terapéuticos para la miastenia gravis, que comprende coadministrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) y un estimulante muscular colinérgico.

25 El producto de otro gen, del factor beta 2 transformante del crecimiento (TGF- $\beta$ 2), se sabe que aumenta la proliferación neuronal en el desarrollo del cerebelo (véase, por ejemplo, Elvers y col., Mechanisms of Development, 122, 587 (2004)). Además, se ha demostrado que el TGF- $\beta$ 2 es un factor de crecimiento y de supervivencia para los precursores de las células granulares en el cerebelo y que la neutralización mediada por anticuerpos de TGF- $\beta$ 2 endógeno reprime la proliferación de los precursores de las células granulares e induce neurodegeneración. También se ha demostrado que cuando se elimina TGF- $\beta$ 2 (p. ej., delección) se produce un fenotipo letal con ratones deficientes en TGF- $\beta$ 2 que desarrollan una serie de defectos y mueren antes de que se produzca el desarrollo del cerebelo (véase, por ejemplo, Sanford y col., Development, 124, 2659 (1997)).

30 El nivel de expresión de TGF- $\beta$ 2 no se alteró, en comparación con los controles, en sujetos a los que se administraron ciertas formas de selenio (p. ej., SeM o Sod-Sel). No obstante, cuando se administró a los sujetos (p. ej., suplemento recibido y de la dieta) una composición que comprende Sel-Plex, la expresión de TGF- $\beta$  se reguló por aumento, 2,4 veces (véase el Ejemplo 5). Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de incrementar la función del cerebelo en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, la administración de una composición que comprende selenio (p. ej., suplemento de la dieta diaria que comprende Sel-Plex) a un sujeto aumenta la actividad neuronal (p. ej., aumenta la proliferación neuronal) y/o inhibe la neurodegeneración. La presente invención se refiere a un procedimiento de mantenimiento y/o estabilización de la función neurológica (p. ej., crecimiento y la función de neuronas colinérgicas) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex, en condiciones tales que se aumenta la expresión de TGF. Las composiciones que comprenden Sel-Plex se pueden usar como tratamiento profiláctico con el fin de prevenir la pérdida de función cognitiva (p. ej., mediante regulación por incremento de genes tales como *Lhx8* and TGF- $\beta$  que potencian la función neurológica).

### III. Retraso de la expresión génica asociada con la edad

45 El envejecimiento del cerebro produce alteraciones en la función cognitiva y de las capacidades motoras, y es un factor de riesgo principal para varios trastornos neurológicos habituales, tales como enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson (EP). En estudios recientes se ha sugerido que un envejecimiento cerebral normal se asocia con sutiles alteraciones morfológicas y funcionales en circuitos neuronales específicos, en oposición a la pérdida de neuronas a gran escala (véase, por ejemplo, Morrison y Hof, Science 278, 412-419 (1997)). De hecho, el envejecimiento del sistema nervioso central en diversos especies se mamífero comparte muchas características, tales como atrofia de neuronas piramidales, atrofia sináptica, disminución de los receptores de dopamina estriatales, acumulación de pigmentos fluorescentes, anomalías citoesqueléticas y astrositos reactivos y microglía (Véase, p.ej., Finch and Roth, in Basic Neurochemistry (eds Seigel, G., Agranoff, J.B., Albers, W.R.W., Fisher, S.K. & Uhler, M.D.) 613-633 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999)).

55 Los mecanismos postulados del envejecimiento del SNC incluyen inestabilidad de genomas nucleares y mitocondriales (véase, p. ej., Gaubatz, en Molecular Basis of Aging (ed. Macieira-Coelho, A.) 71-182 (CRC Press, Boca Raton, 1995)), disfunción neuroendocrina (Véase, p. ej., McEwen, Front. Neuroendocrinol. 20, 49-70 (1998)), production of reactive oxygen species (Véase, p. ej., Sohal y Weindruch, Science 273, 59-63 (1996)), metabolismo alterado del calcio (Véase, p. ej., Disterhoft y col., Hypothesis of Aging and Dementia (New York Academy of Sciences Press, New York, 1994), y daño neuronal mediado por inflamación (Véase, p. ej., Blumenthal, J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci. 52, B1-B9 (1997)). La restricción de calorías, única intervención que ralentiza la tasa intrínseca del envejecimiento en mamíferos (Véase, p. ej. Weindruch and Walford, The Retardation of Aging and Disease by

Dietary Restriction (C.C. Thomas, Springfield, Illinois, 1988), retrasa las disminuciones relacionadas con la edad de las tareas psicomotoras y espaciales relacionadas con la memoria (Véase, p. ej. Ingram y col., J. Gerontol. 42, 78-81 (1987)), reduce la pérdida asociada con la edad de espinas dendríticas (Véase, p. ej. Moroi-Fetters y col., Neurobiol Envejecimiento 10, 317-322 (1989)) y reduce la degeneración neuronal en modelos de EP (véase, por ejemplo, Duan and Mattson, J. Neurosci, Neurosci. Res. 57, 195-206 (1999)).

El envejecimiento cerebral se ha caracterizado a nivel molecular (p. ej., mediante el perfil de la expresión génica de la neocorteza y el cerebelo en envejecimiento en ratones (véase, p. ej., Lee y col., Nature Genetics, 25, 294-297 (2000)). Los ratones envejecidos muestran expresión de genes indicativa de una respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y menor soporte neurotrópico. A nivel transcripcional, el envejecimiento cerebral en ratones muestran paralelismos con los trastornos neurodegenerativos humanos (Véase, por ejemplo, Lee y col., Nature Genetics, 25, 294-297 (2000)).

En ratones envejecidos se observó una inducción concertada de los genes de C4, C1qa, Clqb and Clqc, la cascada (véase, por ejemplo, del complemento A nivel transcripcional, el envejecimiento cerebral en ratones muestran paralelismos con los trastornos neurodegenerativos humanos (Véase, por ejemplo, Lee y coll., Nature Genetics, 25, 294-297 (2000)). Como se ha descrito en otro lugar del presente documento, estos genes forman parte del sistema inmunológico humoral implicado en la inflamación y la histolisis, La producción de las proteínas del complemento en el cerebro, que conduce a la generación de fragmentos peptídicos proinflamatorios contribuye al daño neuronal asociado con ictus (véase, por ejemplo, Huang y col., Science 285, 595-599 (1999)) y se ha observado en el estriado de ratas envejecidas.

Además, en ratones envejecidos no se observó una inducción coordinada de los genes que codifican catepsinas. Las catepsinas son los componentes principales del sistema proteolítico lisosomal, Las catepsinas se han visto implicadas en el procesamiento de la proteína amiloide precursora (APP) en  $\beta$ -péptidos amiloides y se inducen en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (véase, por ejemplo,

Se sabe bien que el envejecimiento se asocia con un incremento de la generación oxidativa (véase, por ejemplo, Peinado y col., Anat Rec, 247, 420 (1997)). Por ejemplo, las especies de oxígeno altamente reactivo (ROS) estimulan un amplia gama de daños celulares, incluidos daños a ADN, peroxidación lipídica, alteración de la relación redox intracelular y la inactivación de las enzimas. Un mecanismo clave del huésped en la defensa contra las TOS se realiza por familia de la glutatión-S-transferasas a(GST) QUE protege contra los subproductos de la tensión oxidativa a través de varias reacciones (Hayes Y COL., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45, 51, (2004)).

En consecuencia, la presente invención también se refiere a un procedimiento de retrasar la expresión de los genes asociados con el complemento relacionada genes del complemento (p. ej., C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex (p. ej., suplemento dietario que comprende Sel-Plex) en condiciones tales que se reduce la expresión del gen asociado con el complemento,. La presente invención también se refiere a un tratamiento profiláctico o terapéutico del la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto en riesgo) una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que se reduce la expresión de un gen (C1q, C1q alpha, C1q beta, C1q gamma, o C1qr). La presente invención también se refiere a un procedimiento de retrasar la expresión de los genes asociados con el complemento relacionada genes del complemento (p. ej., C1q, C1q alfa, C1q beta, c1q DE EXPRESIÓN ) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex (p. ej., suplemento dietario que comprende Sel-Plex) en condiciones tales que se reduce la expresión del gen asociado con el complemento,. La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al paciente con enfermedad de Alzheimer una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reducen los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a un mecanismo de acción concreto, la administración de una composición que comprende selenio (Sel-Plex) a un sujeto con Alzheimer reduce los síntomas asociados con el Alzheimer mediante la reducción de la expresión de los genes de catepsina (p. ej, Catepsina D, Catepsina S o Catepsina Z). Las composiciones de la presente invención se pueden usar como tratamiento profiláctico con el fin de prevenir la expresión génica asociada con la edad. Una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse a un sujeto en combinación con una dieta restringida en calorías con el fin de prevenir el envejecimiento (p. ej. atenuar la expresión génica asociada con la edad). La presente invención se refiere a un procedimiento de alteración de cambios en el circuito neuronal (p. ej. los descritos anteriormente) asociados con la edad que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que la expresión de Lhx8 está potenciada y/o elevada (véase el Ejemplo 6). Aunque no es necesario entender el mecanismo, la expresión potenciada y/o elevada de Lhx8 estimula el desarrollo adecuado y/o los trabajos adecuados para mantener los niveles de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (BFCN).

Además, se ha demostrado que hay una significativa regulación por aumento de determinados factores de transcripción en respuesta a una dieta de restricción de calorías, que en sí misma proporciona retraso de la edad (véase, por ejemplo, Nature Genetics, 25, 294-297 (2000)). Por ejemplo, se produjo regulación por aumento de los factores de transcripción homeobox (Hox), que se ha propuesto que están implicados en el desarrollo neural). Usando

las composiciones de la presente invención se demostró que varios factores de transcripción Hox se regulaban por aumento en un sujeto al que se le administró una composición que comprendía selenio (p. ej., Sel-Plex). Aunque no es necesario entender el mecanismo, la expresión potenciada y/o elevada de los factores Hox funciona para mantener una actividad neural normal en un sujeto en envejecimiento.

#### 5 IV. El sistema endocrino y la diabetes

Las composiciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de la diabetes. La Diabetes mellitus es una enfermedad crónica que requiere atención médica a largo plazo, tanto para limitar el desarrollo de sus devastadoras complicaciones como para tratarlas cuando se produzcan. Es una enfermedad desproporcionadamente cara; los pacientes con diagnóstico de diabetes representaron e, 6,2 % de la población de EE.UU. en 2002 o 18,2 millones de personas. En ese año, el coste per cápita de la atención sanitaria para personas con diabetes fue de \$13.243 para personas con diabetes y de \$2560 para personas sin diabetes.

Los dos tipos básicos de diabetes mellitas son de tipo 1 y de tipo 2. La diabetes de tipo 1 es una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza por necrosis de las células de los islotes pancreáticos y una falta completa de secreción de insulina. Los pacientes con diabetes de tipo 1 dependen de insulina. Las complicaciones son similares a las que se describen más adelante para la diabetes de tipo 2. El único tratamiento son las inyecciones de insulina.

La diabetes mellitus de tipo 2 se denominó una vez diabetes de inicio en la edad adulta. Ahora, por la epidemia de la obesidad y la inactividad en niños, la diabetes de tipo 2 se produce a edades cada vez más jóvenes. Aunque la diabetes de tipo 2 normalmente afecta a individuos mayores de 40 años de edad, se ha diagnosticado en niños de incluso 2 años de edad con antecedentes familiares de diabetes.

La diabetes de tipo 2 se caracteriza por una resistencia periférica a la insulina con un defecto de secreción de insulina que varía en cuanto a la gravedad. Para que se desarrolle diabetes de tipo 2 deben existir ambos defectos. Todos los individuos con sobrepeso tienen resistencia a la insulina, pero sólo aquellos con una incapacidad para incrementar la producción de insulina en las células beta desarrollan diabetes. En la progresión de la tolerancia normal a la glucosa a la tolerancia anormal a la glucosa, primero se elevan los niveles de glucosa posprandial. En última instancia, aumenta la gluconeogénesis hepática, lo que tiene como resultado hiperglucemia en ayunas.

Aproximadamente el 90 % de los pacientes que desarrolla diabetes de tipo 2 son obesos. Dado que los pacientes con diabetes de tipo 2 conservan la capacidad para secretar algo de insulina endógena, aquéllos que toman insulina no desarrollan DKA si dejan de tomarla por alguna razón. Por tanto, se considera que requieren insulina, pero no dependen de la insulina. Además, los pacientes con diabetes de tipo 2 no suelen necesitar tratamiento con medicamentos antidiabéticos orales o con insulina si pierden peso.

La diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (MODY) es una forma de diabetes de tipo 2 que afecta a muchas generaciones de la misma familia con inicio en individuos menores de 25 años de edad. Existen varios tipos. Algunos de los genes responsables se pueden detectar usando ensayos comercialmente disponibles.

La diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante la gestación. La DMG es una complicación en aproximadamente el 4 % de todos los embarazos en EE.UU., aunque las tasas pueden ser de 1-14 % en función de la población estudiada. La DMG puede conducir a una macrosomía fetal, hipoglucemia, hipocalcemia e hiperbilirrubinemia. Además las madres con DMG presentan mayores índices de partos por cesárea e hipertensión crónica. Para detectar la DMG, se debe realizar un ensayo de cribado de 50 g de glucosa a las 24-28 semanas de gestación. A esto le sigue un ensayo de tolerancia a la glucosa oral con 100 g, 3 horas, si la concentración de glucosa en plasma del paciente a 1 hora tras el cribado es superior a >140 mg/dl.

Aproximadamente 13 millones de personas en EE.UU. presentan un diagnóstico de diabetes y la diabetes pasa desapercibida en otros 5 millones. Aproximadamente el 10 % tienen diabetes de tipo 1 y el resto de tipo 2.

La morbilidad y la mortalidad asociadas con la diabetes están relacionadas con las complicaciones a corto y a largo plazo. Las complicaciones incluyen hipoglucemia e hiperglucemia, aumento del riesgo de infecciones, complicaciones microvasculares (p. ej., retinopatía, nefropatía), complicaciones neuropáticas y enfermedad macrovascular.

La diabetes es la principal causa de ceguera en adultos de 20-74 años de edad, así como la causa principal de amputación no traumática de la extremidad inferior y de enfermedad renal terminal (ESRD).

La diabetes mellitus de tipo 2 es más prevalente entre hispanos, nativos americanos, afroamericanos y asiáticos/nativos de las islas del pacífico que en los blancos no hispanos. La incidencia es esencialmente igual en las mujeres y en los varones en todas las poblaciones. La diabetes de tipo 2 es cada vez más frecuente porque las personas viven más y la prevalencia de la diabetes aumenta con la edad. También se observa con mayor frecuencia ahora que antes en personas jóvenes, en asociación con la creciente prevalencia de la obesidad en la infancia.

Aunque la diabetes de tipo 2 sigue siendo más frecuente en adultos de 40 años de edad o mayores, aunque la incidencia de la enfermedad está aumentando cada vez con más rapidez en adolescentes y adultos jóvenes en otros

grupos de edad.

La neurogenina 3 (Neurog3) es un factor de transcripción clave en la diferenciación del páncreas endocrino. Neurog3 es una parte importante de la vía de la activación para la expresión del gen de la insulina y ayuda a mejorar la tolerancia a la glucosa (véase, p. ej., Watada, Endocrine Journal, 51, 255 (2004)). Se piensa que niveles menores a los normales (p. ej., subexpresión) de Neurog 3 desempeñan un papel en ciertos tipos de diabetes (véase, p. ej., Lee y col., Genes Dev. 16: 1488 (2002)).

La prueba de la glucosa con punción digital es adecuada para el diagnóstico de casi todos los pacientes con diabetes. En pacientes que presentan síntomas de diabetes no controlada (p. ej., poliuria, polidipsia, nicturia, fatiga, pérdida de peso) con un nivel de glucosa en plasma aleatorio confirmatorio > 200 mg/dl, se puede diagnosticar diabetes.

En paciente asintomáticos cuyo nivel de glucosa en suero aleatorio sugiere diabetes, se debería medir la concentración de glucosa en plasma en ayunas (FPG). El ensayo de la tolerancia a la glucosa oral ya no se recomienda como diagnóstico de rutina de la diabetes. Un nivel de FPG >126 mg/dl dos veces distintas es un diagnóstico de diabetes. Un nivel de FPG de 110-125 mg/dl se considera IFG alterada. Un nivel de FPG <110 mg/dl se considera tolerancia normal a la glucosa, aunque los niveles de glucosa en sangre superiores a >90 mg/dl se pueden asociar con un incremento del riesgo del síndrome metabólico si hay otras características presentes.

En la diabetes de tipo 1 precoz pero no en la diabetes de tipo 2 hay autoanticuerpos frente a las células de los islotes. Las mediciones de estos autoanticuerpos en un plazo de 6 meses desde el diagnóstico puede ayudar a diferenciar la diabetes de tipo 1 de la de tipo 2.

La mayoría de los pacientes diabéticos tienen diabetes de tipo 2 y la mayoría de estos son asintomáticos en el momento del diagnóstico. El tratamiento inicial para estos pacientes es un ensayo de terapia de nutrición médica (TNM, terapia de dieta). Por tanto, si en un paciente asintomático se encuentran accidentalmente niveles de glucosa en sangre elevados en el ED, el médico de atención primaria del paciente puede realizar un seguimiento. Los pacientes con síntomas leves de diabetes mal controlada y sin diagnóstico previo suelen poder tratarse de forma ambulatoria, a menudo con una dosis baja inicial de una sulfonilurea o metformina.

El tratamiento de los pacientes marcadamente sintomáticos con diabetes de tipo 2 recién descubierta y niveles de glucosa > 400 mg/ml es controvertido. Si se puede disponer un seguimiento estrecho, se puede iniciar la administración de dosis máximas de un agente sulfonilurea y se pueden tratar como pacientes ambulatorios. En general, los pacientes se sienten mejor en 1-2 días y, en una semana, sus niveles de glucosa en sangre son marcadamente menores. Su dosis de sulfonilurea se puede reducir progresivamente a medida que cumplen la TNM; en algunos, la diabetes se puede controlar solo con dieta. Los pacientes que no pueden beber cantidades adecuadas de fluidos, aquellos con graves afecciones médicas coexistentes (p. ej., infarto de miocardio (IM), infección sistémica) y aquellos sin un seguimiento fiable deberán ser hospitalizados para iniciar terapia.

El objetivo de la terapia antidiabética oral es disminuir los niveles de glucosa en sangre hasta niveles casi normales (niveles preprandiales de 90-130 mg/dl u 80-140 mg/dl y niveles de HBA1C < 7 %) y mantenerlos en este intervalo durante toda la vida del paciente. Los pacientes sin síntomas o con síntomas leves deberán tratarse inicialmente con TNM (terapia de dieta) y la TNM deberá alentarse a lo largo de todo el tratamiento. Los fármacos se inician cuando un paciente presente síntomas moderados o marcados de diabetes.

El tratamiento de la diabetes de tipo 2 está dirigido a reducir la resistencia a la insulina y aumentar la función de las células beta. En muchos pacientes, la disfunción de las células beta empeora con el tiempo y requieren insulina exógena. Dado que los pacientes con diabetes de tipo 2 tienen resistencia a la insulina y disfunción de las células beta, a menudo se administra la medicación oral para incrementar la sensibilidad a la insulina (p. ej., metformina, una tiazolidindiona (TZD)) con una insulina de acción intermedia (p. ej., protamina neutra, Hagedorn (NPH)) a la hora de acostarse o con una insulina de acción prolongada (p. ej., glargina (Lantus) insulina, insulina detemir (Levemir)) administrada por la mañana o por la noche. Un secretagogo de la insulina, como un agente sulfonilurea, también se puede administrar para incrementar la secreción de insulina preprandial.

Los fármacos incluyen miméticos de la incretina (p. ej., Exenatida (Byetta)) que simulan la secreción de insulina dependiente de glucosa, suprime la secreción de glucagón elevada y retrasa el vaciado gástrico, agentes sulfonilurea (p. ej., clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, acetohexamida, gliburida, glipizida y glimepirida) que reducen la glucosa incrementando la secreción de insulina en las células beta pancreáticas en pacientes con función residual de las células beta, Meglitinidas (p. ej., Repaglinida (Prandina)) que son secretagogos de insulina de acción corta, Biguanidas (p. ej., Metformina (Glucophage)) que incrementan la sensibilidad a la insulina disminuyendo la gluconeogénesis hepática (efecto principal) e incrementando la sensibilidad a la insulina periférica (efecto secundario), inhibidores de la alfa-glucosidasa (AGIS) (p. ej., Acarbosa (Precosa), Miglitol (Glyset)) que inhiben la acción de la alfa-glucosidasa (digestión de los carbohidratos), retrasando y atenuando los picos de glucosa en sangre posprandiales, tiazolidindionas (p. ej., Pioglitazona (Actos), Rosiglitazona (Avandia)) que incrementan la sensibilidad a la insulina periférica incrementando la transcripción de las proteínas nucleares que aumentan la captación de glucosa, probablemente con efectos sobre los niveles de ácidos grasos libres, análogos

de amilina (p. ej., acetato de Pramlintida (Syrnlin)) que tienen efectos de amilina endógena retrasando el vaciado gástrico, disminuyendo la liberación de glucagón posprandial, y modula el apetito. Se puede usar Sel-Plex en combinación con los agentes descritos anteriormente.

5 Usando las composiciones de la presente invención se determinó que la expresión de Neurog3 estaba significativamente regulada por aumento, 1,7 veces, en los sujetos a los que se administró una composición que comprende Sel-Plex, mientras que los sujetos los que se administró tratamientos con SeM o Sod-sel no mostraron una alteración significativa de la expresión de Neurog3 (véase el Ejemplo 6).

10 Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto (p. ej., un sujeto con diabetes) que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex en condiciones tales que se altera (p. ej., se potencia) la expresión de un gen de Neurog3 en el sujeto. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, la administración a un sujeto con diabetes de una composición que comprende Sel-Plex mejora la tolerancia a la glucosa en el sujeto a través de la regulación por incremento de la expresión de Neurog3. La presente invención se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto con diabetes que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex con uno o más agentes adicionales (p. ej., vanadio, o los descritos anteriormente). La presente invención también se refiere a un procedimiento de potenciar la expresión de Neurog3 en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio en condiciones tales que se potencia la expresión de Neurog3. La composición que comprende selenio puede comprender Sel-Plex. La composición que comprende Sel-Plex puede comprender también una o más formas de selenio, por ejemplo Sod-sel.

#### V. Composiciones y formulaciones que comprenden selenio

20 La FDA ha establecido los niveles nutricionales de selenio (véase 21 C.F.R. 101.9(c)(8)(iv), enero de 1994). Los seres humanos y los animales pueden metabolizar de un modo seguro cantidades limitadas de formas tanto orgánicas como inorgánicas de selenio, y pueden convertir el selenio no metilado en derivados mono, di o trimetilados, de los que los derivados monometilados son los más tóxicos. (Véase, p. ej., Bedwal, R. S., y col., Medical Hypotheses, 41 (2):150-159 (August 1993)). La FDA ha adoptado las ingestas diarias de referencia (IDR) de 25 70 microgramos de selenio. La dosis de selenio de 600 microgramos al día se ha notificado que es segura. Véase, por ejemplo, Ferris G. M. Lloyd, y col., App. Clin. Biochem., 26:83-88 (1989)). A aproximadamente esta dosis, la actividad normal de la enzima glutatión reductasas convierte el seelenoglutaión en seleniuro de hidrógeno en el hígado y los eritrocitos, para, en última instancia, excretarse. Por tanto, a estas dosis menores, el cuerpo es capaz de metabolizar de forma segura y excretar el selenio presente en una forma metálica libre. No obstante, como ocurre con muchos oligoelementos (p. ej., el selenio), a niveles de dosis o concentraciones elevadas, los efectos 30 beneficiosos se invierten y se manifiesta una toxicidad peligrosa. Véase, por ejemplo, Fumsinn, C. y col., Internat'l J. of Obesity and Related Metab. Dis., 19(7):458-463 (1995)).

35 Por tanto, la administración de selenio en forma natural implica un trueque científico y médico porque, cuando se administra a concentraciones relativamente bajas, el selenio proporciona efectos beneficiosos sobre la salud, sin embargo, a concentraciones más altas, exhibe una toxicidad enorme, de modo que se pierden los posibles beneficios y la toxicidad pasa a ser el principal motivo de preocupación.

40 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención demuestra, por primera vez, que una cierta forma de selenio (Sel-Plex) puede proporcionar efectos beneficiosos a un sujeto que otras formas de selenio (p. ej., selenometionina) no pueden. La fuente de selenio puede ser una fuente sintética o natural, y el selenio puede ser orgánico o inorgánico. Las pruebas han demostrado que las formas orgánicas de selenio (p. ej., seleniometionina y levadura enriquecida con selenio) pueden ser menos tóxicas y ser mejor absorbidas que las formas inorgánicas (véase, p. ej., Mahan, Proceedings of the 15th Annual Symposium Nottingham University Press, Nottingham, UK, pág. 523-535 (1999)). Como se ha descrito en el presente documento y dependiendo de la diana que se desee tratar en un sujeto (p. ej., la expresión génica implicada en una enfermedad neurodegenerativa o de otro tipo), se pueden 45 usar múltiples formas de selenio de forma intercambiable o en combinación entre sí. Las fuentes naturales de selenio incluyen, entre otras, levadura enriquecida con selenio (p. ej., selenizada). La cepa de levadura usada no es limitante.

50 Sel-Plex (Alltech, Lexington, KY) es la forma de selenio de elección para formulaciones y composiciones. Las composiciones que comprenden Sel-Plex proporcionan una forma más biológicamente disponible de selenio en comparación con otras formas de selenio (véas el Ejemplo 9). No obstante, otras formas de selenio también pueden ser útiles, incluyendo derivados o modificaciones de Sel-Plex u otras formas de levadura enriquecida con selenio, selenometionina, selenocisteína, u compuesto de selenito, un compuesto de selenito o derivados, sales o modificaciones de las mismas. Por tanto, cada una de estas formas de selenio se pueden usar como componente de una formulación. Como alternativa, cada una de las formas descritas anteriormente de selenio pueden estar unidas 55 (p. ej., química o físicamente) a un fármaco o agente terapéutico (p. ej., un agente terapéutico para el Alzheimer) para formar un derivado de selenio-fármaco. Además, las composiciones y formulaciones no se limitan a una forma de selenio. De hecho, una composición o formulación puede comprender múltiples formas de selenio (p. ej., Sel-Plex y Sod-sel).

Otras formas de selenio que pueden ser útiles se describen en las patentes de EE.UU. N° 6,911,550 6,197,295, 5,221,545, 6 y 6,576,233, y las solicitudes de patente de EE.UU. N° 20010043925, 20050069594 y 20050089530.

5 De acuerdo con esto, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que pueden comprender una o más formas de selenio, solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, o agente terapéutico para el Alzheimer, y puede administrarse en cualquier transportador farmacéutico estéril biocompatible, incluidos, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua.

10 Los procedimientos de la presente solicitud encuentran uso en el tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico) de enfermedades o estados fisiológicos alterados. El selenio (p. ej., Sel-Plex) se puede administrar a un sujeto (p. ej., un paciente) por vía intravenosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución fisiológica salina. Se pueden usar procedimientos estándar para la liberación intracelular de compuestos (p. ej., liberación mediante liposomas). Dichos procedimientos son bien conocidos para los expertos habituales en la técnica. Las formulaciones de la presente invención son útiles para administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

15 Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para un sujeto cualquiera pueden depender de muchos factores, incluidos el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se va a administrar, el sexo, la hora y la vía de administración, el estado de salud general y la interacción con otros fármacos que se estén administrando de forma concurrente.

20 De acuerdo con esto, las formulaciones y/o composiciones que comprenden selenio tal como se definen en las reivindicaciones se pueden administrar a sujeto en monoterapia o en combinación con otras formas de selenio, fármacos, moléculas pequeñas o en composiciones farmacéuticas en las que se mezcla con excipiente(s) u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. EL vehículos farmacéuticamente aceptable puede ser farmacéuticamente inerte. En otra realización de la presente invención, las composiciones que comprenden selenio, tal como se definen en las reivindicaciones se pueden administrar en monoterapia a un sujeto individual o que padece enfermedad de Alzheimer. Las composiciones que comprenden selenio (p. ej., Sel-Plex solo o en combinación con una o más formas adicionales de selenio) se pueden añadir a una bebida o alimento nutricional (p. ej., ENSURE, POWERBAR, o similar), productos multivitamínicos nutricionales, productos alimentarios etc. para su consumo diario.

25 En función de la diana que se desea alterar mediante el tratamiento (p. ej. expresión génica asociada con el envejecimiento), estas composiciones farmacéuticas se pueden formular y administrar sistémica o localmente. Las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.). Las vías adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral o transmucosa, así como liberación parenteral, incluida la administración intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, o intranasal.

30 Para inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Para la administración tisular o celular, en la formulación se usan penetrantes adecuados para atravesar la barrera concreta. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

35 En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular usando soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica con posologías adecuadas para la administración oral. Dichos vehículos permiten formular las composiciones farmacéuticas en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y similares, para ingestión oral o nasal por el paciente que se va a tratar.

40 Composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito previsto. Por ejemplo, una cantidad eficaz del agente farmacéutico puede ser la cantidad que altere la expresión de un gen específico (p. ej., Lhx8, presenilinas 1, presenilinas 2, o Apbb1). La determinación de las cantidades eficaces entra bien en de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación proporcionada en el presente documento.

45 Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración oral, puede estar en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, o soluciones.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse de un modo conocido en la técnica, por ejemplo por medio de procedimientos convencionales mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, trituración, emulsificación, encapsulación, atropamiento o liofilización.

55 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Además se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como

- 5 suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones muy concentradas.
- 10 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante combinación de compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir las sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son cargas de hidratos de carbono o de proteínas, tales como azúcares, incluidos lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; y gomas, incluidas arábica y de tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio.
- 15 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentrado, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación de productos o para caracterizar la cantidad de compuesto activo (es decir dosificación).
- 20 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites
- 25 grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.
- Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéutico aceptable se pueden preparar, introducir en un contenedor adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección para la que están indicadas. Para las composiciones o formulaciones que comprenden selenio, las afecciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de la afección relacionada con el tratamiento profiláctico o terapéutico de
- 30 enfermedad neurodegenerativa o la función cognitiva.
- La composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de una sal y se puede formar con ácidos, incluidos, entre otros, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que son las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado en histidina 1 mM-50 mM, sacarosa 0,1 %-2 %, manitol
- 35 2 %-7 % a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5 que se combina con tampón antes de usar.
- Para cualquier compuesto usado en los procedimientos de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Después, preferentemente, la dosis se puede formular en modelos animales (particularmente modelos murinos) para conseguir un intervalo de concentración circulante deseable.
- 40 Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad que mejora o previene los síntomas de un estado patológico o afección (p. ej., alterando la expresión génica). La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DE<sub>50</sub>/DL<sub>50</sub>. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios animales adicionales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. Las dosis de tales compuestos están, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o nula toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.
- 50 Un médico o un sujeto pueden escoger la dosificación exacta según el paciente que se va a tratar. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado (p. ej., la alteración de la expresión génica en un sujeto). Entre los factores adicionales que se pueden tener en cuenta se incluyen la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, la(s) combinaciones de fármacos, las sensibilidades de la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada podrían administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y el índice de aclaramiento de la formulación concreta.
- 55

El selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse al sujeto a una dosis diaria de entre 25 y 800 µg de selenio al día (p. ej., el Sel-Plex se administra a un sujeto de un modo tal que proporcione entre 25 y 800 µg de selenio al sujeto al día). El selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse a una dosis diaria de entre 200 y 500 µg al día. El selenio se puede administrar a una dosis diaria de entre 200 y 400 µg al día. Se pueden usar dosis fuera de este intervalo de 25 a 800 µg. Una única dosis de selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) puede administrarse una vez al día o 2, 3, 4 o más dosis se pueden administrar todos los días (p. ej., una vez por la mañana y una vez por la noche, o una vez cada 4-6 horas). Por ejemplo, el selenio se administra a un sujeto en tres dosis separadas, más de tres dosis separadas, dos dosis separadas o menos de dos dosis separadas. La dosis diaria puede administrarse en una cápsula de liberación de una vez. La dosis diaria puede ser de entre 25-75 µg de selenio. La dosis diaria puede ser de 200 µg de selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una serie de modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y en las membranas mucosas, incluida administración vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluido mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo administración intratecal o intraventricular. Las composiciones y formulaciones que comprenden selenio se cree que son particularmente útiles para administración oral.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, atomizadores, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables transportadores farmacéuticos convencionales, acuosos, polvo o bases oleosas, espesantes y similares.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen, polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, sellos o comprimidos. Puede ser deseable usar espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o aglutinantes.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden también contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, entre otros, potenciadores de la penetración, compuestos transportadores y otros transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Por tanto, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, entre otras, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, entre otros, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar de forma conveniente en forma de monodosis, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el(los) transportador(es) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha los ingredientes activos con vehículos de líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o con ambos y, después, en caso necesario, dando forma al producto.

Por tanto, en algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles, tales como, entre otros, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular en forma de suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluidas, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se pueden formular y usar como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, entre otras, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final.

Las composiciones de la presente invención pueden contener además, otros componentes adyuvantes encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles farmacéuticamente activos, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. No obstante, dichos materiales, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se

desea, mezclar con agentes adyuvantes, por ejemplo lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales de influencia sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no interaccionan de forma perjudicial con el(los) ácidos nucleicos de la formulación.

- 5 En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) Sel-Plex y (b) uno o más agentes adicionales (p. ej., agente terapéutico del Alzheimer). Ejemplos de dichos agentes terapéuticos para el Alzheimer se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, dos o más agentes combinados (p. ej., agentes terapéuticos para el Alzheimer) se pueden usar juntos o de forma secuencial.

10 La presente invención también se refiere a procedimientos que implican la coadministración de compuestos que comprenden selenio descritos en el presente documento con uno o más agentes activos adicionales (p. ej., agentes terapéuticos para el Alzheimer, antioxidantes, etc.). De hecho, es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar composiciones que se puedan usar en procedimientos para potenciar terapias y/o composiciones farmacéuticas de la técnica anterior coadministrando una composición que comprende selenio como se ha definido en las reivindicaciones. En los procedimientos de coadministración, los agentes se pueden administrar de forma  
15 concurrente o secuencial. Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar antes que el o los otros agentes activos. Las formulaciones farmacéuticas y modos de administración pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente. Además, los dos o más agentes coadministrados pueden administrarse, cada uno, usando diferentes modos o diferentes formulaciones.

20 El agente o agentes que se van a coadministrar dependen del tipo de afección que se esté tratando. Por ejemplo, cuando la afección que se está tratando es una enfermedad neurodegenerativa, el agente adicional puede ser un agente terapéutico para el Alzheimer, un agente terapéutico para el ELA, un agente terapéutico para Huntington o similar. Cuando la afección que se está tratando es diabetes, el agente adicional puede ser un agente terapéutico para la diabetes. Cuando la afección que se está tratando es la función cognitiva, el agente adicional puede ser un  
25 antioxidante. Los agentes adicionales que se van a coadministrar, tal como un agente terapéutico para el Alzheimer, agentes terapéuticos para la diabetes; o antioxidantes, pueden ser cualquiera de los agentes bien conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, los que actualmente están en uso clínico.

30 El tratamiento de las diversas enfermedades y trastornos descritas en el presente documento a menudo están limitados por los siguientes dos factores principales. (1) el desarrollo de resistencia al fármaco y (2) la toxicidad de agentes terapéuticos conocidos. Algunos agentes terapéuticos tienen efectos secundarios perjudiciales, incluidas linfotoxicidad inespecífica y toxicidad renal.

35 Los procedimientos descritos en el presente documento abordan ambos problemas. La resistencia a fármacos, cuando se requieren dosis crecientes para alcanzar el beneficio terapéutico, se supera coadministrando los compuestos que comprenden selenio descritos en el presente documento con el agente conocido. Los compuestos descritos en el presente documento sensibilizan las células diana frente a agentes conocidos (y al contrario), y, en consecuencia, se necesitan menos de estos agentes para alcanzar un beneficio terapéutico.

40 La función de sensibilización de los compuestos reivindicados también aborda los problemas asociados con los efectos tóxicos de agentes terapéuticos conocidos. En los casos en los que el agente conocido es tóxico, es deseable limitar las dosis administradas en todos los casos y, en particular, en los casos en los que la resistencia al fármaco ha aumentado la dosis necesaria. Por tanto, cuando los compuestos reivindicados se coadministran con el agente conocido, reducen la dosis requerida, lo que, a su vez, reduce los efectos perjudiciales. Además, dado que los propios compuestos reivindicados son tanto eficaces como no tóxicos a dosis moderadas, la coadministración de proporcionalmente más de estos compuestos que los agentes terapéuticos tóxicos conocidos alcanzarán los efectos  
45 deseados al tiempo que se minimizan los efectos tóxicos.

## VI. Antioxidantes

45 En algunas realizaciones de la presente invención, los antioxidantes se administran conjuntamente con composiciones o formulaciones de la presente invención. La presente invención no está limitada por el tipo de antioxidante usado. De hecho, se contemplan varios antioxidantes útiles en la presente invención, incluidos, entre otros, difenilaminas alquiladas, N-fenilendiaminas alquiladas, fenil- $\alpha$ -naftilamina, fenil- $\alpha$ -naftilamina alquilada, dimetilquinolinas, trimetildihidroquinolinas y composiciones oligoméricas derivadas de las mismas, fenoles  
50 impedidos, hidroquinonas alquiladas, tiodifeniléteres hidroxilados, alquilidienbisfenoles, tiopropionatos, ditiocarbamatos metálicos, 1,3,4-dimercaptotiazol y derivados, compuestos de cobre solubles en aceite y similares, Naugalube® 438, Naugalube 438L, Naugalube 640, Naugalube 635, Naugalube 680, Naugalube AMS, Naugalube APAN, Naugard PANA, Naugalube TMQ, Naugalube 531, Naugalube 431, Naugard BHT, Naugalube 403 y Naugalube 420, ácido ascórbico, tocoferoles incluidos derivados (p. ej., palmitato de ascorbilo y polipéptido de ascorbilo), hidroxitolueno butilado, retinoides (p. ej., retinol y palmitato de retinilo), tocotrienoles, ubiquinona, extractos que contienen flavonoides e isoflavonoides y sus derivados (p. ej., genisteína y diadzeína), extractos que contienen resveratrol y similares, semilla de uva, té verde, corteza de pino, própolis, Irganox 1010, 1035, 1076, 1222 (fabricado por Ciba Specialty Chemicals Co., Ltd.), antígeno P, 3C, FR, SUMILIZER GA-80 (fabricado por Sumitomo  
55 Chemical Industries Co., Ltd.), beta-caroteno, licopeno, vitaminas C, E y AM y otras sustancias.

Por ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento de protección contra los subproductos de estrés oxidativo en tejido cerebral, que comprende administrar a un sujeto una composición que comprende Sel-Plex. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, la administración a un sujeto de una composición que comprende Sel-Plex reduce la expresión de los genes GST (p. ej., Gstp1, Gstz1 y Gstm7) en el sujeto. La administración a un sujeto de una composición que comprende Sel-Plex reduce el nivel de daño en el ADN en el tejido cerebral (p. ej., neocórtex) de un sujeto. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, el tratamiento con composiciones de la presente invención (p. ej. suplementar la dieta con Sel-Plex) estabiliza la homeostasis celular (p. ej., en el cerebro) de un modo tal que se reduce la expresión de genes inducibles por daños en el ADN (p. ej. Gadd45b).

La presente invención se refiere a un procedimiento de reducir la sensibilidad de las células a la citotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que comprende administrar a las células una composición que comprende Sod-sel y/o Sel-Plex en condiciones tales que se altera (p. ej., se incrementa) la expresión de SelW (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3). La presente invención se refiere además a un procedimiento de reducir la expresión de SelW en un sujeto que comprende administrar una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex y/o Sod-sel) y un antioxidante en condiciones tales que se altera la expresión de SelW. La presente invención se refiere a un procedimiento de estimular en un sujeto la reparación de proteínas dañadas por oxidación que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sod-sel y/o Sel-Plex en condiciones tales que se altera (p. ej., se incrementa) la expresión de SelR (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3).

La presente invención se refiere además a un procedimiento de reducir los radicales superóxido en un sujeto (p. ej., en un sujeto que experimenta tensión oxidativa), que comprende administrar al sujeto una composición (p. ej. un suplemento nutricional que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex). Además, la presente invención se refiere a sujetos que reciben ciertas composiciones que comprenden selenio (p. ej., suplementos de selenio que comprenden Sel-Plex) que tienen una mayor capacidad para tratar con el estrés oxidativo. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, los sujetos que reciben una composición que comprende selenio (p. ej., un suplemento dietético que comprenda Sel-Plex) tiene una mayor capacidad para afrontar el estrés oxidativo debido a la capacidad de seleccionar formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) para alterar (p. ej., reducir) el nivel de radicales superóxido en el sujeto.

La reducción de los radicales superóxido se produce en los cerebros (p. ej., en la corteza cerebral) de sujetos tratados con las composiciones y procedimientos de la presente invención (véase, por ejemplo, el Ejemplo 10 más adelante). Se contempla que las composiciones y procedimientos de la presente invención encuentren uso en varias situaciones, incluidas investigación y diagnóstico clínico. Por ejemplo, las composiciones y procedimientos de la presente invención también encuentran uso en estudios del metabolismo de la APP (p. ej., mediante análisis de proteínas y sustancias farmacéuticas capaces de alterar los niveles de las mismas) y en estudios in vivo para observar la patología de la enfermedad de Alzheimer. Además, los procedimientos para cuantificar la proteína de β-amiloide oligomérica y/o fibrilar en las muestras encuentran uso en la monitorización y/o determinación de la eficacia del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, ya que se contempla que disminuir los niveles de ensamblajes de proteína de β-amiloide oligomérica en las muestras de un sujeto en el tiempo indica la eficacia de un tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En el presente documento también se divulga un procedimiento de identificación de tratamientos nuevos para enfermedades neurodegenerativas (p. ej., enfermedad de Alzheimer), que comprenden tratar a un sujeto que presenta una enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer) con una composición que comprende selenio (p. ej., selenio orgánico (p. ej., levadura selenizada (p. ej., Sel-Plex))) en condiciones tales que la se altera expresión del nivel de un gen asociado con la enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer) (p. ej., presenilina 1, presenilina 2) y, después, coadministrar uno o más compuestos de ensayo, en los que los uno o más compuestos de ensayo se estudian para determinar la capacidad para alterar la expresión de un gen asociado con enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer) (p. ej., presenilina 1, presenilina 2). Los cambios en los niveles de expresión de un gen asociado con enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer) son indicativos de un compuesto que podría usarse para tratar la enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer). Estos procedimientos se pueden usar para detectar compuestos para otras enfermedades y afecciones (p. ej., los descritos en el presente documento).

Los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención abarcan sujetos humanos y no humanos, y muestras de dichos sujetos y también arcan investigación, así como aplicaciones diagnósticas. Por tanto, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sujeto y/o situación de aplicación.

## SECCIÓN EXPERIMENTAL

Los ejemplos siguientes se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención.

### Ejemplo 1

#### Materiales y procedimientos

Cuidados de animales. Ratones C57BL/6J macho se introdujeron de forma independiente en jaulas y se comenzó a

administrar dietas experimentales descritas a continuación inmediatamente después del destete (21 días de edad). Se mantuvo a los ratones en la Instalación de Envejecimiento de Roedores Compartida en el William S. Middleton Memorial Veterans Administration Medical Center (Madison, WI).

5 La temperatura y la humedad se mantuvieron a niveles constantes. Se controló la luz de la habitación para proporcionar ciclos de 12 horas de luz y oscuridad.

10 Harlan Teklad (Madison, WI) crearon dietas experimentales. El contenido en selenio de las dietas fue determinada por Covance Inc. (Madison, WI). Cinco (5) animales se incluyeron en cada uno de los grupos de tratamiento siguientes: Una dieta deficiente en selenio (SD); una dieta suplementada con selenometionina (SM, obtenida en Sigma, St. Louis, MO) de forma que el contenido final de selenio de la dieta era una (1) parte por millón; una dieta suplementada con selenito sódico (SS, Sigma) de modo que la concentración de selenio de final de esta dieta era una (1) parte por millón; o una dieta suplementada con la levadura de selenio Sel-Plex (SP, Alltech, Lexington, Ky), de modo que la concentración final de selenio en esta dieta era una (1) parte por millón. Sel-Plex. Se proporcionó a los ratones agua y su correspondiente dieta *ad libitum* durante 100 días. Las dietas se almacenaron en oscuridad a 4 °C y se añadió una dieta fresca al alimentador dos veces a la semana.

15 Preparación de la muestra tisular y análisis de micromatriz. Se sacrificó a los ratones a los 100 días de edad mediante dislocación cervical. Para los estudios de expresión en intestino, el intestino se aclaró dos veces con solución salina y se midió el intestino delgado y se dividió en tres segmentos iguales. Se cortó una región de 3 cm del segmento medio del intestino delgado correspondiente al yeyuno (~300 mg de tejido) y se aclaró de nuevo con solución salina fisiológica para eliminar completamente los contenidos, se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Para estudios en el cerebro (p. ej., corteza cerebral), se separó la corteza cerebral del tejido cerebral adyacente y se ultracongeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

25 Se aisló el ARN total usando el procedimiento con isotiocianato de guanidinio de TRIZOL (Life Technologies, Grand Island, NY) y se usaron muestras individuales para los perfiles de expresión génica. El ARN total se limpió mediante el kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Se preparó el ARN diana convirtiendo 5 mg de ARN total en ADNc bicatenario usando el kit para síntesis using GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) con un cebador (dT)<sub>24</sub> de T7 que incorpora un promotor de la ARN polimerasa de T7. Después de limpiar el ADNc bicatenario usando Genechip Sample Cleanup Module (Affymetrix, Santa Clara, CA), se sintetizó ARNc marcado con biotina a partir del ADNc bicatenario usando reactivos GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents para marcaje con IVT (Affymetrix, Santa Clara, CA). El ARNc marcado con biotina se limpió usando Genechip Sample Cleanup Module y se fragmentó calentando (35 minutos a 94 °C).

35 Quince (15) µg de fragmentos de ARNc se hibridaron (¡6 horas a 45 °C) con Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) usando el GeneChip Hybridization Oven 640. tras la hibridación, los pedazos de gen se lavaron automáticamente y se tiñeron con antiestreptavidina biotilada estreptavidina-ficoeritrina usando Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450. Los pedazos de ADN se escanearon con Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, CA) para detectar las intensidades de la señal celular por láser. Todos los cálculos se realizaron con Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS), versión 1.3, tras el escaneado.

#### Análisis de datos

40 1. La hoja de cálculo que contiene los identificadores del conjunto de sondas y los valores de la intensidad de señal se abrieron en Microsoft Excel (versión 11.1.1 para el sistema operativo OS-X de Macintosh) y se generaron estadísticas resumen (intensidad media de la señal para cada grupo de tratamiento, error estándar de la media). Se realizaron dos pruebas t de dos colas (igual varianza) para los siguientes grupos de tratamiento: SM vs. SD, SS vs. SD, ySP vs. SD. Además, se calculó una "puntuación de la intensidad de la señal" para cada conjunto de sondas como la suma de las intensidades de señal para todos los pedazos (N= 20).

45 2. El archivo de anotación más reciente se descargó del sitio web de Affymetrix. Los datos de este archivo se usaron para anotar los datos de la expresión génica en la Etapa 1. El archivo resultante se exportó en forma de un archivo de valores separados por una coma (CSV).

3. El archivo de CSV de la Etapa 2 se importó a una aplicación de base de datos (MySQL versión 4.1.12 para el sistema operativo OSX de Macintosh).

50 4. Usando MySQL, los identificadores del conjunto de sondas que terminaban con las letras "\_x\_at" y "\_s\_at" se eliminaron del conjunto de datos. De acuerdo con Affymetrix, los conjuntos de sondas con estas extensiones no realizan el mapa de genes únicos (es decir, transcritos de más de n gen pueden hibridar con un conjunto de sondas) Después de eliminar estos conjuntos de sondas, los datos se exportaron como un archivo CSV.

55 5. El archivo de la Etapa 3 se abrió en Microsoft Excel para identificar múltiples apariciones del mismo gen dentro del conjunto de datos. Cuando se determinó que dos (o más) conjuntos de sondas representaban el mismo gen, el conjunto de sondas con la mayor "puntuación de intensidad de señal" (véase la Etapa 2) se retuvo y el(los) conjunto(s) de sondas adicionales se eliminaron del conjunto de datos. En esta etapa, cada conjunto de sondas solo representa un único transcrito y, por ello, en lo sucesivo, la expresión "conjunto de sondas" es

intercambiable con el término "gen".

- 5 6. Se creó una columna nueva en los archivos de datos para incluir información sobre cómo la expresión de un gen concreto estaba afectada por el tratamiento de la dieta. Usando los valores p de las pruebas t descritas en la etapa 1, los genes se clasificaron en una de las categorías siguientes (y esta información se anotó en la columna siguiente); obsérvese que "estadísticamente significativo", como se hace referencia más adelante, significa que el(los) valor(es) o de interés era(n)  $\leq$  (menor o igual que) 0,01:
- a. "Específico de SelMe.": Hay un cambio significativo en la expresión de este gen únicamente en la comparación SM frente a SD (es decir, la expresión del gen no era estadísticamente significativamente diferente de las comparaciones SS frente a SD o SP frente a SD.
- 10 b. "Específico de SodSel": Hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión de este gen únicamente en la comparación de SS frente a SD.
- c. "Específico de SelPlex": hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión de este gen únicamente en la comparación de SP frente a SD.
- 15 d. "Específico de SelMet": hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión de este gen únicamente en las comparaciones de SM frente a SD y de SS frente a SD.
- e. "SelMet-SelPlex": hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión de este gen únicamente en las comparaciones de SM frente a SD y de SP frente a SD.
- f. "SodSel-SelPlex": hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión de este gen únicamente en las comparaciones de SS frente a SD y de SP frente a SD.
- 20 g. "No afectado": La expresión de este gen no se vio afectada significativamente por las dietas SM, SS o SP respecto a las dietas SD.
- h. "Afectada por todos": la expresión de este gen se vio afectada significativamente por las dietas SM, SS y SP respecto al grupo de la dieta SD.
- 25 7. El conjunto de datos se dividió en dos subconjuntos, uno que contenía "genes bien caracterizados" (esencialmente los transcritos que tienen un único título génico y símbolo génico de acuerdo con la información anotada en el conjunto de sondas de Affymetrix) y "transcritos no caracterizados" (todos los conjuntos de sondas del conjunto de los datos, incluidos los marcadores de secuencia expresados, secuencias de ADNc etc.).
- 30 8. Cada gen en el subconjunto de datos de "genes bien caracterizados" se asignó después a una "función génica" usando la columna de "GO Biological Process" de la información anotada proporcionada por Affymetrix. En los casos en los se proporciona múltiple y diversa información ontología génica (GO), se usó la información de las bases de datos (Entrez-Gene, PubMed, etc.) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para generar una "opinión de consenso" para la función de dicho gen.

## Ejemplo 2

### El selenio de la dieta altera la expresión génica en el intestino de ratón

35 Se investigó la capacidad del selenio de la dieta (p. ej., derivada de varias fuentes, tales como SeM, Sel-sod, and Sel-Plex) para alterar la fisiología (p. ej., homeostasis fisiológicas) y los patrones de expresión (p. ej., patrones de expresión de proteínas o genes) de varios grupos funcionales de proteínas y varias vías de proteínas en el intestino y el cerebro (p. ej., corteza cerebral) de ratón.

40 Por tanto, un objeto de la presente invención fue determinar si las composiciones de la presente invención podrían alterar los niveles de expresión (p. ej., los niveles de ARNm) de varios genes. Un grupo de genes analizados fueron los genes habitualmente asociados con el selenio. Como se ha descrito anteriormente, los niveles de expresión de los genes se analizaron entre los ratones con dietas con y sin selenio o entre los ratones alimentados con diferentes fuentes de selenio (véase, por ejemplo, la Tabla 1 que figura más adelante). No se observaron diferencias significativas en los pesos corporales de los ratones que habían recibido una dieta deficiente en selenio, una dieta que comprende selometionina (Se-met o SeM), una dieta que comprende selenito sódico (Sod-sel, or SS) o una dieta que comprende Sel-Plex (Sel-Plex, o SP) (véase la FIG. 1).

45

50 El selenio es conocido por su papel en los sistemas antioxidantes, principalmente porque el selenio (como selenocisteína) es un componente clave de las glutatión peroxidasas (GSH-Px). Las glutatión peroxidasas son una clase de enzimas que metabolizan o detoxifican el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos lipídicos. Por tanto, funcionan protegiendo la célula contra los daños causados por especies de oxígeno reactivo (ROS) producidas como subproductos de metabolismo celular aeróbico (véase, por ejemplo, Arthur, Cell. Mol. Life Sci. 57, 1825, (2000)).

De acuerdo con esto, se determinó si el nivel de expresión de GSH-Px cambiaría en los sujetos que habían recibido suplemento de selenio (p. ej., suplemento de selenio en la dieta) frente a los que no lo recibieron (p. ej., sujetos deficientes en selenio). Usando las composiciones y procedimientos de la presente invención se demostró que había un cambio significativo (FC) en la expresión del gen GSH-Px en sujetos que recibían suplemento de selenio (p. ej., que recibían Se-met, Sod-sel y Sel-Plex) en comparación con los sujetos deficientes en selenio. El cambio en los niveles de expresión de dos genes GSH-Px se describe en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Gen	Se-met	Sod-sel	Sel-Plex
Glutación peroxidada 1 (todas $p < 0,01$ )	4,9	4,1	4,7
Glutación peroxidada 3 (todas $p < 0,01$ )	4,6	3,5	3,6

También se analizó la expresión de otros genes asociados con selenio y se determinó que estaba alterada. Por ejemplo, se observó la regulación por aumento de las selenoenzimas (p. ej., Tioredoxina reductasa 1 (Trx-1). Véase, por ejemplo, Rundlof and Arner, *Anitoxidants and Redox Signaling*, 6, 41 (2004)). El sistema de la tioredoxina es una defensa clave contra las ROS y consta de tioredoxina y tioredoxina reductasa que reduce la tioredoxina usando NADPH. En los sujetos que reciben suplemento de selenio, el incremento en la expresión del gen de la tioredoxina reductasa 1 fue el siguiente: SeM, 1,8; SS, 1,7; SP 1,8 (todos con valores  $p < 0,01$ ). Por tanto, las composiciones y los procedimientos de la presente invención funcionaban alterando la expresión de los genes que anteriormente se sabía que estaban asociados con el selenio.

Otra selenoenzima, la yodotironina desyodinasa de tipo 1 (véase, por ejemplo, Larsen and Berry, *Annu. Rev. Nutr.*, 15, 323 (1995)), también mostró un incremento de la expresión usando las composiciones y los procedimientos de la presente invención. Esta enzima es responsable de la conversión de tiroxina (T4) en hormona tiroidea bioactiva (T3). La suplementación con selenio aumentó significativamente el nivel de expresión (p. ej., expresión de ácido nucleico) de yodotironina desyodinasa de tipo 1 del siguiente modo: SeM, incremento por 2,0; SS, incremento por 2,8; SP, incremento por 2,1.

### Ejemplo 3:

#### El selenio de la dieta altera el nivel de expresión de los genes que codifican selenoproteína de un modo dependiente de la fuente de selenio

Ahora se sabe que el selenio (Se) está incorporado como selenocisteína en una serie de selenoproteínas, siendo la glutación peroxidasa (GSH-Px, véase el ejemplo 2) el ejemplo prototipo. La selenocisteína está específicamente codificada por el codón UGA y se inserta en las cadenas peptídicas mediante un mecanismo cotraduccional que es capaz de anular la función normal de UGA como codón de terminación. En eucariotas, la incorporación eficiente de selenocisteína en los codones UGA requiere un factor proteico celular y una señal estructural de acción cis normalmente localizada en la región 3' no traducida del ARNm (3'-UTR), que consiste en una secuencia de inserción de selenocisteína (SECIS) en una estructura de tipo tronco-bucle característica (véase, por ejemplo, Peterlin y col., (1993), *In Human Retroviruses*; Cullen, Ed.; Oxford University Press: New York; pág. 75-100; Le y Maizel, *Theor. Biol.* 138: 495 (1989)). El factor proteico requerido se supone que está presente en ciertos tipos celulares que expresan selenoproteínas, tales como células hepáticas, linfocitos, macrófagos, trombocitos y otras células sanguíneas. En dichos tipos celulares, la presencia de un elemento SECIS en un ARNm es necesaria y suficiente para que los codones UGA dentro del marco se traduzcan como selenocisteína.

Los niveles de expresión de varios genes que codifican selenoproteína se vieron afectados por suplemento con selenio. Es importante el hecho de que la presente invención demuestra por primera vez que existe diferencias significativas en la capacidad de varias fuentes de selenio para alterar los niveles de expresión de los mismos genes (p. ej., genes de selenoproteína y otros genes descritos en el presente documento. Por ejemplo, la expresión de selenoproteína W (SelW) no se vio significativamente alterada por SeM. No obstante, Sod-sel and Sel-Plex regulaban por incremento SelW 5,1 veces. SelW se expresa en muchos tejidos, incluido el cerebro, donde su nivel de expresión se mantiene cuando hay deficiencia de selenio. SelW es un antioxidante dependiente de glutación y se ha demostrado que la sobreexpresión de SelW en células CHO y células de cáncer de pulmón humanas H1299 reduce considerablemente la sensibilidad de ambas líneas celulares a la citotoxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (véase, por ejemplo, Jeong y col., *FEBS Letter*, 517, 225 (2002)). Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de reducir la sensibilidad de las células a la citotoxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que comprende proporcionar a las células una composición que comprende Sod-sel y/o Sel-Plex en condiciones tales que se altera (p. ej., se incrementa) la expresión de SelW.

Como ilustración adicional de la naturaleza de la fuente de selenio de la capacidad para alterar la expresión génica, el nivel de expresión del gen para la selenoproteína N1 ((Sepn1) no se vio significativamente afectado por Sem O Sod-sel, pero aumentó 1,8 veces con Sel-Plex ( $p < 0,02$ ). Se piensa que Sepn1 desempeña un papel importante en la

integridad del músculo. Por ejemplo, en seres humanos, la enfermedad multiminicore consiste en un espectro de enfermedades neuromusculares congénitas con afecciones clínicas tales como debilidad y cambios musculares estructurales. Se sabe que un tercio de todos los casos de multiminicore se debe a mutaciones en el gen *Seprn1* (véase, por ejemplo., *Neuromuscul. Disord.* 15 (4), 299-302 (2005); *Am. J. Hum. Genet.* 71 (4), 739-749 (2002)). Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de mantener la integridad muscular que comprende proporcionar a las células una composición que comprende Sel-Plex en condiciones tales que se altera (p. ej., se incrementa) la expresión de *Seprn1*.

Las metionina sulfóxido reductasas catalizan la reducción de los metionina sulfóxidos libres y unidos a la proteína en las correspondientes metioninas (véase, por ejemplo, Brot y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2155 (1981); Weissbach y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 172 (2002)). La oxidación de la metionina por las especies de oxígeno reactivo (ROS) genera una mezcla diaestereomérica de metionina-S-sulfóxido (Met-S-SO) y metionina-R-sulfóxido (Met-R-SO). Dos familias de enzimas distintas evolucionaron para la reducción de estos sulfóxidos, siendo la metionina-S-sulfóxido reductasa (*MsrA*) estereoespecífica de Met-SSO y la metionina-R-sulfóxido reductasa (*MsrB*) de Met-R-SO. Las funciones previamente descritas de estas enzimas incluyen reparación de las proteínas dañadas oxidativamente, regulación de la función proteica y eliminación de oxidantes a través de la formación reversible de metionina sulfóxidos (véase, p. ej., Levine y col., *IUBMB Life* 50, 301 (2000)).

Hasta la fecha se han identificado dos proteínas *MsrB* de mamífero: Proteína que contiene selenocisteína (*Sec*), designada selenoproteína R (*SelR*; véase, por ejemplo, Kryukov y col., *J. Biol. Chem.* 274, 33888 (1999); , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4245 (2002)) y su homólogo, designado CBS-1, en el que hay Cys en lugar de *Sec* (véase, p. ej., Jung y col., *FEBS Lett.* 527, 91 (2002)). La *MsrB* que contiene *Sec* solo se ha descrito en mamíferos. Los miembros de la familia de *MsrB* se han caracterizado mecanísticamente (véase, p. ej., Kumar y col., *J. Biol. Chem.* 277, 37527 (2002); Olry y col., *J. Biol. Chem.* 277, 12016 (2002)); y estructuralmente (Lowther y col., *Nat. Struct. Biol.* 9, 348 (2002)).

El gen de *SelR* (también conocido como selenoproteína X1) no se vio significativamente afectado por el suplemento en la dieta con SeMet, pero estaba sobrerregulado 1,3 veces ( $p < 0,01$ ) y 1,2 veces ( $p < 0,05$ ) por Sod-sel y Sel-Plex, respectivamente. Como se ha descrito anteriormente, *SelR* es una metionina sulfóxido reductasa. Los residuos de metionina en las proteínas son susceptibles a los daños por ROS, pero se pueden reparar mediante la reducción de los metionina sulfóxidos resultantes por encima tales como *SelR* (véase, por ejemplo, Kim and Gladyshev, *Mol Biol Cell* 15, 1055, (2004)). De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un procedimiento de estimular en un sujeto la reparación de proteínas dañadas por oxidación que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende Sod-sel y/o Sel-Plex en condiciones tales que se altera (p. ej., se incrementa) la expresión de *SelR*.

#### Ejemplo 4

##### Formas selectivas de selenio en la dieta alteran la expresión de proteínas inducibles por estrés

Los genes de la superóxido dismutasa (p. ej., SOD1 and SOD2) codifican enzimas secuestrantes de radicales libres intramitocondriales que son primera línea de defensa contra el superóxido (p. ej. radicales superóxido) producido como subproducto de la fosforilación oxidativa. (Véase, *por ejemplo*, Li y col. *Nature Genet.* 11: 376 (1995)). La inactivación (p. ej., mutantes homocigotos) del gen *Sod2* en ratones transgénicos mediante recombinación homóloga tiene como resultado la muerte de los ratones en los primeros 10 días de vida con una miocardiopatía dilatada, acumulación de lípidos en el hígado y el músculo esquelético, y acidosis metabólica (véase, p. ej., Li y col. *Nature Genet.* 11: 376 (1995)). El análisis citoquímico reveló una intensa reducción de las actividades de la succinato deshidrogenasa (complejo II) y la aconitasa (una enzima del ciclo de ácido tricarbóxico) en el corazón y, en menor medida, en otros órganos. Los hallazgos sugirieron que la MnSOD era necesaria para la función biológica normal de los tejidos manteniendo la integridad de las enzimas mitocondriales susceptibles de inactivación directa por superóxido.

Las especies de oxígeno reactivo (ROS) se han implicado en un amplio abanico de procesos degenerativos, incluida la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad cardíaca isquémica, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento. Las ROS se generan en las mitocondrias como subproductos tóxicos de la fosforilación oxidativa, su vía de generación de energía. Como se ha indicado anteriormente, la inactivación genética de la forma mitocondrial de la SOD en ratones tiene como resultado miocardiopatía dilatada, acumulación de lípidos en el hígado y muerte prematura del neonato (véase, por ejemplo, Li y col. *Nature Genet.* 11: 376 (1995)). Se ha notificado que el tratamiento con un mimético de la SOD, MnTBAP, rescató a los ratones mutantes *-/-* de *Sod 2* de esta patología sistémica y prolongó espectacularmente su supervivencia (véase, por ejemplo, Melov y col., *NatureGenet.*) 18: 159 (1998)). Los animales supervivientes desarrollaron un pronunciado trastorno del movimiento que progresó a debilitación total a las 3 semanas de edad. La evaluación neuropatológica mostró una sorprendente degeneración espongiiforme de la corteza y los núcleos específicos del tronco del encéfalo asociada con gliosis y vacuolización intramielínica similar a la observada en el edema citotóxico y trastornos asociados con anomalías en la mitocondria, tal como enfermedad de Leigh y enfermedad de Canavan. Se ha sugerido que, debido a que MnTBAP no atraviesa la barrera hematoencefálica, se produce neuropatología progresiva por excesiva producción de ROS en las mitocondrias (véase, por ejemplo, Melov y col., *Nature Genet.* 18: 159 (1998)).

Los ratones defectivos para la SOD 1 exhiben atrofia y debilidad muscular progresiva típica con daños selectivos a las neuronas motoras que se asemeja estrechamente a la ELA de seres humanos. Parece haber una relación causal entre la secreción de SOD1 mutante y la toxicidad neural (p. ej., la proteína mutante no se secreta). No obstante, la infusión de la SOD silvestre en un modelo de rata de ELA retrasa significativamente el inicio de la enfermedad (véase, por ejemplo, *Neurosci*, 25, 108-117 (2005)). Además, se ha demostrado que se requiere una chaperona de cobre (Cu) para una carga eficiente de Cu en la SOD (véase, por ejemplo, *Nat. Neurosci*, 5, 301-307 (2002)). Por tanto, la capacidad para mantener niveles normales de SOD silvestre o potenciar la expresión o la función de la misma puede proporcionar un efecto terapéutico beneficioso para los sujetos con ELA.

Además, Se ha demostrado que en varias zonas del cerebro de sujetos con ELA aparecen números regresivos de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal (véase, por ejemplo, *Neurochem Int.* 46, 357-368, (2005)). Por tanto, la capacidad para regular por aumento los genes implicados en el crecimiento de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal y/o el mantenimiento puede proporcionar efectos beneficiosos para un sujeto con ELA.

Por tanto, se determinó si una dieta suplementada con selenio podría alterar los niveles de expresión de los genes de SOD (p. ej., SOD1 y SOD2). Los sujetos a los que se administró composiciones que comprendían selenio (p. ej., Sel-Plex o Sod-sel) exhibían y potenciaban la expresión de SOD1 (p. ej., por 1,2 y 1,92, respectivamente). Además, estos sujetos también exhibían una potenciación de la expresión de la chaperona de Cu por SOD (CCD) (1,19 veces y 1,28 veces, respectivamente). Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto con ELA que comprende administrar al sujeto una composición que comprende selenio en condiciones tales que se potencia la expresión de SOD1 y/o CCD.

La presente invención se refiere a un procedimiento de reducir los radicales superóxido en un sujeto (p. ej., en un sujeto que experimenta tensión oxidativa), que comprende proporcionar al sujeto una composición (p. ej. un suplemento nutricional que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex). Además, se ha demostrado que los sujetos que reciben ciertas composiciones que comprenden selenio (p. ej., suplementos de selenio que comprenden Sel-Plex) que tienen una mayor capacidad para tratar con el estrés oxidativo. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, los sujetos que reciben una composición que comprende selenio (p. ej., suplemento dietético (que comprende Sel-Plex) tienen una capacidad potenciada para afrontar el estrés oxidativo debido a la capacidad de seleccionar formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) para alterar (p. ej., reducir) el nivel de los radicales superóxido en el sujeto. La reducción de los radicales superóxido se puede producir en el cerebro (p. ej., corteza cerebral) de sujetos tratados con las composiciones de la presente invención (véase, por ejemplo, el Ejemplo 10 más adelante).

Otro efecto único de Sel-Plex fue su capacidad para regular por disminución significativamente la expresión de la selenoproteína inducible por estrés, la yodotironina desyodinasas de tipo II (Dio2).

La hormona tiroidea tiene importantes efectos reguladores en algunos tejidos de mamífero, tal como el cerebro en desarrollo, adenohipófisis y el tejido adiposo marrón (Véase, por ejemplo, *Croteau y col. J. Clin. Invest.* 98: 405-417, (1996)). Una proporción relativamente alta de la triiodotironina unida a receptor dentro del propio tejido en lugar de en el plasma. La expresión en estos tejidos de la yodotironina desyodinasas de tipo II (Dio 2) que cataliza la desyodación de la tiroxina T4 exclusivamente en el anillo externo (posición 5') para dar T3, sugiere que Dio2 es responsable de esta producción "local" de T3 y, por tanto, es importante para influir sobre la acción de la hormona tiroidea en estos tejidos. Además, la actividad de Dio2 está marcadamente elevada en el estadio hipotiroideo y parece ser responsable de catalizar la producción de una gran proporción de la T3 circulante en dichas condiciones. Se ha observado que, a partir de los ADNc de las yodotironina desyodinasas de tipos I y III, las desyodinasas contiene codones TGATGA dentro del marco que codifican la selenocisteína (véase, p. ej., *Croteau y col. J. Clin. Invest.* 98: 405-417, (1996)). Las propiedades catalíticas y los patrones tisulares de expresión de estas selenoproteínas difieren de las de Dio2. Al contrario que Dio2, Dio1 se expresa en el hígado y los riñones y es capaz de desyodinar el anillo interno de los conjugados de hormona tiroidea sulfatada. Dio3 funciona como desyodinasas del anillo interno para convertir T4 y T3 en metabolitos inactivos. Su expresión en la placenta y varios tejidos fetales durante el desarrollo temprano sugirió que desempeña un papel en la prevención de la exposición prematura de los tejidos en desarrollo a niveles adultos de hormonas tiroideas. Dio2 también está presente en varios tejidos fetales y neonatales, y es esencial para proporcionar al cerebro niveles adecuados de T3 durante el periodo crítico del desarrollo.

Dio2 está regulado por aumento de 10 a 50 veces en el tejido adiposo marrón en respuesta al estrés frío (Véase, p. ej., de Jesus y col., *J. Clin. Invest.*, 108, 1379 (2001)).

Se ha demostrado que la depleción de selenio reducía la expresión endógena basal de Dio2 y la actividad en una línea celular de mesotelioma (véase, p. ej., *J. Biol. Chem.* 276: 30183 (2002)). Esta depleción se podía invertir con suplemento con selenio de un modo dependiente de la dosis y el tiempo. La expresión y la actividad de Dio2 también aumentaron tras la exposición a un análogo de AMPc no hidrolizable. La exposición al sustrato de tiroxina aumentó la degradación de DIO2, lo que tiene como resultado una disminución de la actividad de DIO2. La corta semivida de la DIO2 endógena (menos de 1 hora) y la mayor degradación de DIO2 en presencia de tiroxina se redujeron o eliminaron mediante la exposición a los inhibidores del proteasoma.

Los experimentos realizados usando composiciones de la presente invención proporcionaron que SeMet and Sod-

sel no mostraban capacidad para alterar los niveles de expresión de dio2, mientras que Sel-Plex produjo una regulación por disminución, 2,3 veces, significativa de este gen. Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de reducir el estrés en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reduce la expresión de Dio2. La presente invención también se refiere a un procedimiento de estabilizar la función endocrina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex en condiciones tales que se reduce la expresión de Dio2.

Aunque no es necesario conocer el mecanismo, tratar a un sujeto con una composición que comprende selenio (p. ej., suplemento de la dieta diaria que comprende Sel-Plex) reduce la expresión de Dio2, de modo que se reduce el estrés celular en el sujeto. Por tanto, la alteración única (p. ej., reducción) de la expresión de Dio2 demuestra que los sujetos que reciben ciertas formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) experimentan/están bajo menos estrés que los sujetos que no reciben tratamiento.

La expresión de otros varios genes asociados con estrés se alteró d en modo único (p. ej., se reguló por disminución) mediante ciertas formas de selenio (p. ej., la expresión se alteró con Sel-Plex, pero no se alteró por el tratamiento con Sod-Sel). Un ejemplo fue el gen de la glioxalasa 1 (Glo 1). La glioxalasa es la principal vía de detoxificación para metil-glioxal, un subproducto citotóxico de la glicólisis aerobia (véase, por ejemplo, Amicarelli y col., Carcinogenesis, 19, 519 (1998)).

Se ha demostrado que el gen Glo 1 estaba sobrerregulado aproximadamente 1,6 veces en tejido cerebral de un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer (EA) y demencia frontotemporal (véase, por ejemplo, Chen y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 101: 7687 (2004)). GLO1 también estaba elevada en cerebros de enfermedad de Alzheimer en comparación con los controles sin demencia y la inmunohistoquímica de GLO1 detectó neuronas con forma de llama teñidas intensamente en los cerebros con EA. Los datos demostraron el potencial de transcripción aplicado a los modelos animales de enfermedades humanas y sugirió un papel previamente no identificado de la glioxalasa I en enfermedades neurodegenerativas (véase, por ejemplo, Chen y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 101: 7687 (2004)).

Los experimentos realizados usando composiciones de la presente invención proporcionan que los niveles de expresión de Glo 1 no se veían significativamente afectados por SeMet o Sod-Sel. No obstante, el tratamiento (p. ej., suplementación de la dieta) con Sel-Plex tuvo como resultado una reducción por 1,3 de la expresión (p< 0,01). De acuerdo con esto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto (p. ej., un sujeto con enfermedad de Alzheimer), que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex o derivados) en condiciones tales que se reduce la expresión de Glo1 en el sujeto.

La expresión de genes de detención del crecimiento e inducibles por daños en el ADN también e alteró (p. ej., se redujo) mediante suplementación con selenio (véase, por ejemplo, la Tabla 2, más adelante). Por tanto, la presente invención proporciona composiciones de Sel-Plex que reducen los daños de ADN en un sujeto, como pone de manifiesto la regulación por disminución de los genes asociados con daños en el ADN y detención del crecimiento en sujetos que recibieron ciertas formas de suplemento de selenio (Sel-Plex). Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención también se refiere a un procedimiento de reducir los daños en el ADN en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reducen los daños en el ADN.

Tabla 2

Título/Símbolo del gen	FC SM	FC SS	FC SP	Clase funcional
Detención del crecimiento e inducible por daños en ADN 45 beta (Gadd45b)	NS	NS	-1,3 (P<0,05)	Señal de transducción
Detención del crecimiento e inducible por daños en ADN 45 gamma (Gadd45g)	-1,5 (p<0,05)	-2,0 (p<0,01)	-2,2 (p<0,05)	Respuesta al estrés
P53 y regulado por daños en el DNA 1.(Pdrg1).	NS	NS	-1,3 (P<0,05)	Respuesta al estrés

Otra clase de proteínas cuya expresión se alteró con el tratamiento con selenio es la de las protininas. Las prohitininas son proteínas a las que se han atribuido varias funciones dentro de la célula, incluida la regulación del ciclo celular, la implicación en la apoptosis y el ensamblaje de las enzimas de la cadena respiratoria en la mitocondria. Están presentes en la membrana mitocondrial interna y se sabe que su expresión está inducida por estrés metabólico producido por un desequilibrio en la síntesis de las proteínas mitocondriales y mitocondriales codificadas por el núcleo. Las prohitivas actúan en colaboración entre ellas para modular la actividad mitocondrial, en particular en situaciones de estrés mitocondrial (véase, por ejemplo, Coates y col., Exp. Cell. Research, 265, 262 (2001)). En general, cuando la edad aumenta, existe un incremento concomitante del estrés mitocondrial.

Usando las composiciones de la presente invención se observó que en los sujetos tratados con ciertas formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) la expresión de la prohibitina se regulaba por disminución significativamente, 1,3 veces ( $p < .$ ), mientras que en los que recibieron Sod-sel no se alteraba significativamente la expresión de Phb y en los que recibieron SeM se regulaba por incremento significativamente la expresión de Phb 1,6 veces ( $p < 0,05$ ). Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de alterar la expresión asociada con la edad de un gen de prohibitina en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende Sel-Plex en condiciones tales que se reduce la expresión asociada con la edad de un gen de prohibitina. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, proporcionar ciertas formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) reducen el estrés mitocondrial asociada con el envejecimiento, mientras que otras formas de selenio (p. ej., selenometionina) son incapaces de reducir el estrés mitocondrial y pueden incluso aumentarlo. Por tanto, proporciona soporte adicional para el uso de ciertas composiciones que comprenden ciertas formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) y no otros tipos de selenio (p. ej., SeM o Sod-sel) con el fin de reducir el estrés (oxidativo o de otros tipos) en un sujeto. Por tanto, en general, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden ciertas formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) que, cuando se administran (p. ej., por medio de un suplemento dietético) a un sujeto, no induce la expresión de genes inducibles por estrés que se inducen mediante la administración de otras formas de selenio (p. ej., SeM o Sod-sel). De acuerdo con esto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de reducir el estrés celular (p. ej., el estrés metabólico) en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reduce la expresión de Phb.

### Ejemplo 5

#### 20 Las formas selectivas de selenio en la dieta alteran la expresión génica

Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (BFCN) están implicadas en las funciones cognitivas, como el aprendizaje y la memoria, y están afectadas en varias enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA). El gen 8 de la proteína LIM homeobox (Lhx8) es importante para el adecuado desarrollo y mantenimiento de las BFCN (véase, por ejemplo, Mori y col., Eur. J. Neurosci., 19, 3129 (2004)).

25 Se ha comunicado que los ratones con una mutación nula en el gen Lhx8 son deficientes en el desarrollo de neuronas colinérgicas del prosencéfalo (Zhao y col. Proc. Nat. Acad. Sci. 100: 9005 (2003)). Los mutantes Lhx8 carecían del núcleo basal, como fuente principal de la entrada colinérgica en la corteza cerebral. Además, el número de neuronas colinérgicas se redujo en otras diversas áreas del prosencéfalo subcortical en estos mutantes. Aunque no se habían formado neuronas colinérgicas, las etapas iniciales de su especificación parecían estar conservadas, como lo indica la presencia de células que expresan un ARNm de Lhx8 truncado y de ARNm del gen homeobox Gbx1. Estos resultados proporcionan pruebas genéticas que avalan la existencia de un papel importante de Lhx8 en el desarrollo de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo.

35 Usando composiciones de la presente invención, el nivel de expresión observado de Lhx8 no era significativamente diferente entre sujetos deficientes en Se y el de los sujetos que reciben ciertas formas de selenio (p. ej., SeM o Sod-sel). No obstante, cuando se trató a los sujetos (p. ej., suplemento recibido y de la dieta) con una composición que comprende Sel-Plex, la expresión de Lhx8 se reguló por aumento, 12,9 veces ( $p < 0,01$ ). Por tanto, la presente invención se refiere a procedimientos de mantenimiento y/o estabilización de la función neurológica (p. ej., crecimiento y la función de neuronas colinérgicas) en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex, en condiciones tales que se aumenta la expresión de Lhx8.

40 Además, el producto de otro gen, del factor beta 2 transformante del crecimiento (TGF- $\beta$ 2), se sabe que aumenta la proliferación neuronal en el desarrollo del cerebelo (véase, por ejemplo, Elvers y col., Mechanisms of Development, 122, 587 (2004)). Además, se ha demostrado que el TGF- $\beta$ 2 es un factor de crecimiento y de supervivencia para los precursores de las células granulares en el cerebelo y que la neutralización mediada por anticuerpos de TGF- $\beta$ 2 endógeno reprime la proliferación de los precursores de las células granulares e induce neurodegeneración. También se ha demostrado que cuando se elimina TGF- $\beta$ 2 (p. ej., delección) se produce un fenotipo letal con ratones deficientes en TGF- $\beta$ 2 que desarrollan una serie de defectos y mueren antes de que se produzca el desarrollo del cerebelo (véase, por ejemplo, Sanford y col., Development, 124, 2659 (1997)).

50 Usando composiciones de la presente invención, el nivel de expresión de of TGF- $\beta$ 2 no se alteró, en comparación con los controles, en sujetos que reciben ciertas formas de selenio (p. ej., SeM o Sod-Sel). No obstante, cuando se trató a los sujetos (p. ej., suplemento recibido y de la dieta) con una composición que comprende Sel-Plex, la expresión de TGF- $\beta$  se reguló por aumento, 2,4 veces. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de incrementar la función del cerebelo en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, en algunas realizaciones, proporcionar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., suplemento de la dieta diaria que comprende Sel-Plex) aumenta la actividad neuronal (p. ej., aumenta la proliferación neuronal) y/o inhibe la neurodegeneración (véase, por ejemplo, el Ejemplo 10 más adelante).

**Ejemplo 6****Las formas selectivas de selenio en la dieta alteran la expresión de los genes relacionados con la diabetes**

La neurogenina 3 (Neurog3) es un factor de transcripción clave en la diferenciación del páncreas endocrino. Neurog3 es una parte importante de la vía de la activación para la expresión del gen de la insulina y ayuda a mejorar la tolerancia a la glucosa (véase, p. ej., Watada, *Endocrine Journal*, 51, 255 (2004)). Se piensa que niveles menores a los normales (p. ej., subexpresión) de Neurog 3 desempeñan un papel en ciertos tipos de diabetes (véase, p. ej., Lee y col., *Genes Dev.* 16: 1488 (2002)). Usando las composiciones de la presente invención se determinó que la expresión de Neurog3 estaba significativamente regulada por aumento, 1,7 veces, en los sujetos que reciben una composición que comprende Sel-Plex, mientras que los sujetos que recibieron tratamientos con SeM o Sod-sel no mostraron una alteración significativa de la expresión de Neurog3. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto (p. ej., un sujeto con diabetes) que comprende administrar al sujeto una composición que comprende Sel-Plex en condiciones tales que se altera (p. ej., se potencia) la expresión de un gen de Neurog3 en el sujeto. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, proporcionar a un sujeto con diabetes de una composición que comprende Sel-Plex mejora la tolerancia a la glucosa en el sujeto a través de la regulación por incremento de la expresión de Neurog3.

**Ejemplo 7****Las formas selectivas de selenio en la dieta regulan por incremento la expresión de los genes asociados con una función potenciada del sistema respiratorio**

El sistema respiratorio de *Drosophila* y el pulmón de mamífero están formados ambos por un proceso de morfogénesis con ramificación, que depende de las interacciones epiteliales y mesenquimatosas mediadas por la señalización entre miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y sus receptores afines. *Branchless*, un homólogo del FGF de *Drosophila*, se expresa en las puntas de las ramas traqueales (véase, por ejemplo, Sutherland y col., *Cell* 87, 1091 (1996)). *Branchless* actúa un homólogo del receptor de FGF denominado *Breathless* (véase, por ejemplo, Glazer and Shilo, *Genes Dev* 5, 697 (1991)), que dirige la migración de células traqueales, además de inducir ramas secundarias y terminales.

El producto del gen *sprouty* (*Spry2*) funciona como antagonista de FGF en *Drosophila*: La sobreexpresión de *sprouty* bloquea la activación de los efectores cadena abajo en la vía *Branchless*, mientras que la mutación completa de *sprouty* potencia la función de los genes cadena debajo de *Branchless*, lo que tiene como resultado una potenciación de la ramificación traqueal (véase, por ejemplo, Hacohen, y col., *Cell* 92, 253 (1998)). En *Drosophila* y en ratones, se ha demostrado que el producto del gen *Spry2* modula negativamente la organogénesis respiratoria (véase, por ejemplo, Tefft y col., *Current Biology*, 9, 219 (1999)).

Usando las composiciones de la presente invención se demostró que Sel-Plex poseía una capacidad única para regular por disminución el gen 2 homólogo de *sprouty* (*Spry2*). Específicamente, los sujetos que reciben una composición que comprende Sel-Plex mostraron una reducción significativa en la expresión del gen *Spry2* (reducción por 1,7 veces), mientras que los sujetos que reciben composiciones que comprenden otras formas de selenio (p. ej., Sem O Sod-sel) no mostraban ninguna alteración en los niveles de expresión de *pry2* respecto a los controles deficientes en Se. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de potenciar la función del sistema respiratorio en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex). Aunque no es necesario conocer el mecanismo, tratar a un sujeto con una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) potencia la función del sistema respiratorio reduciendo la expresión del gen *Spry2*.

**Ejemplo 8****Las formas selectivas de selenio en la dieta alteran la expresión de genes asociados con el envejecimiento y la función cognitiva**

Se sabe bien que el envejecimiento se asocia con un incremento de la generación oxidativa (véase, por ejemplo, Peinado y col., *Anat Rec*, 247, 420 (1997)). Por ejemplo, las especies de oxígeno altamente reactivo (ROS) estimulan un amplia gama de daños celulares, incluidos daños a ADN, peroxidación lipídica, alteración de la relación redox intracelular y la inactivación de las enzimas. Un mecanismo clave del huésped en la defensa contra las TOS se realiza por familia de la glutatión-S-transferasas a (GST) QUE protege contra los subproductos de la tensión oxidativa a través de varias reacciones (Hayes Y COL., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51, (2004)). En el área de la neurodegeneración, la oxidación de catecolaminas da aminocromo, dopacromo, noradrenocromo y adenocromo que son dañinos, ya que pueden producir O<sub>2</sub> mediante ciclado redox. Estos compuestos que contienen quinona se pueden conjugar con GSH a través de las acciones de GST, una reacción que evita el ciclado redox (véase, por ejemplo, Dagnino-Subiabre y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274, 32 (2000)). Las O-quinonas formadas a partir de dopamina también se pueden conjugar con GSH mediante GST, y se piensa que esta reacción combate los procesos degenerativos en el sistema dopaminérgico en el cerebro humano (p. ej., la pérdida de la capacidad para combatir este proceso puede desempeñar una función en enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson).

En microbios, plantas, moscas, peces y mamíferos, la expresión de GST está regulada por aumento mediante la exposición a pro-oxidantes y, de hecho, las regiones promotoras de GST citosólicos contienen elementos de respuesta a antioxidantes a través de los cuales se activan transcripcionalmente durante la exposición a aceptores de la reacción de Michael y al estrés oxidativo (véase, por ejemplo, Hayes y col. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45, 51, (2004)).

Por tanto, las composiciones de la presente invención se analizaron para determinar si eran capaces de alterar los niveles de expresión de los genes de GST. Las composiciones que comprenden varias formas de selenio (p. ej., SeM, Sod-sel, and Sel-Plex) se administraron a sujetos y los niveles de expresión de los genes de GST se monitorizaron. El nivel de expresión de varios genes de las GST se alteró con la suplementación de selenio en comparación con los sujetos control que recibieron dietas deficientes en Se (véase la Tabla 3, a continuación).

Nombre del gen	Símbolo	FC SeM	FC Sod-Sel	FC Sel-Plex
Glutación S-transferasa, alfa 3	Gsta3	NS	-2,3	-2,5
Glutación S-transferasa, alfa 4	Gsta4	NS	NS	-1,7
Glutación S-transferasa, mu1	Gstm1	NS	-2,4	NS
Glutación S-transferasa, mu 2	Gstm2	NS	-2,1	-2,1
Glutación S-transferasa, mu 3	Gstm3	NS	-2,7	-2,3
Glutación S-transferasa, teta 1	Gstt1	NS	NS	-1,4
Glutación S-transferasa, teta 2	Gstt2	NS	-1,3	NS

Sorprendentemente, los sujetos que recibieron dieta con selenometionina (SeMe) no mostraron alteración en el patrón de expresión de estos genes (p. ej., los genes de GST no estaban regulados por disminución). No obstante, los sujetos que recibieron Sod-sel and Sel-Plex mostraron una expresión alterada (p. ej., reducida) de los genes de GST. Por tanto, la presente invención proporciona que existen distintas diferencias en la capacidad de diferentes fuentes de selenio para producir respuestas en los perfiles de expresión de genes (p. ej., genes de GST y los descritos en otra parte del presente documento).

Aunque no es necesario conocer el mecanismo, tratar a un sujeto con una composición que comprende Sel-Plex produce menos estrés en el sujeto (p. ej., proporciona menores niveles de estrés oxidativo), de modo que permite una regulación por disminución general de la expresión de los genes GST en sujetos que recibieron Sel-Plex. De acuerdo con esto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de reducir el estrés oxidativo en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plexo Sodi-sel) en condiciones tales que se reduce la expresión de los genes de GST (p. ej., Gstt2, Gstt1, Gsta3, Gsta4, Gstm1, Gstm2, o Gstm3). Dos o más formas de selenio (p. ej., Sel-Plex y Sod-sel) se pueden administrar a un sujeto. La administración de dos o más formas de selenio puede proporcionar un efecto aditivo (p. ej., proporciona una reducción aditiva de la expresión de GST). La administración de dos o más formas de selenio puede proporcionar un efecto más que aditivo (p. ej., sinérgico) de reducción de la expresión de GST. La administración de dos o más formas de selenio a un sujeto puede no denegar el efecto de cualquier fuente de selenio para reducir la expresión de los genes de GST. La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratar a un sujeto con enfermedad de Parkinson, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., suplemento dietético que comprende Sel-Plex) en condiciones tales que se regula por disminución la expresión de los genes de GST y los genes de ubiquitina.

La presente invención se refiere a un procedimiento de retrasar la progresión relacionada con la edad (p. ej., incremento de los niveles de estrés oxidativo) en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej. un suplemento dietético que comprende Sel-Plex). La presente invención se refiere a un procedimiento de inhibir la degeneración neuronal (p. ej., reducir el estrés oxidativo que conduce o produce degeneración neuronal) en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej. un suplemento dietético que comprende Sel-Plex). Aunque no es necesario conocer el mecanismo, se consigue el retraso por la edad y la prevención de la neurodegeneración tratando a un sujeto con una composición que comprende selenio (p. ej., suplemento dietético que comprende Sel-Plex) que conduce a la regulación por disminución de los genes inducidos por estrés (p. ej., genes de GST). Además, se ha demostrado que ciertas formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) son capaces de alterar diversos perfiles de expresión génica en un sujeto, mientras que otras formas de selenio (p. ej., SeM y/o Sod-sel) no. Por tanto, Sel-Plex es superior a otras formas de selenio (p. ej., SeM o Sod-sel) para usar en intervenciones nutricionales (p. ej., para mantener y prolongar la función cognitiva óptima y retrasar el envejecimiento).

5 Como se describe más adelante, los datos que demuestran la naturaleza dependiente de selenio de la alteración de la expresión génica generada en el tejido intestinal (p. ej., véase los Ejemplos 2-8 anteriores) también se observa en otros tejidos (p. ej., tejidos cerebrales). Además, como se describe en el ejemplo 9 a continuación, ciertas formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) demuestran una disponibilidad biológica superior en términos de la cantidad de selenio depositado (p. ej., en tejido cerebral) respecto a una diversidad de otras fuentes de selenio.

**Ejemplo 9**

**Efecto de varias fuentes de selenio sobre las concentraciones de selenio cerebrales en gallinas ponedoras de huevos blancos y su descendencia**

10 Las composiciones de la presente invención se usaron para evaluar los efectos de varias fuentes de Se sobre la acumulación de concentraciones de se en el cerebro en gallinas y su descendencia.

El estudio se realizó en la Coldstream Research Facility desde el 28 de junio de 2004 hasta el 16 de noviembre de 2004.

Un total de 48 gallinas (r= 8) criadas en tres días consecutivos comenzando el 16 de septiembre de 2004 fueron alimentadas con seis tratamientos de dietas.

15 Los tratamientos de la dieta fueron los siguientes:

Basal (sin Se añadido)

Selenito (0,3 ppm)

Sel Plex (0,3 ppm)

Tepsel (0,3 ppm)

20 Se 2000 (0,3 ppm)

Fuente de selenio (0,3 ppm)

25 Los polluelos que eclosionaron se dividieron en dos grupos. Se sacrificó a la mitad de los polluelos para obtener los cerebros y se dejó crecer a los polluelos restantes durante 14 días con una dieta deficiente en Se, momento en el cual fueron sacrificados para recoger los cerebros. Los cerebros de las gallinas se analizaron para determinar el contenido en se de forma individual, mientras que los cerebros de los polluelos se homogeneizaron y combinaron por el pequeño tamaño de la muestra.

Las concentraciones de Se en el cerebro de las gallinas y los polluelos se muestran respectivamente en las Tablas 4 y 5, a continuación. El valor de la fuente de selenio representa únicamente un cerebro de gallina analizado y, por tanto, no se incluyó en el análisis estadístico.

30 Las gallinas alimentadas con Sel-Plex tenían la concentración más elevada de Se en comparación con los demás tratamientos incluidos en el modelo. No se observó ningún incremento en el Se cerebral debido a cualquier de los tratamientos restantes cuando se comparó con el tratamiento basal. La concentración de Se cerebral en los cerebros de los polluelos representa la más alta numéricamente entre todos los tratamientos.

35 **Tabla 4. Concentración de Se en cerebro de gallina**

Tratamiento	ppb	S.E.
1. Basal	870	46
2. Selenito	850	65
3. Sel-Plex	1125	46
4. Tepsel	825	55
5. Se2000	909	73
6. Fuente de selenio	1102*	NE

Contraste P=

1 frente a 3 0,0006

3 frente a 5 0,0184

2 frente a 3 0,0018

3 frente a 4 0,0002

**Tabla 5. Concentración de Se en cerebro de polluelo el día 14**

Tratamiento	Ppb
Basal	786
Selenito	784
Sel-Plex	995

<b>TepSel</b>	<b>862</b>	<b>Fuente de selenio</b>	<b>872</b>
<b>Se 2000</b>	<b>884</b>		

---

\*NE= No estimado debido a que sólo hay una muestra

SE= Error estandar

5 Por tanto, las composiciones que comprenden Sel-Plex también proporcionan (p. ej., cuando se proporcionan a un sujeto como suplemento dietético o mediante otros medios), cuando se comparó con un consumo igual de otras formas de selenio, los niveles más altos de selenio biodisponible (p. ej., en tejido cerebral).

### Ejemplo 10

#### Influencias de formas selectivas de selenio de la dieta sobre la expresión génica sobre el cerebro (p. ej., corteza cerebral)

10 Las composiciones de la presente invención se analizaron para determinar si desempeñan un papel en la alteración del proceso de envejecimiento (p. ej., alterando el nivel de expresión génica que se sabe que está asociado con el envejecimiento). En general, los sujetos tratados con las composiciones y procedimientos de la presente invención muestran perfiles de expresión génica consistentes con la inversión o retraso del proceso de envejecimiento. Por ejemplo, comparando los perfiles de expresión génica obtenidos con las composiciones de la presente invención con los perfiles de expresión génica obtenidos del tejido cerebral de ratones muy viejos (p. ej., de 30 meses de edad) (véase, p. ej., Lee, y col., Nature Genetics 25:294 (2000)), se observaron patrones de expresión génica casi opuestos entre las dos cohortes.

Por ejemplo, en animales envejecidos, se observó una inducción concertada de los genes de la cascada C4, C1qa, Clqb y Clqc, la cascada (véase, por ejemplo, Lee y col., Nature Genetics, 25, 294-297 (2000)).

20 El sistema del complemento es una cascada compleja que implica la escisión proteolítica de las glicoproteínas séricas a menudo activadas por receptores celulares. Esta cascada tiene como resultado, en último término, la respuesta inflamatoria, quimiotaxis y opsonización de fagocitos y lisis celular (véase, por ejemplo, Villiers y col., Crit Rev Immunol.; 24: 465 (2004); Morgan y col., Immunol Lett 97:171 (2005)).

25 Los factores del complemento C3a, C5a and C4 pueden inducir vasodilatación, incremento capilar, permeabilidad y expresión de las moléculas de adhesión leucocitaria. Los complementos C3a y C4b son opsoninas que unen los fagocitos a los microorganismos. Los complementos C3a y C4a estimulan la quimiotaxis de los fagocitos. El complemento C3b puede ser una opsonina para los complejos antígeno-anticuerpo que ayuda a prevenir los daños derivados de la formación de agregados inmunitarios grandes insolubles. El complemento C5a, como el C3a es una anafilotoxina y es una atrayente quimiotáctico para la inducción de la liberación neutrofílica de las proteasas antimicrobianas y radicales de oxígenos. Un complejo de complementos C5b,C6, C7, and C8 media la polimerización de hasta dieciocho moléculas C9 en un complejo de ataque de la membrana similar a un tubo que se inserta en la membrana plasmática de un organismo no deseado, tal como una bacteria gramnegativa y células víricas infectadas. Este canal a través de la bicapa lipídica tiene como resultado a lisis de la célula. El infarto isquémico puede también producir inicio de la cascada del complemento. Excesivos depósitos de complejos de ataque en la membrana en los tejidos pueden producirse tras una lesión isquémica. Otros efectos perjudiciales de la activación del complemento incluyen desgranulación de neutrófilos, basófilos y mastocitos, la liberación indeseada de los productos de neutrófilos elastasa y radicales de oxígeno y la circulación de sangre extracorpórea. Se ha sugerido que los inhibidores del complemento son posibles agentes terapéuticos para enfermedades inmunitarias como la enfermedad de Alzheimer.

30 Vías del complemento. Se han conocido tres vías a través de las cuales se puede iniciar la cascada del complemento; las vías clásica, alternativa y de lectina. Las tres vías se fusionan a través de una intersección común, el complemento C3 (véase, por ejemplo, la FIG. 2).

35 La Vía clásica: La vía clásica participa en las respuestas específicas de anticuerpo. La vía clásica se inicia mediante la unión de los anticuerpos a los antígenos de superficie celular. La posterior unión del anticuerpo a las subunidades del complemento Clq de C1 tiene como resultado subunidades C2 catalíticamente activas. Las dos subunidades C1 activadas son capaces de catalizar el ensamblaje de la C3 convertasa (complemento C4b2a) de los complementos C2 y C4.

40 La Vía alternativa: Las vía alternativa no requiere la acción de anticuerpos para iniciar la cascada, pero es iniciada por componentes de superficie celular extraños. En la vía alternativa, el complemento C3 sufre escisión espontánea que tiene como resultado la unión del complemento B a C3b. La difusión de la subunidad Ba tiene como resultado una vía alternativa activa de la C3 convertasa (C3bBb). C3bBb se estabiliza mediante la unión a properdina antes de fusionarse en la vía común y la conversión de C3.

La Vía de la lectina: La vía de la lectina es similar a la vía clásica. Clq no está implicado en la vía de la lectina. En su lugar, una opsonina, proteína de unión a manano (MBP), está implicada en el proceso de iniciación.

5 La producción de proteínas del complemento en el cerebro conduce a la generación de péptidos proinflamatorios y contribuye al daño neuronal asociado con ictus. Es importante el hecho de que se ha documentado que los componentes activados de la vía del complemento están asociados con lesiones en la enfermedad de Alzheimer (EA) y otros trastornos neurodegenerativos, tales como esclerosis múltiple (véase, por ejemplo, Yasojima y col., Am. J. Pathology, 154, 927 (1999); Schwab and McGeer, Exp. Neurology, 174, 81 (2002)). En los estudios con cerebro de EA se ha demostrado una enérgica regulación por incremento de los genes del complemento (p. ej., ARNm) y la aparición de bandas fuertes e las transferencias Western para productos de activación del complemento. El número de cambios en los componentes del complemento en los cerebros de ratones viejos frente a ratones jóvenes fue el siguiente: Complemento C4, sobrerregulado 4,9 veces; Clqa, sobrerregulado 1,7 veces; C1qb, sobrerregulado 1,8 veces; C1qc sobrerregulado 1,8 veces (véase, por ejemplo, Lee, y col., Nature Genetics 25:294 (2000)).

15 De acuerdo con esto, se determinó si las composiciones de la presente invención podrían alterar la expresión de los genes de complemento en la corteza cerebral. Los efectos del suplemento de selenio usando varias fuentes de selenio sobre los niveles de expresión de los genes que codifican los componentes del sistema del complemento fueron los siguientes:

Tabla 6.

Gen	FC SeM	FC Sod-Sel I	FC Sel-Plex
Componente 1 del complemento, proteína de unión al subcomponente q, Clqbp	1,12	1,11	-1,28*
Componente 1 del complemento, subcomponente 1, polipéptido alfa C1qa	-1,11	-1,18	-1,58*
Componente 1 del complemento, subcomponente q, polipéptido beta, C1qbq	-1,15	-1,35	-1,51*
Componente 1 del complemento, subcomponente q, polipéptido gamma, Clqg	1	-1,07	-1,49*
Componente 1 del complemento, subcomponente r, C1r	1,04	-1,29	-1,58*

20 Como se ilustra en la Tabla 6 anterior, las composiciones de la presente invención pudieron alterar la expresión de varios genes del complemento (p. ej., que se ha demostrado que se expresan de forma aberrante en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer). Específicamente, el selenio produjo una regulación por disminución estadísticamente significativa de los genes del componente del complemento (p. ej., Sel-Plex,  $p < 0,01$ , mientras que proporcionar a los sujetos composiciones que comprende SeM o Sod-sel no proporcionaron una alteración estadísticamente significativa de los genes del componente del complemento). La capacidad del selenio (p. ej., Sel-Plex) para reducir la expresión de los genes asociados con la cascada del complemento produce perfiles de expresión génica (p. ej., nivel de expresión reducida) que son muy similares a los observados en múltiples tejidos de ratones alimentados con restricción de calorías (retraso del envejecimiento (véase, por ejemplo, Sohal and Weindrich, Science, 273, 59 (1996)).

30 En consecuencia, la presente invención también se refiere a un procedimiento de retrasar la expresión de los genes asociados con el complemento relacionada genes del complemento (p. ej., C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma y C1qr) en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., suplemento dietario que comprende Sel-Plex) en condiciones tales que se reduce la expresión del gen asociado con el complemento. La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende proporcionar al paciente con enfermedad de Alzheimer una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reducen los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a un mecanismo de acción concreto, la administración de una composición que comprende selenio (Sel-Plex) a un sujeto con Alzheimer reduce los síntomas asociados con el Alzheimer mediante la reducción de la expresión de los genes asociados con el complemento (p. ej., C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma y C1qr). En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan como tratamiento profiláctico con el fin de prevenir el inicio de la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan en combinación con otros tratamientos terapéuticos conocidos (p. ej., los descritos anteriormente) para el tratamiento de una enfermedad neurológica (p. ej., enfermedad de de Alzheimer). Las composiciones de la presente invención se pueden usar para prevenir la neurodegeneración (p. ej., inhibiendo la expresión de genes asociados al complemento o inhibiendo la expresión de otros genes descritos en el presente documento por tener efectos perjudiciales para la homeostasis celular, tales como los genes de GST).

Las composiciones de la presente invención también alteraron la expresión de un miembro nuevo de la superfamilia de TNF/C1q/adiponectina, CORS-26. CORS-26 muestra homologías estructurales con la adiponectina, que ejerce propiedades proinflamatorias y destructivas en el sinovio artrítico (véase, por ejemplo, Turner y col., *Arthritis Res. & Therapy*, 7, 23 (2005)). Los sujetos tratados con ciertas formas de selenio (p. ej., SeM y Sod-Sel) no mostraron ninguna alteración en los niveles de expresión de CORS-26, mientras que los sujetos que recibieron un suplemento dietético que comprende otras formas de selenio (p. ej., Sel-Plex) mostraron una reducción de la expresión por 4,61 veces. Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de tratar la artritis en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reducen los síntomas asociados con la artritis. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, proporcionar a un sujeto con artritis una composición que comprende Sel-Plex reduce los síntomas asociados con la artritis reduciendo la expresión del gen CORS-26.

Otra clase de genes que muestran un nivel significativo de expresión en ratones envejecidos comparados con ratones jóvenes son las catepsinas (por ejemplo, las catepsinas D, S y Z, véase, por ejemplo, Lee y col., Lee, y col., *Nature Genetics* 25:294 (2000)). Las catepsinas son los componentes principales del sistema proteolítico de los lisosomas y se han implicado en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) en péptidos  $\beta$  amiloides. Es importante el hecho de que están inducidas en los pacientes de EA (véase, por ejemplo, Lemere y col., *Am. J. Pathology*, 146, 848 (1995)). Usando las composiciones de la presente invención, la expresión de los genes que codifican una serie de catepsinas se reguló por disminución en respuesta a la suplementación con selenio, más notablemente con selenito sódico y Sel-Plex (véase la Tabla 7, a continuación).

Tabla 7.

Gen	FC SM	FC SS	FC SP
Catepsina B	-1,03	-1,13 *	-1,16*
Catepsina D	1,02	-1,24*	-1,29*
Catepsina Z	-1,13	-1,30*	-1,48*
Catepsina O	-1,16	-1,18	-1,25*
* regulación por disminución significativa respecto a los ratones deficientes en Se			

También se demostró que otros genes implicados en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) se regulaban por disminución en respuesta al suplemento de selenio. Un ejemplo es la  $\gamma$ -secretasa. El complejo enzimático,  $\gamma$ -secretasa, escinde la APP, lo que tiene como resultado la liberación del péptido  $\beta$ -amiloide, un componente principal de las placas de EA. La nicastrina es una glicoproteína transmembrana que interacciona con presenilina, Aph-1 and Pen-2 para formar el complejo de alto peso molecular con actividad de  $\gamma$ -secretasa (Confaloni y col., *Molecular Brain Research*, 136, 12 (2005)). Los niveles de expresión de los genes que codifican nicastrina y presenilina se regularon por disminución en respuesta al tratamiento con Sel-Plex).

Tabla 8.

Gen	FC SM	FC SS	FC SP
Nicastrina	1,04	-1,67 *	-1,7 *
Presenilina 1	1,02	-1,11	-1,22*
* significativo con respecto a animales deficientes en Se. *P<0,01			

Además, una serie de genes implicados en la generación de péptido beta amiloide se regularon por disminución en respuesta al tratamiento con composiciones de la presente invención (p. ej., suplemento con selenio, véase la Tabla 9 más adelante). Por ejemplo, la unión de la proteína precursora del beta amiloide (A4), miembro de la familia B, gen 1 (Apbb1/Fe65). Apbb1/Fe65 es una proteína adaptadora que se expresa principalmente en el sistema nervioso. La APP es escindida en la región transmembrana por la  $\gamma$ -secretasa. La escisión gamma de la APP produce el péptido beta amiloide extracelular de la enfermedad de Alzheimer y libera un fragmento de cola intracelular. Se ha demostrado que la cola citoplasmática de la APP forma un complejo multimérico con la proteína adaptadora nuclear Fe65 y la histona acetiltransferasa TIP60 (véase, por ejemplo, Cao y Sudhof, *Science* 293: 115 (2001)). Apbb1/Fe65

se une a APP y la interacción está mediada por un dominio de unión a fosfotirosina en Apbb1/Fe65 y el dominio citoplasmático en el extremo carboxi de la APP. Fe65 modula el tráfico y el procesamiento de la APP, incluida la producción del péptido beta-amiloide que es crucial para la patogenicidad de la EA (véase, por ejemplo, Kesavapany y col., Neuroscience, 115, 951, (2002)).

5

Tabla 9.

Gen	FC SM	FC SS	FC SP
Unión de la proteína precursora del beta amiloide (A4), familia B, miembro 1 (Apbb1 o Fe65).	1,02	-1,32*	-1,21 *
Proteína similar a la proteína precursora del beta amiloide (A4) (Ap1p1)	1,02	-1,55*	-1,45*
Unión de la proteína precursora del beta amiloide (A4), familia A, miembro 1 (Apba).	1,08	-1,41	-1,61 *
*Significativo respecto a los animales deficientes en Se. P<0,01			

10

15

20

25

30

Por tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende proporcionar al paciente con enfermedad de Alzheimer una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) en condiciones tales que se reducen los signos y síntomas de la enfermedad de Alzheimer. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a un mecanismo de acción concreto, la administración de una composición que comprende selenio (Sel-Plex) a un sujeto con Alzheimer reduce los síntomas asociados con el Alzheimer mediante la reducción de la expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) (p. ej., nicastrina, presenilina 1, catepsina B, catepsina D, catepsina Z o catepsina O) o de los genes implicados en la generación del péptido beta amiloide (p. ej., Apbb1, Ap1p1 y Apba1). En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan como tratamiento profiláctico con el fin de prevenir el inicio de la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se usan en combinación con otros tratamientos terapéuticos conocidos para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA etc.). Las composiciones de la presente invención se pueden usar para prevenir la neurodegeneración (p. ej., inhibiendo la expresión de los genes que codifican proteínas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide o de los genes implicados en la generación del beta amiloide), por el contrario, potenciando la expresión de los genes que proporcionan un efecto beneficioso sobre la función cognitiva (p. ej., Lhx8).

En los estudios en cerebro de ratón en envejecimiento también se identificó la expresión inducida de genes de respuesta temprana, Junb y Fos, que están conducidos en respuesta a lesiones neocorticales o estrés por hipoxia (véase, por ejemplo, Lee, y col., Nature Genetics 25: 294 (2000); Hermann et al Neuroscience, 88, 599 (1999)). En el neocórtex, Junb se reguló por aumento por 1,8 veces. Se ha demostrado que es posible regular por disminución la expresión de Junb usando composiciones y procedimientos de la presente invención. Específicamente, es posible regular por disminución la expresión de genes de respuesta temprana (p. ej., Junb) en tejido cerebral (p. ej., el neocórtex) usando composiciones (p. ej., suplemento dietético con Sel-Plex) de la presente invención.

Tabla 10.

Gen	FC SM	FC SS	FC SP
Junb	-1,38	-1,59	-2,01*
* significativo con respecto a animales deficientes en Se.			

35

40

De forma similar a los datos generados en el tejido intestinal, se observó una regulación por disminución de los genes inducibles por los daños por ADN en respuesta al tratamiento con composiciones y procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, en el tejido intestinal, se demostró una expresión disminuida de Gadd45b con tratamientos con Sel-Plex (p< 0,05) y se demostró una disminución de la expresión de Gadd45b para todos los tratamientos con selenio (p. ej., SeM, Sod-sel and Sel-Plex). En cerebro, la expresión génica se alteró usando composiciones y procedimientos de la presente invención del siguiente modo.

Tabla 11.

Gen	FC SM	FC SS	FC SP
Gadd45b	-1,26	-1,39*	-1,48
Gadd45glp (detención del crecimiento y proteína de interacción inducible por daños en ADN 45 gamma)	1,02	-1,12	-1,37*
* significativo con respecto a animales deficientes en Se.			

5 Otras similitudes entre datos intestinales y cerebrales se observaron en el área de la expresión de glutatión-S-transferasa (GST). Por ejemplo, en intestino, se demostró una disminución de la expresión de los genes de GST, Gsta3, Gsta4 y Gstm3, en los grupos tratados con Sod-sel y Sel-plexo ( $p < 0,05$ ). En cerebro, la expresión génica de una serie de otros genes de GST se alteró usando composiciones y procedimientos de la presente invención del siguiente modo.

Tabla 12.

Gen	FC SM	FC SS	FC SP
Gst pi 1 (Gstp1)	-1,04	1,02	-1,14*
Gst zeta 1 (Gstz1)	-1,08	-1,3	-1,41*
Gst mu 7 (Gstm7)	-1,05	-1,25*	-1,24*
* significativo con respecto a animales deficientes en Se.			

10 Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de protección contra los subproductos de estrés oxidativo en tejido cerebral, que comprende proporcionar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex). Aunque no es necesario conocer el mecanismo, proporcionar a un sujeto de una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) reduce la expresión de los genes GST (p. ej., Gstp1, Gstz1 y Gstm7) en el sujeto. Proporcionar a un sujeto una composición que comprende selenio (p. ej., Sel-Plex) puede reducir el nivel de  
 15 daño en el ADN en el tejido cerebral (p. ej., neocórtex) de un sujeto. Aunque no es necesario conocer el mecanismo, el tratamiento con composiciones y procedimientos de la presente invención (p. ej. suplementar la dieta con Sel-Plex) estabiliza la homeostasis celular (p. ej., en el cerebro) de un modo tal que se reduce la expresión de genes inducibles por daños en el ADN (p. ej. Gadd45b).

20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una composición que comprende una levadura seca no viable y enriquecida con selenio, en la que el contenido total de selenio de dicha levadura comprende el dos por ciento o menos de selenio inorgánico en la fabricación de un medicamento, en el que el medicamento se formula para la administración a un sujeto en condiciones tales que la expresión de un gen del complemento se reduce en la corteza cerebral de dicho sujeto, para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer,.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de un gen de catepsina, un gen de presenilina o un gen de nicastrina también se reduce en dicho sujeto.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho gen del complemento se selecciona de C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma y C1qr.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho gen de catepsina se selecciona de catepsina B, catepsina D, catepsina Z y catepsina O.
- 15 5. El uso de una composición que comprende una levadura seca no viable y enriquecida con selenio, en la que el contenido total de selenio de dicha levadura comprende el dos por ciento o menos de selenio inorgánico en la fabricación de un medicamento para inhibir la expresión de un gen implicado en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide en un sujeto en riesgo de mostrar patología indicativa de enfermedad de Alzheimer y un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer, en el que el medicamento se formula para la administración a dicho sujeto en condiciones tales que se reduce la expresión de un gen implicado en el procesamiento de la proteína precursora del amiloide o un gen implicado en la generación del péptido  $\beta$ -amiloide.
- 20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho gen se selecciona de C1q, C1q alfa, C1q beta, C1q gamma, C1qr, Catepsina B, Catepsina D, Catepsina Z, Catepsina O, calsenilina, presenilina, nicastrina, Apbb1/Fe65, Aplp 1 y Apba 1.
- 25 7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha composición que comprende dicha levadura seca no viable y enriquecida con selenio, en donde el contenido total de selenio de dicha levadura comprende el dos por ciento o menos de selenio inorgánico, comprende una o más de otras formas de selenio.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que una o más de otras formas de selenio comprende selenito sódico.
- 30 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha composición que comprende dicha levadura seca no viable y enriquecida con selenio, en la que el contenido total de selenio de dicha levadura comprende el dos por ciento o menos de selenio inorgánico, está coformulado con un agente terapéutico contra el Alzheimer.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho agente terapéutico contra el Alzheimer se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de NDMA, un inhibidor de AChE y un quelante metálico.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho antagonista de NMDA es memantina.
- 35 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho inhibidor de AChE es tacrina, donepezilo, rivastigmina o galantamina.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho quelante metálico es clioquinol.
- 40 14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha composición que comprende dicha levadura seca no viable y enriquecida con selenio, en la que el contenido total de selenio de dicha levadura comprende el dos por ciento o menos de selenio inorgánico, está coformulada con un antioxidante.
- 45 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho antioxidante se selecciona de difenilaminas alquiladas, N-fenilendiaminas alquiladas, fenil- $\alpha$ -naftilamina, fenil- $\alpha$ -naftilamina alquilada, dimetilquinolinas, trimetildihidroquinolinas, fenoles impedidos, hidroquinonas alquiladas, tiodifeniléteres hidroxilados, alquilidienbisfenoles, tiopropionatos, ditiocarbamatos metálicos, 1,3,4,7-dimercaptotiadiazol, un compuesto de cobre soluble en aceite, NAUGALUBE 438, NAUGALUBE 438L, NAUGALUBE 640, NAUGALUBE 635, NAUGALUBE 680, NAUGALUBE AMS, NAUGALUBE APAN, Naugard PANA, NAUGALUBE TMQ, NAUGALUBE 531, NAUGALUBE 431, NAUGALUBE BHT, NAUGALUBE 403, NAUGALUBE 420, ácido ascórbico, tocoferoles, alfa-tocoferol, un compuesto de sulfhidrilo, metabisulfito sódico, N-acetil-cisteína, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, resveratrol, lactoferrina, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, polipéptido de ascorbilo, hidroxitolueno butilado, retinoides, retinol, palmitato de retinilo, tocotrienoles, ubiquinona, un flavonoide, un isoflavonoide, genisteína, diadzeína, semilla de uva, té verde, corteza de pino, própolis, IRGANOX antígeno P, SUMILIZER GA-80, beta-caroteno, licopeno, vitamina C, vitamina E y vitamina A.
- 50

16. Una composición que comprende una levadura seca no viable y enriquecida con selenio, en la que el contenido total de selenio de dicha levadura comprende el dos por ciento o menos de selenio inorgánico, un agente terapéutico contra el Alzheimer y un antioxidante.
- 5 17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho agente terapéutico contra el Alzheimer se selecciona de un antagonista de NDMA, un inhibidor de AChE y un quelante metálico.
18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho antagonista de NMDA es memantina.
19. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho inhibidor de AChE es tacrina, donepezilo, rivastigmina o galantamina.
20. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho quelante metálico es clioquinol.
- 10 21. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho antioxidante se selecciona de difenilaminas alquiladas, N-fenilendiaminas alquiladas, fenil- $\alpha$ -naftilamina, fenil- $\alpha$ -naftilamina alquilada, dimetilquinolinas, trimetildihidroquinolinas, fenoles impedidos, hidroquinonas alquiladas, tiodifeniléteres hidroxilados, alquilidibisfenoles, tiopropionatos, ditiocarbamatos metálicos, 1,3,4,7-dimercaptotiadiazol, un compuesto de cobre soluble en aceite, NAUGALUBE 438, NAUGALUBE 438L, NAUGALUBE 640, NAUGALUBE 635, NAUGALUBE 680,
- 15 NAUGALUBE AMS, NAUGALUBE APAN, Naugard PANA, NAUGALUBE TMQ, NAUGALUBE 531, NAUGALUBE 431, NAUGALUBE BHT, NAUGALUBE 403, NAUGALUBE 420, ácido ascórbico, tocoferoles, alfa-tocoferol, un compuesto de sulfhidrilo, metabisulfito sódico, N-acetil-cisteína, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, resveratrol, lactoferrina, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, polipéptido de ascorbilo, hidroxitolueno butilado, retinoides,
- 20 de uva, té verde, corteza de pino, própolis, IRGANOX, antígeno P, SUMILIZER GA-80, beta-caroteno, licopeno, vitamina C, vitamina E y vitamina A.
22. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 para usar como medicamento.

FIGURA 1

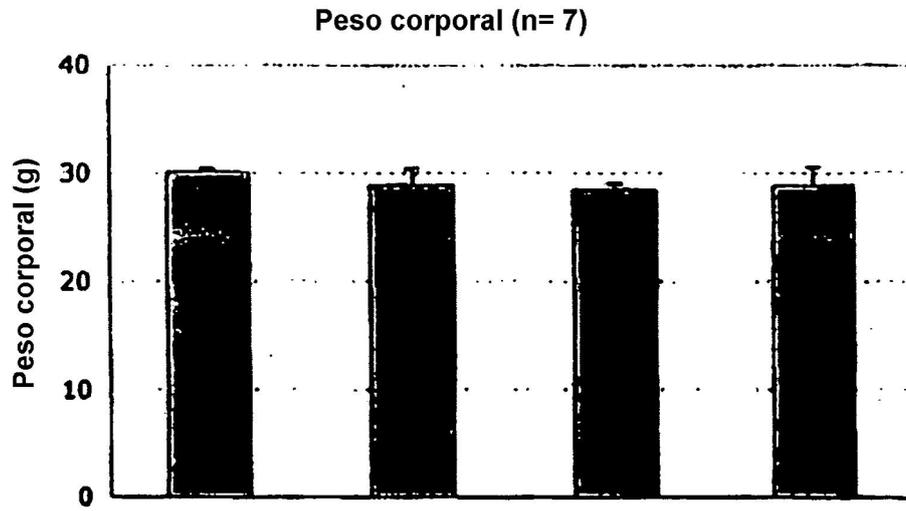


FIGURA 2

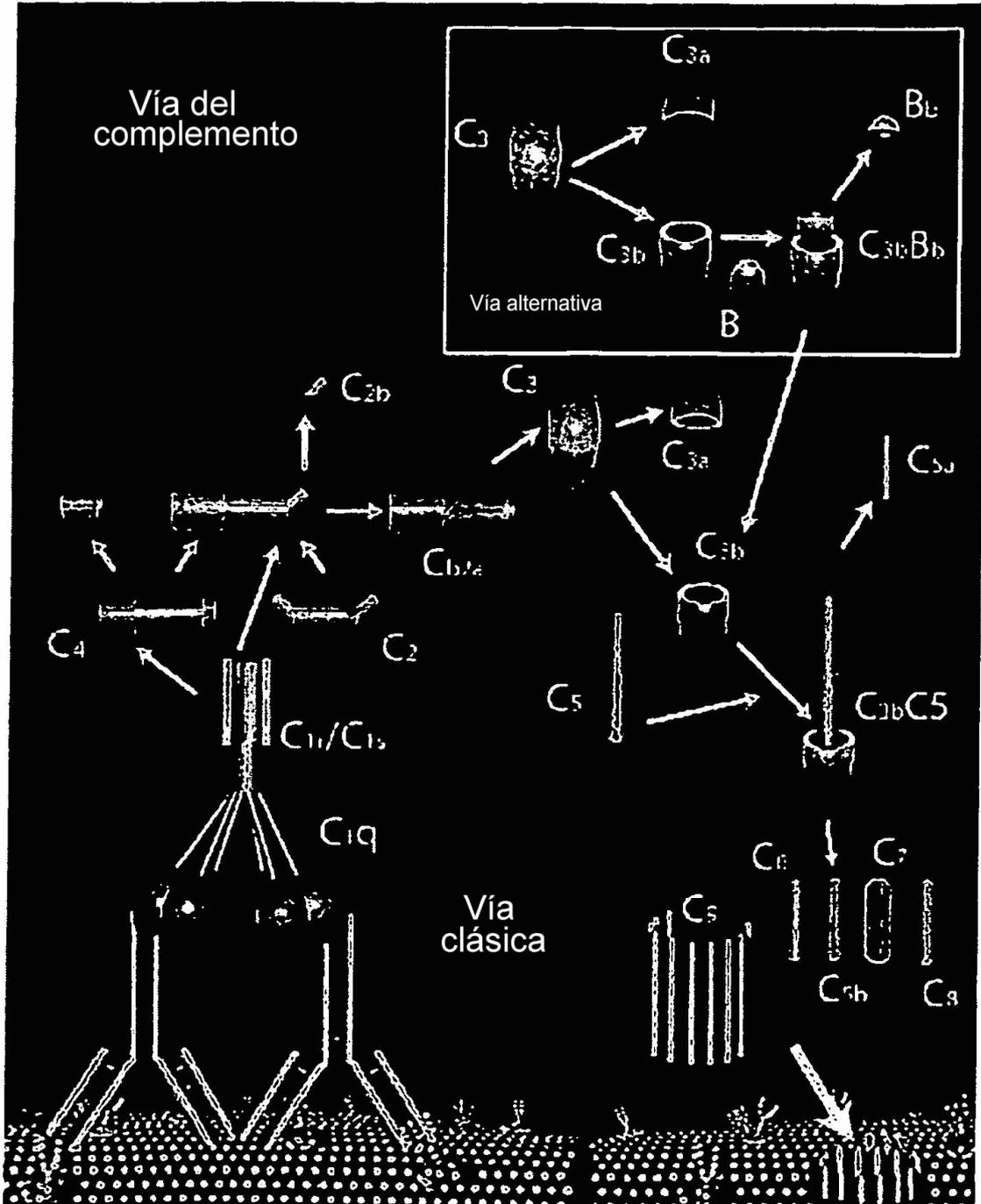


FIGURA 3

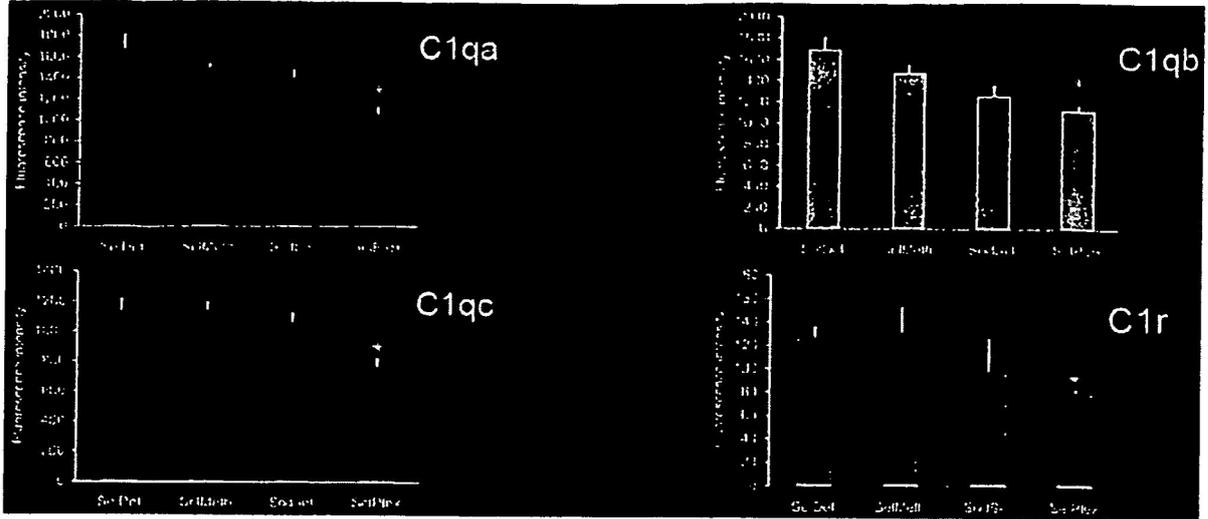


FIGURA 4

NERVIOS EFERENTES PERIFÉRICOS

