

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 943**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/28 (2006.01)
A61K 33/242 (2009.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2017** **PCT/CN2017/113112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018** **WO18095429**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2017** **E 17873826 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021** **EP 3545948**

54 Título: **Uso de clúster de oro o sustancia que contiene clúster de oro en la preparación de fármacos para prevenir y/o tratar el glaucoma**

30 Prioridad:

28.11.2016 CN 201611062360

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2021

73 Titular/es:

SHENZHEN PROFOUND-VIEW PHARMA TECH CO., LTD. (100.0%)
Room 3311, Building 9A, District II, Shenzhen Bay Eco-Technology Park, No. 3609, Baishi Road, High-tech Zone Community, Yuehai Street, Nanshan District, Shenzhen Guangdong 518000, CN

72 Inventor/es:

SUN, TAOLEI

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 886 943 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 clúster de oro o sustancia que contiene clúster de oro en la preparación de fármacos para prevenir y/o tratar el glaucoma

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo técnico de los fármacos nanométricos, en particular a la aplicación de AuC (clústeres de oro) o sustancias que contienen AuC en la preparación de fármacos para prevenir y/o tratar el glaucoma.

Antecedentes de la invención

El glaucoma es una enfermedad degenerativa del nervio óptico irreversible caracterizada por daño del nervio óptico, defecto del campo visual y pérdida gradual de la función visual. Es la segunda enfermedad ocular irreversible que provoca ceguera en el mundo después de las cataratas. Según los datos de análisis clínicos, se pronostica que para 2020, el número de pacientes con glaucoma en el mundo alcanzará los 76 millones, especialmente en Asia y África, mientras que el número de pacientes con glaucoma en China alcanzará los 21 millones para entonces. Se desconoce la patogenia del glaucoma. Durante mucho tiempo, se considera la elevación de la presión intraocular patológica uno de los principales factores que provocan daño nervioso y glaucoma. El tratamiento clínico del glaucoma se basa principalmente en la reducción de la presión intraocular de los pacientes. Sin embargo, una enorme cantidad de datos clínicos muestran que el control de la presión intraocular por sí sólo puede no lograr el objetivo de curar el glaucoma. Esto se debe a que aunque el control de la presión intraocular es ideal, pueden empeorar el daño progresivo del nervio óptico y la apoptosis de las células ganglionares de la retina (RGC, por sus siglas en inglés). Por tanto, la presión intraocular elevada puede ser sólo un factor predisponente temprano para el daño del nervio óptico relacionado con el glaucoma, mientras que es difícil prevenir una pérdida adicional de la función del nervio óptico sólo reduciendo la presión intraocular. Por los motivos anteriores, la clave para la curación del glaucoma es mejorar la función del nervio óptico, bloquear o ralentizar la apoptosis de las células del nervio óptico y el daño del nervio óptico. Sin embargo, actualmente no se ha hallado ningún fármaco clínico que prevenga eficazmente el daño del nervio óptico relacionado con el glaucoma. Los estudios han hallado que una variedad de factores puede conducir al daño del nervio óptico, tales como estrés oxidativo, estrés mecánico, anomalía sistémica autoinmunitaria, nivel de azúcar en sangre, moléculas inflamatorias y precipitación anómala de proteínas, etc. Entre los factores, se presta más atención al plegamiento incorrecto, la agregación anómala y la fibrosis de amiloide- β ($A\beta$) y la proteína Tau dentro y fuera de las células desempeñan un papel crucial en el proceso de la enfermedad degenerativa del nervio óptico y la muerte de las RGC.

$A\beta$ es una proteína que contiene 39-43 residuos de aminoácido y se genera a partir de la hidrólisis de la proteína precursora de amiloide (APP, por sus siglas en inglés) por la β -secretasa y la γ -secretasa. Es un factor importante que interviene en el daño nervioso y la apoptosis de las células nerviosas. Los estudios han demostrado que la neurotoxicidad de $A\beta$ es un mecanismo común para la formación y patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), y se ha usado como diana importante para la investigación y el desarrollo de fármacos relacionados durante mucho tiempo. Los estudios realizados en los últimos años han demostrado que la neurotoxicidad de $A\beta$ también desempeña un papel crucial en la enfermedad neurodegenerativa oftálmica: el glaucoma. La expresión de $A\beta$ en las RGC y el humor acuoso de los pacientes con glaucoma clínico es significativamente mayor que en el grupo de control. En el modelo animal de glaucoma, la apoptosis de las RGC inducida por una presión intraocular elevada a largo plazo está relacionada estrechamente con el aumento de la proteína precursora de amiloide (APP), la expresión de $A\beta$ y la hiperfosforilación excesiva de la proteína Tau. Mientras tanto, los datos clínicos muestran que es más fácil que los pacientes con EA tengan glaucoma y pérdida de visión. Y se sintetiza una gran cantidad de APP y aparece agregación de placas de $A\beta$ en la retina de animales transgénicos con EA. Por tanto, el glaucoma y la EA pueden tener mecanismos de $A\beta$ similares. Más importante aún, en el modelo animal de glaucoma, las RGC en fase apoptótica se coexpresan con $A\beta$, y los anticuerpos o fármacos de $A\beta$ que pueden bloquear la sobreproducción de $A\beta$ pueden inhibir eficazmente la apoptosis de las RGC y reducir el daño del nervio óptico. Estos resultados de investigación han demostrado que el $A\beta$ desempeña un papel importante en la patogenia del glaucoma y es una diana importante para el tratamiento del glaucoma basado en el mecanismo de protección del nervio óptico.

El modelo de rata con lesión por aplastamiento del nervio óptico es un modelo animal de glaucoma ampliamente usado sin presión intraocular elevada. Mantiene la integridad del epineuro del nervio óptico, simula la perturbación del transporte axoplásmico del nervio óptico y la muerte de RGC del glaucoma, que se acerca a las características clínicas del daño por glaucoma. Al mismo tiempo, el modelo se prepara de manera convencional y fácil de operar, lo que puede provocar un daño claro y cuantitativo del nervio óptico con pequeño error y buena repetibilidad. Es un modelo preciso para el daño del nervio óptico del glaucoma, que está bien reconocido a nivel nacional y en el extranjero, y usado ampliamente en los estudios de los mecanismos patológicos del daño del nervio óptico y la lesión de RGC del glaucoma y la detección de fármacos para la protección del nervio óptico. Por ejemplo, a partir de este modelo, se ha hallado que el ginsenosido Rg1, la dexametasona, el ginkgo y el ácido α -lipoico tienen determinados efectos protectores del nervio óptico, pero los efectos protectores no son satisfactorios. Dado que el mecanismo de $A\beta$

desempeña un papel importante en el proceso de daño del nervio óptico, el desarrollo de un fármaco que pueda inhibir la agregación y fibrosis de A β mientras se protege el nervio óptico y mejora la función visual en el modelo animal tendrá una gran importancia para la prevención y el tratamiento del glaucoma.

- 5 Las nanopartículas de oro son partículas de oro a escala nanométrica (el diámetro de los núcleos de oro es de 3-100 nm en general). Debido a sus propiedades ópticas y eléctricas únicas, buena biocompatibilidad y modificación de superficie conveniente, las nanopartículas de oro se usan ampliamente en biología y campos médicos relacionados, tales como biosensores, formación de imágenes médicas y detección de tumores. Debido a su inercia química y gran área de superficie específica y la capacidad para penetrar a través de la barrera hematoencefálica a bajas concentraciones, las nanopartículas de oro también se usan como portadores de fármacos en la investigación del transporte direccional y la liberación controlable de fármacos, etc. En los últimos años, se investiga sobre la unión de nanopartículas de oro con ligandos específicos (tales como heteropolíácidos y polipéptidos de secuencia específica) que inhiben la agregación de proteínas fibróticas, logrando determinados efectos en experimentos de inhibición de fibrosis de proteínas *in vitro*, pero los resultados del modelo celular indican que el uso de Las nanopartículas de oro no tiene un efecto evidente sobre la tasa de supervivencia de las células dañadas por fibrina (documento 1: N. Gao, H. Sun, K. Dong, J. Ren, X. Qu, Chemistry-A European Journal 2015, 21, 829). Aún no se ha notificado ningún experimento a nivel del modelo animal. Además, en estas investigaciones, las nanopartículas de oro se usaron principalmente como portadores de fármacos además de como principios activos.
- 10
- 15
- 20 Los clústeres de oro (AuC) son nanopartículas de oro ultrafinas con un núcleo de oro de menos de 3 nm de diámetro. Contiene sólo de unos pocos a cientos de átomos de oro, lo que hace que la estructura de empaquetamiento cúbico centrado en las caras de los átomos de oro en las nanopartículas de oro convencionales colapse y el nivel de energía se desdoble, mostrando así propiedades similares a una molécula que son por completo diferentes de las nanopartículas de oro convencionales de más de 3 nm: por un lado, debido del desdoblamiento de niveles de energía, los AuC no presentan el efecto de plasmón superficial y las propiedades ópticas derivadas de las nanopartículas de oro convencionales, pero muestran excelentes propiedades de emisión de fluorescencia similares a los puntos cuánticos de semiconductor. Por otro lado, en el espectro de absorción ultravioleta-visible de los AuC, desaparece el pico de resonancia del plasmón a 520 ± 20 nm, mientras que aparecen uno o más nuevos picos de absorción por encima de 570 nm, y tales picos de absorción pueden no observarse en las nanopartículas de oro convencionales. Por tanto, la desaparición del pico de absorción de resonancia del plasmón (520 ± 20 nm) y la aparición de los nuevos picos de absorción por encima de 570 nm en el espectro de absorción UV-visible son indicadores importantes para evaluar si los AuC se preparan con éxito (documento 2: H.F. Qian, M.Z. Zhu, Z.K. Wu, R.C. Jin, Accounts of Chemical Research 2012, 45, 1470). Los AuC también tienen propiedades magnéticas, eléctricas y catalíticas que son significativamente diferentes de las de las nanopartículas de oro convencionales, de modo que tienen amplias perspectivas de aplicación en los campos de la optoelectrónica de molécula única, la catálisis molecular. Además, los AuC también se han usado en los campos de las sondas biológicas y la formación de imágenes médicas debido a sus excelentes propiedades de emisión de fluorescencia. Por ejemplo, el equipo de Sandeep Verma usa AuC modificados con purina como sondas fluorescentes verdes para la obtención de imágenes del núcleo (documento 3: V. Venkatesh, A. Shukla, S. Sivakumar, S. Verma, ACS Applied Materials & Interfaces 2014, 6, 2185). Este tipo de documentos utiliza las propiedades de fluorescencia de los AuC y no se relaciona con la actividad farmacéutica de los propios AuC. El documento de patente US 2004/0186534 describe dispositivos y técnicas para tratar el glaucoma.
- 25
- 30
- 35
- 40

Sumario de la invención

- 45 El objeto de la presente invención es proporcionar un uso médico de los AuC, y específicamente proporcionar una nueva aplicación de los mismos en la preparación de fármacos para prevenir y tratar el glaucoma.

En el primer aspecto, la presente invención proporciona clústeres de oro (AuC) o sustancias que contienen AuC según la reivindicación 1 para su uso en un método de prevención y/o tratamiento del glaucoma.

- 50 Las sustancias que contienen AuC comprenden AuC y ligando Y que recubre los AuC externamente.

Las sustancias que contienen AuC están en disolución, polvo o flóculo.

- 55 El diámetro del núcleo de oro de los AuC es menor de 3 nm.

El diámetro del núcleo de oro de los AuC es de 0,5-2,6 nm o de 1,1-2,6 nm.

- 60 El ligando Y incluye, sin limitación, uno o más de L(D)-cisteína y sus derivados, oligopéptidos que contienen cisteína y sus derivados, y otros compuestos que contienen tiol.

La L(D)-cisteína y sus derivados son L(D)-cisteína, N-isobutiril-L(D)-cisteína (L(D)-NIBC) o N-acetil-L(D)-cisteína (L(D)-NAC).

- 65 Los oligopéptidos que contienen cisteína y sus derivados se seleccionan de L-arginina-L-cisteína (RC), L-cisteína-L-arginina (CR), dipéptido de L-cisteína-L-histidina (CH), dipéptido de L-histidina-L-cisteína (HC), L-glutión (GSH),

tripéptido de L-lisina-L-cisteína-L-prolina (KCP), tripéptido de L-prolina-L-cisteína-L-arginina (PCR), tripéptido de glicina-L-cisteína-L-arginina (GCR), tetrapéptido de glicina-L-serina-L-cisteína-L-arginina (GSCR) o tetrapéptido de glicina-L-cisteína-L-serina-L-arginina (GCSR).

- 5 Otros compuestos que contienen tiol se seleccionan de 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (Cap), ácido tioglicólico, mercaptoetanol, tiofenol, D-3-trolovol, N-(2-mercaptopropionil)-glicina o dodecilmercaptano, etc.

Un método para preparar las sustancias que contienen AuC comprende las siguientes etapas:

- 10 (1) disolver HAuCl_4 en uno de metanol, agua, etanol, n-propanol y acetato de etilo, obteniéndose una disolución A en la que la concentración de HAuCl_4 es de 0,01~0,03 M;

(2) disolver el ligando Y en un disolvente para obtener una disolución B en la que la concentración de ligando Y es de 0,01~0,18 M;

- 15 (3) mezclar la disolución A en la etapa (1) con la disolución B en la etapa (2) en las que la razón molar de HAuCl_4 y el ligando Y es de 1:0,01~1:100 (preferiblemente 1:(0,2-10) más preferiblemente 1:(1-10)), y agitar la mezcla en un baño de hielo durante 0,1~12 h (preferiblemente 0,1-2 h, más preferiblemente 0,5-2 h), añadir gota a gota disolución de NaBH_4 0,025~0,8 M (preferiblemente disolución acuosa de NaBH_4 , disolución etanólica de NaBH_4 o disolución metanólica de NaBH_4) y luego agitar el sistema de reacción en un baño de hielo durante 0,1~12 h (preferiblemente 0,1-2 h, más preferiblemente 1-2 h), en los que la razón molar de NaBH_4 y el ligando Y es de 1:0,01~1:100 (preferiblemente 1:(0,1-8) más preferiblemente 1:(1-8)) para obtener las sustancias similares a una disolución que contienen AuC.

- 25 El disolvente en la etapa (2) es uno o más de metanol, acetato de etilo, agua, etanol, n-propanol, pentano, ácido fórmico, ácido acético, dietil éter, acetona, anisol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, pentanol, etanol, acetato de butilo, tributil metil éter, acetato de isopropilo, dimetilsulfóxido, acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de metilo, 2-metil-1-propanol y acetato de propilo.

- 30 Las sustancias similares a una disolución que contienen AuC obtenidas en la etapa (3) se dializan, se liofilizan y luego se obtienen sustancias pulverulentas o floculantes que contienen AuC; preferiblemente, la diálisis consiste en que las sustancias similares a una disolución que contienen AuC se colocan en una bolsa de diálisis y se dializan en agua a temperatura ambiente durante 1~7 días.

- 35 En el segundo aspecto, la presente invención proporciona una aplicación de AuC según la reivindicación 1 para su uso en un método de prevención y/o tratamiento del glaucoma. El diámetro del núcleo de oro de los AuC es menor de 3 nm. Los AuC pueden modificarse con diferentes ligandos, que pueden ser componentes eficaces o ineficaces para el glaucoma.

- 40 En el tercer aspecto, la presente invención proporciona una aplicación de AuC modificados con el ligando de L-NIBC, D-NIBC, CR, RC, N-acetil-L-cisteína (L-NAC), N-acetil-D-cisteína (D-NAC), GSH, 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (Cap), L-cisteína o D-cisteína según la reivindicación 1 para su uso en un método de prevención y/o tratamiento del glaucoma.

- 45 El diámetro del núcleo de oro de los AuC es menor de 3 nm, preferiblemente de 0,5-2,6 nm.

Los AuC o las sustancias que contienen AuC (haciendo referencia a AuC modificados con ligando) proporcionados en la presente invención pueden administrarse por vía oral, mediante inyección (inyección intramuscular o intravenosa) o colirio local. La dosificación y la frecuencia de administración pueden calcularse según los resultados de experimentos con modelos celulares, experimentos con modelos animales, experimentos metabólicos y de distribución de fármacos *in vivo*.

- 55 En términos de eficacia, los AuC o las sustancias que contienen AuC proporcionados en la presente invención muestran un efecto excelente sobre la inhibición de la agregación de A β en un experimento *in vitro* de inhibición de la agregación de A β y un efecto significativo sobre la mejora de la tasa de supervivencia celular en el modelo de lesión de células ganglionares ópticas RGC-5. En el modelo de lesión por pinzamiento del nervio óptico por glaucoma de rata, pueden aumentar significativamente la amplitud de N2-P2 de los potenciales evocados visuales de destellos en ratas del modelo de lesión por aplastamiento del nervio óptico y reducirse significativamente la pérdida de RGC. Tienen un efecto protector evidente sobre el daño del nervio óptico, pueden reducir el defecto del campo visual y la apoptosis de las RGC, y tienen una función notable en la mejora de la estructura del tejido del nervio óptico y la retina y en el alivio de la disfunción visual. Además, tienen una gran biocompatibilidad a nivel animal. Por tanto, es importante para la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos para prevenir y tratar el glaucoma.

- 65 Al mismo tiempo, la presente invención también demuestra que las propias moléculas de ligando no tienen un efecto evidente en el experimento cinético de inhibición de la agregación de A β *in vitro* y el modelo celular de glaucoma de

lesión de células RGC-5, lo que indica que la eficacia sobre el glaucoma proviene de AuC más que del ligando. El nuevo uso médico de los AuC es una contribución importante de la presente invención. Basándose en su actividad farmacéutica de los AuC para el glaucoma, si los AuC se combinan además con sustancias activas conocidas (incluyendo, pero sin limitarse a, la actividad contra el glaucoma) u otras sustancias inactivas tales como portadores y codisolventes, se formarán nuevos fármacos más competitivos.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra espectros ultravioleta-visible (UV), imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) y diagramas de distribución de tamaño de partícula de nanopartículas de oro modificadas con ligando L-NIBC con diferentes tamaños de partícula.

La figura 2 muestra espectros ultravioleta-visible, imágenes de TEM y diagramas de distribución de tamaño de partícula de AuC modificados con el ligando L-NIBC con diferentes tamaños de partícula.

La figura 3 muestra espectros de infrarrojo de AuC modificados con el ligando L-NIBC con diferentes tamaños de partícula.

La figura 4 muestra espectros de excitación y espectros de emisión de fluorescencia en el infrarrojo cercano de AuC modificados con L-NIBC en un diámetro promedio de 1,8 nm.

La figura 5 muestra topografías de AFM después de que las nanopartículas de oro o AuC modificados con A β (1-40) y el ligando L-NIBC se incuban conjuntamente durante 48 h.

La figura 6 muestra las curvas de cinética de la fibrosis de A β con nanopartículas de oro o AuC modificados con el ligando L-NIBC de diferentes tamaños de partícula y diferentes concentraciones.

La figura 7 muestra los diagramas de distribución de tamaño de partícula, UV, infrarrojos y TEM de AuC modificados con el ligando CR (CR-AuC).

La figura 8 muestra los diagramas de distribución de tamaño de partícula, TEM, infrarrojos y UV de los AuC modificados con el ligando RC (RC-AuC).

La figura 9 muestra los diagramas de distribución de tamaño de partícula, UV, infrarrojos y TEM de AuC modificados con el ligando 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (es decir, Cap) (Cap-AuC).

La figura 10 muestra los diagramas de distribución de tamaño de partícula, UV, infrarrojos y TEM de AuC modificados con el ligando GSH (GSH-AuC).

La figura 11 muestra los diagramas de distribución de tamaño de partícula, UV, infrarrojos y TEM de AuC modificados con el ligando D-NIBC (D-NIBC-AuC).

La figura 12 muestra las curvas del efecto inhibitor de los AuC modificados con diferentes ligandos sobre la agregación y fibrosis de A β (1-40).

La figura 13 muestra el efecto de AuC modificados con el ligando L-NIBC o las nanopartículas de oro sobre la viabilidad celular glaucoma por estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en el modelo de células RGC-5.

La figura 14 muestra el efecto de nanopartículas de oro o AuC modificados con el ligando L-NIBC sobre la viabilidad celular del glaucoma por apoptosis inducida por nitroprusiato de sodio en un modelo de células RGC-5.

La figura 15 muestra el efecto de sustancias que contienen AuC sobre la latencia de N2 de PEVd de ojos de rata en el modelo de glaucoma.

La figura 16 muestra el efecto de sustancias que contienen AuC sobre la latencia de P2 de PEVd de ojos de rata en el modelo de glaucoma.

La figura 17 muestra el efecto de sustancias que contienen AuC sobre la amplitud de N2-P2 de PEVd de ojos de rata en el modelo de glaucoma.

La figura 18 muestra la tinción con Brn3a del parche de retina animal y gráficos de análisis estadístico del número de células positivas teñidas después de que se administraron las sustancias que contenían AuC durante 14 días consecutivos.

La figura 19 muestra los resultados de tinción con HE de secciones patológicas de retina animal y gráficos de análisis estadístico del número de RGC después de que se administraron las sustancias que contenían AuC durante 14 días

consecutivos.

La figura 20 muestra diagramas que muestran el efecto de AuC modificados con L-NIBC de diferentes tamaños de partícula y diferentes concentraciones sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-sy5y.

Descripción detallada de las realizaciones

Al estudiar el efecto de las nanopartículas de oro (diámetro del núcleo de oro de 3 nm-100 nm) con determinados ligandos sobre la agregación de A β , los inventores descubrieron que cuando el diámetro del núcleo de oro de las nanopartículas de oro cambiaba de grande a pequeño, el efecto de fomento de las nanopartículas de oro modificadas con el mismo ligando en sus superficies sobre la agregación de A β se convirtió en inhibidor; cuando el tamaño de partícula era lo suficientemente pequeño como para convertirse en clústeres de oro (AuC) (el diámetro del núcleo de oro es menor de 3 nm), pudo lograrse la inhibición completa de la agregación de A β . En este efecto, son los propios AuC más que los ligandos los que desempeñan un papel inhibidor.

Generalmente, el diámetro del núcleo de oro de las nanopartículas de oro usadas en la investigación es mayor de 3 nm, y cuando el diámetro del núcleo de oro es menor de 3 nm, se denominan clústeres de oro (AuC). La desaparición del pico de absorción de resonancia del plasmón (520 ± 20 nm) y la aparición de nuevos picos de absorción por encima de 560 nm o 570 nm en el espectro de absorción UV-visible son las características que indican si los AuC se preparan con éxito. Sin ligandos, los AuC no pueden existir de manera estable en una disolución. Se combina con ligando que contiene tiol para formar AuC modificados con ligando (o denominados AuC) a través del enlace Au-S.

Los AuC modificados con ligando existentes descritos en la bibliografía incluyen AuC modificados con L-glutatión (GSH), N-acetil-L(D)-cisteína (L(D)-NAC), N-isobutiril-L(D)-cisteína (L(D)-NIBC), etc. El proceso de preparación se muestra en los documentos (documento 4: H. F. Qian, M. Z. Zhu, Z. K. Wu, R. C. Jin, Accounts of Chemical Research 2012, 45, 1470; documento 5: C. Gautier, T. Bürgi, Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 11079); se aplican principalmente en los campos de la catálisis, el reconocimiento quiral, la detección molecular, la detección biológica, la administración de fármacos y la formación de imágenes biológicas (documento 6: G. Li, R. C. Jin, Accounts of Chemical Research 2013, 46, 1749; documento 7: H. F. Qian, M. Z. Zhu, Z. K. Wu, R. C. Jin, Accounts of Chemical Research 2012, 45, 1470; documento 8: J. F. Parker, C. A. Fields-Zinna, R. W. Murray, Accounts of Chemical Research 2010, 43, 1289; S. H. Yau, O. Varnavski, T. Goodson, Accounts of Chemical Research 2013, 46, 1506).

La presente invención investigó los efectos de los AuC sobre la inhibición de la agregación de A β , incluyendo al menos: en primer lugar, se usaron como objetos de investigación AuC de diferentes tamaños que contenían diferentes ligandos (los ligandos que no tienen efecto inhibidor sobre la agregación de A β). A través de la investigación en tres niveles de experimentos, incluyendo experimentos *in vitro* para la inhibición de la agregación de A β , experimento del modelo de lesión de células ganglionares ópticas RGC-5, modelo de rata con lesión por aplastamiento del nervio óptico, y considerando la citotoxicidad de los AuC, experimento de toxicidad aguda en ratones, experimento de distribución y farmacocinética *in vivo* en ratones, etc., se proporcionaron AuC modificados con ligando, se halló su aplicación en la preparación de fármacos para el tratamiento del glaucoma y se compararon los resultados con los resultados experimentales de nanopartículas de oro, que indicaron que las nanopartículas de oro con un diámetro de más de 3 nm no tienen un efecto deseable para este propósito y no pueden usarse para preparar fármacos que traten el glaucoma, mientras que los AuC modificados con ligando pueden usarse para preparar fármacos que tratan del glaucoma.

A continuación, la presente invención se detallará adicionalmente en realizaciones, pero esas realizaciones no deben entenderse que constituyen ninguna limitación de la presente invención.

La pureza de las materias primas usadas en las siguientes realizaciones será la pureza química o superior. Todas pueden adquirirse en el mercado.

Realización 1: preparar AuC modificados con ligando

Esta realización da a conocer un método para preparar AuC modificados con ligando (los AuC modificados con ligando también se denominan sustancias que contienen AuC en la presente invención), comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

(1) disolver HAuCl₄ en uno de metanol, agua, etanol, n-propanol y acetato de etilo para obtener una disolución A en la que la concentración de HAuCl₄ es de 0,01~0,03M;

(2) disolver el ligando Y en un disolvente para obtener una disolución B en la que la concentración de ligando Y es de 0,01~0,18 M; el ligando Y incluye, pero no se limita a, L(D)-cisteína y otros derivados de cisteína tales como N-isobutiril-L-cisteína (L-NIBC), N-isobutiril-D-cisteína (D-NIBC), N-acetil-L-cisteína y N-acetil-D-cisteína, oligopéptidos que contienen cisteína y sus derivados, incluyendo, pero sin limitarse a, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y otros péptidos que contienen cisteína, tales como el dipéptido de L-cisteína-L-arginina (CR),

dipéptido de L-arginina-L-cisteína (RC), L-cisteína L-histidina (CH), L-histidina-L-cisteína (HC), L-lisina-L-cisteína-L-prolina (KCP), tripéptido de glicina-L-cisteína-L-arginina (GCR), tripéptido de L-prolina-L-cisteína-L-arginina (PCR), L-glutación (L-GSH), tetrapéptido de glicina-L-serina-L-cisteína-L-arginina (GSCR) y tetrapéptido de glicina-L-cisteína-L-serina-L-arginina (GCSR) y otros compuestos que contienen tiol, tales como uno o más de 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (Cap), ácido tioglicólico, mercaptoetanol, tiofenol, D-3-trolovol y dodecilmercaptano; el disolvente es uno o más de entre metanol, acetato de etilo, agua, etanol, n-propanol, pentano, ácido fórmico, ácido acético, dietil éter, acetona, anisol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, pentanol, etanol, acetato de butilo, tributil metil éter, acetato de isopropilo, dimetilsulfóxido, acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de metilo, 2-metil-1-propanol y acetato de propilo;

(3) mezclar la disolución A y la disolución B de modo que la razón molar entre HAuCl_4 y el ligando Y sea de 1:(0,1~10), agitándolos en un baño de hielo durante 0,1~24 h, añadiendo disolución de NaBH_4 0,025~0,8 M en agua, etanol o metanol, continuando su agitación en un baño de agua con hielo y hacer reaccionar durante 0,1~2 h. La razón molar entre NaBH_4 y el ligando Y es de 1:(0,1~8); entonces se obtienen sustancias similares a una disolución que contienen AuC;

Para obtener AuC en diferentes tamaños, medir el tamaño de las partículas y facilitar el uso, pueden seguirse las siguientes etapas:

(4) la disolución obtenida en la etapa (3) se centrifuga a diferente velocidad en el intervalo de 8.000~17.500 r/min mediante gradiente durante 10~100 min después de que termina la reacción, se obtienen los precipitados de AuC modificados con ligando en diferentes tamaños de partícula promedio en diferentes velocidades de rotación;

(5) disolver en agua el precipitado de AuC en diferentes tamaños de partícula promedio obtenidos en la etapa (4), ponerlo en una bolsa de diálisis y dializarlo en agua a temperatura ambiente durante 1~7 días;

(6) liofilizar los AuC durante 12~24 h después de la diálisis para obtener una sustancia pulverulenta o floculante, es decir, AuC modificados con ligando.

Se caracterizó la sustancia pulverulenta o floculante obtenida (el método de detección específico se muestra en la realización 2). Se halló que el tamaño de partícula de los precipitados obtenidos mediante centrifugación a diferentes velocidades de rotación era menor de 3 nm (distribuido en 0,5-2,6 nm en general). El espectro de absorción UV-visible tiene uno o más picos de absorción por encima de 570 nm y ningún pico de absorción evidente a 520 nm. Se determina que el polvo o flóculo obtenido son AuC.

Realización 2: Preparación de AuC con ligando que es N-isobutiril-L-cisteína (L-NIBC)

Tomando el ligando L-NIBC por ejemplo en esta realización, se detallan la preparación y confirmación de AuC modificados con el ligando L-NIBC en diferentes tamaños de partícula.

(1) pesar 1,00 g de HAuCl_4 y disolverlo en 100 ml de metanol para obtener una disolución A 0,03 M;

(2) pesar 0,57 g de L-NIBC y disolverlo en 100 ml de ácido acético glacial (ácido acético) para obtener una disolución B 0,03 M;

(3) medir 1 ml de disolución A, mezclarlo con 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml de disolución B, respectivamente (es decir, la razón molar entre HAuCl_4 y L-NIBC es de 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, respectivamente), hacer reaccionar en un baño de hielo con agitación durante 2 h, añadir rápidamente 1 ml de disolución acuosa de NaBH_4 0,03M recién preparada (preparada pesando 11,3 mg de NaBH_4 y disolviéndolo en 10 ml de etanol) cuando la disolución se vuelve incolora desde amarillo brillante, continuar la reacción durante 30 minutos después de que la disolución se vuelva de color marrón oscuro y añadir 10 ml de acetona para terminar la reacción.

(4) Después de la reacción, la disolución de reacción se somete a centrifugación diferencial (es decir, mediante centrifugación en gradiente) para obtener polvo de AuC modificados con L-NIBC con diferentes tamaños de partícula. Esta etapa puede usarse en combinación con un tubo de ultrafiltración y un método específico: después de que se completa la reacción de la etapa (3), la disolución de reacción se transfiere a un tubo de ultrafiltración con un MWCO de 100.000 y un volumen de 50 ml, y se centrifuga a 10000 r/min durante 20 min, y el precipitado de material retenido en el tubo era un polvo de AuC modificados con L-NIBC con un tamaño de partícula de aproximadamente 2,6 nm (se midieron 2,6 nm resuspendiendo este precipitado de material retenido en agua ultrapura). Luego, el tubo se transfiere a un tubo de ultrafiltración con un volumen de 50 ml y MWCO de 50.000 y se centrifuga a 13.000 r/min durante 30 min. El precipitado de material retenido en el tubo es un polvo de AuC modificados con L-NIBC con un tamaño de partícula de aproximadamente 1,8 nm (se midieron 1,8 nm resuspendiendo este precipitado de material retenido en agua ultrapura). Luego, se transfiere la disolución fuera del tubo a un tubo de ultrafiltración con un volumen de 50 ml y MWCO de 30.000 y se centrifuga a 17.500 r/min durante 40 min. El precipitado de material retenido en el tubo interior es polvo de AuC modificados con L-NIBC con un tamaño de partícula de aproximadamente 1,1 nm (se midieron 1,1 nm resuspendiendo este precipitado de

material retenido en agua ultrapura).

(5) El polvo en tres tamaños de partícula diferentes se obtuvo mediante centrifugación en gradiente, luego se eliminó el disolvente, respectivamente, se obtuvo el producto en bruto. El producto en bruto se secó por soplado con N_2 , se disolvió en 5 ml de agua ultrapura, se puso en una bolsa de diálisis (el MWCO es de 7.000 Da), luego en 2 l de agua ultrapura. El agua se cambió cada dos días y se dializó durante 7 días, se liofilizó y se guardó para uso futuro.

Se llevó a cabo un experimento de caracterización para el polvo obtenido anteriormente (AuC modificados con el ligando L-NIBC). Mientras tanto, se usan como control nanopartículas de oro modificadas con el ligando L-NIBC. El método para preparar nanopartículas de oro con ligando que es L-NIBC se refiere a la referencia (documento 10: W. Yan, L. Xu, C. Xu, W. Ma, H. Kuang, L. Wang y N. A. Kotov, *Journal of the American Chemical Society* 2012, 134, 15114; X. Yuan, B. Zhang, Z. Luo, Q. Yao, D. T. Leong, N. Yan y J. Xie, *Angewandte Chemie International Edition* 2014, 53, 4623).

1. Observar la morfología por microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Se disolvieron los polvos de prueba (muestra de AuC modificados con L-NIBC preparada en la realización 2 y muestra de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC) en agua ultrapura a 2 mg/l como muestras, y luego se prepararon muestras de prueba mediante el método de gota colgante. El método específico: se añadieron por goteo 5 μ l de las muestras sobre una película de carbono ultradelgada, se volatilizaron de manera natural hasta que desapareció la gota de agua, y luego se observó la morfología de las muestras mediante TEM de alta resolución de emisión de campo JEM-2100F STEM/EDS.

Las cuatro imágenes de TEM de nanopartículas de oro modificadas con el ligando L-NIBC se muestran en los paneles B, E, H y K de la figura 1; las tres imágenes de TEM de los AuC modificados con el ligando L-NIBC se muestran en los paneles B, E y H de la figura 2.

Las imágenes de la figura 2 indican que las muestras de AuC modificados con L-NIBC tienen un tamaño de partícula uniforme y buena dispersabilidad, y el diámetro promedio de los AuC modificados con L-NIBC (remítase al diámetro del núcleo de oro) es de 1,1 nm, 1,8 nm y 2,6 nm, respectivamente, con buena concordancia con los resultados de los paneles C, F e I de la figura 2. En comparación, las muestras de nanopartículas de oro modificadas con ligando L-NIBC tienen un mayor tamaño de partícula. Su diámetro promedio (remítase al diámetro del núcleo de oro) es de 3,6 nm, 6,0 nm, 10,1 nm y 18,2 nm, respectivamente, con buena concordancia con los resultados de los paneles C, F, I y L de la figura 1.

2. Espectro de absorción ultravioleta (UV)-visible (vis)

Se disolvió el polvo de prueba en agua ultrapura hasta que la concentración fue de 10 mg $\cdot$ l⁻¹, y se midió mediante el espectro de absorción UV-vis a temperatura ambiente. El intervalo de barrido fue de 190-1100 nm, la celda de muestra era una cubeta de cuarzo convencional con un camino óptico de 1 cm y se llenó la celda de referencia con agua ultrapura.

Los espectros de absorción UV-vis de las cuatro muestras de nanopartículas de oro modificadas con el ligando L-NIBC con diferentes tamaños se muestran en los paneles A, D, G y J de la figura 1, y la distribución estadística del tamaño de partícula se muestra en los paneles C, F, I y L de la figura 1; los espectros de absorción UV-vis de tres muestras de los AuC modificados con el ligando L-NIBC con diferentes tamaños se muestran en los paneles A, D y G de la figura 2, y la distribución estadística del tamaño de partícula se muestra en los paneles C, F e I de la figura 2.

La figura 1 indica que debido al efecto del plasmón superficial, las nanopartículas de oro modificadas con ligando L-NIBC tenían un pico de absorción a aproximadamente 520 nm. La posición del pico de absorción es relevante con respecto al tamaño de partícula. Cuando el tamaño de partícula es de 3,6 nm, el pico de absorción de UV aparece a 516 nm; cuando el tamaño de partícula es de 6,0 nm, el pico de absorción de UV aparece a 517 nm; cuando el tamaño de partícula es de 10,1 nm, el pico de absorción de UV aparece a 520 nm, y cuando el tamaño de partícula es de 18,2 nm, el pico de absorción aparece a 523 nm. Ninguna de las cuatro muestras tiene ningún pico de absorción por encima de 560 nm o 570 nm.

La figura 2 indica que en los espectros de absorción UV de tres muestras de AuC modificados con L-NIBC de ligando con diferentes tamaños de partícula en la realización 2, desapareció el pico de absorción del efecto del plasmón superficial a 520 nm y aparecieron dos picos de absorción evidentes por encima de 570 nm y las posiciones de los picos de absorción variaron ligeramente con los tamaños de partícula de los AuC. Esto se debe a que los AuC muestran propiedades similares a una molécula debido al colapso de la estructura cúbica centrada en las caras, lo que conduce a la discontinuidad de la densidad de estados de los AuC, el desdoblamiento de niveles de energía, la desaparición del efecto de resonancia del plasmón y la aparición de un nuevo pico de absorción en la dirección de onda larga. Pudo concluirse que las tres muestras de polvo en diferentes tamaños de partícula obtenidas en la realización 2 son AuC modificados con ligando.

3. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

Se midieron los espectros de infrarrojo en un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier VERTEX80V fabricado por Bruker en un modo de reflexión total de alto vacío de polvo sólido. El intervalo de barrido es de 4000-400 cm^{-1} y el número de barridos es de 64. Tomando las muestras de AuC modificados con L-NIBC preparadas en la realización 2, por ejemplo, las muestras de prueba eran polvo seco de AuC modificados con L-NIBC con tres tamaños de partícula diferentes y la muestra de control era polvo de L-NIBC puro. Se muestran los resultados en la figura 3.

La figura 3 muestra el espectro de infrarrojo de AuC modificados con L-NIBC con diferentes tamaños de partícula. En comparación con el L-NIBC puro (la curva en la parte superior), las vibraciones de tensión S-H de los AuC modificados con L-NIBC con diferentes tamaños de partícula desaparecieron todos por completo a los 2500-2600 cm^{-1} , mientras que todavía se observaron otros picos característicos de L-NIBC, lo que demuestra que las moléculas de L-NIBC se anclaron con éxito a la superficie de los AuC a través del enlace Au-S. La figura también muestra que el espectro de infrarrojo de los AuC modificados con ligando es irrelevante con respecto a su tamaño.

4. Espectro de fluorescencia de infrarrojo cercano

Se midió el espectro de fluorescencia de infrarrojo cercano en un espectrómetro de fluorescencia de ultravioleta-visible-infrarrojo cercano NanoLog producido por Horiba JobinYvon. La celda de muestra era una cubeta de cuarzo convencional con un camino óptico de 1 cm. La longitud de onda de excitación fue de 415 nm y la anchura de la rendija fue de 10 nm. El intervalo de longitud de onda de emisión detectada fue de 700-1.500 nm y la anchura de la rendija fue de 10 nm. Tomando muestras de AuC modificados con L-NIBC en la realización 2 como ejemplo, se muestran los resultados en la figura 4.

La figura 4 era un espectro de excitación y un espectro de emisión de fluorescencia de infrarrojo cercano de AuC modificados con L-NIBC en un diámetro promedio de 1,8 nm. Se halló que debido al desdoblamiento de niveles de energía, los AuC también presentaban propiedades de emisión de fluorescencia similares a los puntos cuánticos de semiconductor. Los AuC de otros tamaños de partícula y ligandos también tenían esta propiedad, pero las posiciones de pico del espectro de excitación y del espectro de emisión variaban ligeramente con los ligandos y los tamaños de partícula de los AuC. Las nanopartículas de oro con el mismo ligando no tenían características de emisión de fluorescencia en todas las bandas.

Se prepararon AuC modificados por otro ligando Y mediante un método similar al método anterior, excepto que se ajustaron ligeramente el disolvente de la disolución B, la razón de alimentación entre HAuCl_4 y el ligando Y, el tiempo de reacción y la cantidad de NaBH_4 añadido. Por ejemplo: cuando se usa L-cisteína, D-cisteína, N-isobutiril-L-cisteína (L-NIBC) o N-isobutiril-D-cisteína (D-NIBC) como el ligando Y, se selecciona ácido acético como disolvente; cuando se usa el dipéptido CR, el dipéptido RC o 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina como el ligando Y, se selecciona agua como disolvente, y así sucesivamente; otras etapas son similares, de modo que no se describirán con detalle en este caso.

La presente invención preparó y obtuvo una serie de AuC modificados con ligando mediante el método anterior. Los ligandos y los parámetros del proceso de preparación se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Parámetros de preparación de AuC modificados con diferentes ligandos

Realiza- ciones	Ligando Y	Parámetro				
		Disolvente usado para la disolución B	Razón de alimentación entre HAuCl_4 e Y	Tiempo de reacción en un baño de hielo con agitación antes de la adición de NaBH_4	Razón molar entre HAuCl_4 y NaBH_4	Tiempo de reacción en un baño de hielo con agitación después de la adición de NaBH_4
1	L-cisteína	Ácido acético	1:3	2 h	1:2	0,5 h
2	D-cisteína	Ácido acético	1:3	2 h	1:2	0,5 h
3	N-acetil-L-cisteína	Etanol	1:4	1 h	1:1	0,5 h
4	N-acetil-D-cisteína	Etanol	1:4	1 h	1:1	0,5 h
5	L-NIBC	Agua	1:4	0,5 h	1:2	0,5 h

6	D-NIBC	Agua	1:4	0,5 h	1:2	0,5 h
7	Otros derivados de cisteína	Disolvente soluble	1:(0,1~100)	0,5 h~24 h	1:(0,1~100)	0,1~24 h
8	CR	Agua	1:4	22 h	2:1	0,5 h
9	RC	Agua	1:4	20 h	2:1	0,5 h
10	HC	Agua	1:3	12 h	1:2	2 h
11	CH	Etanol	1:4	16 h	1:3	3 h
12	GSH	Agua	1:2	12 h	1:1	3 h
13	KCP	Agua	1:3	15 h	1:2	1 h
14	PCR	Agua	1:4	16 h	1:3	2 h
15	GCR	Agua	1:4	16 h	1:3	3 h
16	GSCR	Agua	1:4	16 h	1:3	1,5 h
17	GCSR	Agua	1:3	12 h	1:2	2 h
18	Otros péptidos que contienen cisteína	Disolvente soluble	1:(0,1~100)	0,5 h~24 h	1:(0,1~100)	0,1~24 h
19	1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina	Agua	1:8	2 h	1:7	1 h
20	Mercaptoetanol	Etanol	1:2	2 h	1:1	1 h
21	Ácido tioglicólico	Ácido acético	1:2	2 h	1:1	1 h
22	Tiofenol	Etanol	1:5	5 h	1:1	1 h
23	D-3-trolovol	Agua	1:2	2 h	1:1	1 h
24	N-(2-mercaptopropionil)-glicina	Agua	1:2	2 h	1:1	1 h
25	Dodecilmercaptano	Metanol	1:5	5 h	1:1	1 h
26	Otros compuestos que contienen tiol	Disolvente soluble	1:(0,01~100)	0,5 h~24 h	1:(0,1~100)	0,1~24 h

Las muestras en las realizaciones enumeradas en la tabla 1 se confirman mediante el método anterior. La figura 7-figura 11 son espectros de UV (panel A en la figura 7-figura 11), espectros de infrarrojo (panel B en la figura 7-figura 11), imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) (panel C en la figura 7-figura 11) y distribución del tamaño de partícula (panel D en la figura 7-figura 11) de los AuC modificados con el ligando CR, RC, 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (abreviatura: Cap), GSH y D-NIBC.

Los resultados indican que los diámetros de los AuC modificados con diferentes ligandos obtenidos de la tabla 1 son todos menores de 3 nm. Los espectros ultravioleta también muestran la desaparición del pico a 520 ± 20 nm y la aparición del pico de absorción por encima de 560 nm (560 nm o 570 nm). Sólo la posición de este pico de absorción varía ligeramente con el ligando y el tamaño de partícula. Mientras tanto, el espectro de infrarrojo con transformada de Fourier también muestra la desaparición del pico de absorción de infrarrojo de tiol del ligando (entre las líneas discontinuas en el panel B de la figura 7-figura 11), mientras que se conservan todos los demás picos característicos del infrarrojo, lo que sugiere que todas las moléculas de ligando se han anclado con éxito a la superficie de los AuC, y la presente invención ha obtenido con éxito AuC modificados con los ligandos enumerados en la tabla 1

Realización 3: Experimento cinético de agregación de A β *in vitro*

Como se describió anteriormente, A β desempeña un papel importante en la patogenia del glaucoma y es una diana importante para el tratamiento del glaucoma basándose en el mecanismo de protección del nervio óptico. Esta realización investigó las funciones de los AuC (AuC modificados por ligando) mediante un experimento *in vitro* de cinética de agregación de A β , y comparó los efectos sobre la cinética de agregación de A β con nanopartículas de oro modificadas con el mismo ligando y el uso independiente de moléculas de ligando para demostrar que los AuC podían inhibir por completo la agregación de A β , mientras que las nanopartículas de oro no tenían esta función. Además, la función es de los AuC más que del ligando. El experimento usó el método de marcaje fluorescente con ThT para caracterizar la cinética de la agregación y fibrosis de A β (1-40).

La tioflavina T (abreviatura: ThT) es un tinte específico para teñir fibras de amiloide. Cuando se incubaba junto con monómeros de polipéptidos o proteínas, su fluorescencia no cambia sustancialmente. Cuando se encuentra con polipéptidos o proteínas de amiloide con una estructura de fibra, se acoplará inmediatamente con los polipéptidos o las proteínas de amiloide y su intensidad de fluorescencia aumentará exponencialmente. Sólo debido a esta propiedad, ThT se usa ampliamente como marcador para monitorizar la amiloidosis de péptidos o proteínas. El proceso de fibrosis de $A\beta(1-40)$ también es un proceso de polimerización controlado por nucleación. Por tanto, la curva de crecimiento de la fibra de $A\beta(1-40)$ medida mediante el método de marcaje fluorescente con ThT se divide principalmente en tres etapas: etapa inicial, etapa de crecimiento y etapa de plataforma. La etapa inicial es principalmente una etapa en la que $A\beta(1-40)$ experimenta una transición conformacional para formar un plegamiento erróneo y luego se agrega y nuclea. La etapa de crecimiento es una etapa en la que los monómeros de $A\beta(1-40)$ se acumulan en los núcleos de los oligómeros a lo largo de la dirección axial para formar fibras y crecer rápidamente. La etapa de plataforma es una etapa en la que todas las moléculas de $A\beta(1-40)$ forman fibras largas maduras, es decir, una etapa en la que las fibras ya no crecen. El método de marcaje fluorescente con ThT puede monitorizar convenientemente el proceso cinético de agregación fibrótica de moléculas de $A\beta(1-40)$.

1) Pretratamiento de monómeros de $A\beta(1-40)$

Se disolvió polvo liofilizado de polipéptido de amiloide $A\beta(1-40)$ (Invitrogen Corp.) en hexafluoroisopropanol (HFIP) para obtener una disolución de $A\beta(1-40)$ 1 g/l, y se incubó la disolución a temperatura ambiente durante 2-4 h después de sellar, luego se sopó para secar HFIP (durante aproximadamente 1 h) con nitrógeno de alta pureza (N_2 , 99,9%) a un caudal apropiado en una campana extractora de humos. Por último, se disolvió el $A\beta(1-40)$ secado en 200 μ l de DMSO y, después de sellar, se mantuvo la disolución en una nevera a -20°C durante no más de una semana para uso futuro. Antes de su uso, se diluyó la disolución en DMSO del polipéptido de amiloide con abundante disolución de tampón fosfato (PBS, 10 mM, pH = 7,4) hasta que la concentración de $A\beta(1-40)$ alcanzó 20 μ M para obtener una disolución en PBS de $A\beta(1-40)$. Se prepararon nuevas todas las disoluciones en PBS de $A\beta(1-40)$ para los experimentos.

2) Preparación y detección de muestras

Se añadieron nanopartículas de oro y AuC modificados con ligando a $A\beta(1-40)$ 20 μ M en PBS, respectivamente para formar muestras de AuC modificados con diferentes ligandos a diferentes concentraciones y diferentes tamaños de partícula, y muestras de nanopartículas de oro modificadas con diferentes ligandos de manera correspondiente. Se incubaron las muestras de manera continua en una placa de 96 pocillos a 37°C mediante el método de marcaje fluorescente con ThT y se monitorizó la intensidad de la fluorescencia mediante un lector de microplacas una vez cada 10 minutos. El proceso cinético de agregación de $A\beta(1-40)$ se caracterizó mediante el cambio de la intensidad de fluorescencia de ThT.

Se usaron como grupos experimentales tres tamaños de AuC modificados con L-NIBC con tamaños de partícula de 2,6 nm, 1,8 nm y 1,1 nm, respectivamente, preparados en la realización 2. Como grupos de control se usaron cuatro tamaños de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC con tamaños de partícula de 18,2 nm, 10,1 nm, 6,0 nm y 3,6 nm, respectivamente, y moléculas de L-NIBC no combinadas con AuC o nanopartículas de oro. Todos los tamaños de AuC o nanopartículas de oro estaban en seis concentraciones, respectivamente, que fueron: 0 ppm (sin contener AuC, nanopartículas de oro o L-NIBC, como control de blanco), 0,1 ppm, 1,0 ppm, 5,0 ppm, 10,0 ppm y 20,0 ppm, respectivamente. Se usaron moléculas de L-NIBC en dos concentraciones, que fueron: 1,0 ppm y 10,0 ppm, respectivamente.

Se muestran los resultados en la figura 5 y la figura 6.

La figura 5 muestra las topografías de AFM de $A\beta(1-40)$ después de la incubación conjunta con cada grupo experimental y grupo de control durante 48 h. El panel A es la topografía de AFM después de que se incubó $A\beta(1-40)$ solo durante 48 h. El panel B es una topografía de AFM después de que se incubó $A\beta(1-40)$ conjuntamente con L-NIBC durante 48 h. El panel C y el panel D son topografías de AFM después de que se incubó $A\beta(1-40)$ conjuntamente con nanopartículas de oro con un tamaño de partícula promedio de 6,0 nm y 3,6 nm, respectivamente (modificadas con L-NIBC) durante 48 h. Y el panel E es una topografía de AFM después de que se incubó $A\beta(1-40)$ conjuntamente con AuC de un tamaño de partícula promedio de 1,8 nm (modificados con L-NIBC) durante 48 h.

En la figura 6, se muestra la curva de cinética de amiloidosis de $A\beta(1-40)$ en diferentes concentraciones de L-NIBC en el panel A. Las curvas de cinética de amiloidosis de $A\beta(1-40)$ en diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con tamaños de 18,2 nm, 10,1 nm, 6,0 nm y 3,6 nm, respectivamente, se muestran en los paneles B-E. Las curvas de la cinética de amiloidosis de $A\beta(1-40)$ en diferentes concentraciones de AuC con tamaños de 2,6 nm, 1,8 nm y 1,1 nm, respectivamente se muestran en los paneles F-H. Las curvas de cinética de amiloidosis de $A\beta$ en los paneles A-H son curvas en las que se incubó $A\beta(1-40)$ conjuntamente con nanopartículas de oro o AuC en diferentes concentraciones, $\square$ representaba 0 ppm (es decir, sin nanopartículas de oro y AuC), $\circ$ representaba 0,1 ppm, $\triangle$ representaba 1 ppm,

▽ representaba 5 ppm, ◇ representaba 10 ppm, ☆ representaba 20 ppm.

Puede observarse a partir de la figura 5 que, como control, se llenaron fibras de A β en el panel A; lo mismo que el panel B; aunque las fibras se redujeron en cierta medida, aún podían verse fibras largas en el panel C; aunque no había fibras largas, todavía existían muchas fibras cortas de A β en el panel D. Se indicó que L-NIBC no tenía un efecto evidente sobre la formación de fibras de A β (1-40). La adición de nanopartículas de oro de pequeño tamaño modificadas con L-NIBC podía retrasar el proceso de amiloidosis de A β (1-40), pero no inhibir por completo porque las fibras cortas continuarían creciendo hasta convertirse en fibras largas después de más tiempo. No tiene ni fibras largas ni fibras cortas en el panel E de la figura 5, lo que se sugirió que los AuC modificados con L-NIBC podían inhibir por completo el proceso de amiloidosis de A β (1-40).

La figura 5 es un experimento cualitativo, pero la figura 6 es un experimento cuantitativo. El resultado de la figura 6 indica que la adición de L-NIBC no tuvo un efecto evidente sobre la cinética de amiloidosis de A β (1-40) (panel A de la figura 6); para las nanopartículas de oro, cuando el diámetro de partícula era mayor de o igual a 10,1 nm, la adición de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC avanzó tanto la etapa de crecimiento como la etapa de plataforma de la cinética de agregación de A β (cuando la concentración de nanopartículas de oro era de 20 ppm, la etapa de crecimiento de la cinética de agregación de A β se avanzó a la 12^a h, y la etapa de plataforma se avanzó a la 16^a h), lo que sugiere que las nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC podían acelerar la agregación de A β (paneles B y C de la figura 6); cuando el diámetro de las nanopartículas de oro era menor de o igual a 6,0 nm (paneles D y E de la figura 6), podría retrasarse el tiempo de inicio de la agregación de A β (cuando la concentración de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC era de 20 ppm, la etapa de crecimiento de la cinética de agregación de A β se retrasó a la 54^a h), lo que sugiere que las nanopartículas de oro tenían un efecto inhibitorio sobre la agregación de A β . Sin embargo, la figura 6 indica que aunque la concentración fuese muy alta (20,0 ppm), la adición de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC no pudo inhibir por completo (es decir, no aparecía ninguna etapa de crecimiento y la curva fluorescente era completamente plana). Por otro lado, después de la adición de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC, dado que el pico de emisión de fluorescencia de ThT se ubica en 515 nm, mientras que el pico de absorción de resonancia del plasmón de las nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC se ubica cerca de 520 nm, la disminución de la intensidad fluorescente de ThT observada en este caso debe ser la extinción parcial del efecto de resonancia del plasmón de las nanopartículas de oro a la fluorescencia de ThT, pero no debe atribuirse al efecto inhibitorio de las nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC sobre la agregación de A β (1-40).

Los paneles F-H de la figura 6 indican que todos los AuC modificados con L-NIBC podían inhibir significativamente la agregación de A β (se pospuso el tiempo de inicio de la etapa de crecimiento. Cuando la concentración de AuC modificados con L-NIBC fue de 5 ppm, podía retrasarse el tiempo de inicio de la etapa de crecimiento en la cinética de agregación de A β 20 μ M hasta más de 50 h). Cuando la concentración de AuC modificados con L-NIBC era de 10 ppm o superior, podía inhibirse la agregación de A β por completo (no apareció la etapa de crecimiento y la curva fluorescente era completamente plana). La concentración mínima de AuC modificados con L-NIBC necesaria para la inhibición completa es relevante para el tipo de ligando y el diámetro de los AuC. Las concentraciones mínimas de AuC modificados con L-NIBC con tamaños de 1,1 nm, 1,8 nm y 2,6 nm fueron de 5,0 ppm, 5,0 ppm y 10,0 ppm, respectivamente. Además, como los AuC modificados con L-NIBC no tienen efecto de resonancia del plasmón, no tienen efecto de extinción sobre la fluorescencia de ThT. Por tanto, la disminución de la intensidad de la fluorescencia observada en este caso se debió por completo al efecto inhibitorio de los AuC modificados con L-NIBC sobre la agregación de A β (1-40). Los resultados cuantitativos de la figura 6 tienen una buena concordancia con los resultados cualitativos de la figura 5.

Este experimento indica que: cuando el tamaño de las nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC es menor de o igual a 6,0 nm, tienen cierto efecto inhibitorio sobre la agregación y fibrosis de A β , pero de manera limitada; los AuC modificados con L-NIBC tienen la función de inhibir por completo la agregación y fibrosis de A β . Como las moléculas de L-NIBC *per se* no pueden influir en la agregación y fibrosis de A β (en vista del panel B de la figura 5 y el panel A de la figura 6), esta función es de los AuC, pero no del ligando L-NIBC.

El resultado de este experimento proporcionó un respaldo contundente para la investigación y el desarrollo del uso de AuC para formar medicamentos contra enfermedades relacionadas con la agregación y fibrosis de A β , lo que sentó las bases para la formación de medicamentos para enfermedades relacionadas con la agregación y fibrosis de A β (tales como: glaucoma). Los AuC modificados con L-NIBC pueden clasificarse como sustancias que contienen AuC tal como se define en la presente invención.

Esta realización también valida las funciones de los AuC modificados con otros ligandos enumerados en la tabla 1. Por ejemplo, los paneles A-H de la figura 12 muestran el efecto inhibitorio de los AuC modificados con CR, N-acetil-L-cisteína (L-NAC), GSH, 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (Cap), D-NIBC, RC o L-cisteína y D-cisteína (la dosis es de 10 ppm) sobre la agregación y fibrosis de A β (1-40). Se observó un fenómeno similar para los AuC modificados con diferentes ligandos, y puede llegarse a la misma conclusión: estos ligandos *per se* no pueden influir en la agregación y fibrosis de A β , las nanopartículas de oro modificadas con ligando con un tamaño mayor de 3 nm tienen un efecto inhibitorio limitado sobre la agregación y fibrosis de A β y las nanopartículas de oro más grandes incluso

fomentan la agregación y fibrosis de A β ; pero los AuC modificados con ligando tienen un excelente efecto inhibidor sobre la agregación y fibrosis de A β , y cuando la concentración es mayor de 5-10 ppm, puede lograrse el efecto de inhibición completa, mientras que la concentración mínima necesaria para la inhibición completa varía ligeramente con el ligando y el tamaño de partícula de los AuC. Asimismo, estos AuC modificados con ligando se clasifican en sustancias que contienen AuC definidas en la presente invención.

Dado que los AuC no pueden existir de manera estable en una disolución sin ligandos, se modifican los AuC con ligandos en este experimento. Pero los resultados experimentales han indicado que los AuC *per se* influyen en la agregación y fibrosis de A β como componentes funcionales. Por tanto, otros cambios realizados basándose en las funciones anteriores de los AuC aportadas en la presente invención, tales como ausencia de ligandos, cambio de ligandos, ligandos activos o inactivos y uso combinado de AuC y otros vectores o medicamentos, se realizan todos basándose en la presente invención.

Realización 4: experimento de modelo de lesión por estrés oxidativo de células RGC-5 inducido por H₂O₂

Se usó la viabilidad celular como índice en el experimento de esta realización. El resultado de prueba del método CCK-8 reflejó los efectos de los AuC modificados con ligando en la citotoxicidad inducida por H₂O₂, y mostró que los AuC modificados con ligando tenían un efecto neuroprotector sobre el mecanismo de lesión por estrés oxidativo de las células ganglionares.

Experimento 1:

Se diluyeron células RGC-5 en fase de crecimiento logarítmico con medio completo (MEM + FBS al 10% + penicilina-estreptomicina al 1%) para obtener una suspensión celular en una densidad de 5x10⁴/ml. Se inoculó la suspensión a 100 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivó en un incubador con el 5% de CO₂ a 37°C. Uno de los modos de administración en un grupo experimental es: se retiró el medio de cultivo original cuando se adhirieron las células a los pocillos y se añadieron 50 μ l de disoluciones de sustancias de prueba (las sustancias de prueba fueron: tres clases de AuC modificados con L-NIBC de tamaños de partícula de 2,6 nm, 1,8 nm o 1,1 nm, o cuatro clases de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC de tamaños de partícula de 18,2 nm, 10,1 nm, 6,0 nm o 3,6 nm, o moléculas de L-NIBC no unidas con AuC o nanopartículas de oro como referencia) en diferentes concentraciones preparadas mediante medio de mantenimiento (medio DMEM + FBS al 2% + penicilina-estreptomicina al 1%) a diferentes pocillos para hacer que la concentración final fuese de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 ppm, respectivamente, luego se añadieron 50 μ l de H₂O₂ (la concentración final fue de 100 μ M) al grupo de administración y al grupo del modelo después de pretratamiento durante 2 horas. Se incubaron las células durante 24 h, luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto protector previo de los AuC sobre la lesión por H₂O₂. Los otros modos de administración en un grupo experimental son: se retiró el medio de cultivo original cuando se adhirieron las células a los pocillos, se añadieron 50 μ l de disolución de H₂O₂ preparada mediante medio de mantenimiento a diferentes pocillos (la concentración final fue de 100 μ M) y se incubó durante 4 h, 8 h, 12 h y 24 h, respectivamente, y luego se añadieron 50 μ l de disolución de sustancia de prueba preparada mediante medio de mantenimiento a diferentes concentraciones a cada grupo de pocillos en diferentes tiempos de incubación para hacer que la concentración final fuese de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 ppm, luego se incubó durante 24 h, respectivamente. Luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto curativo de los AuC sobre las lesión por H₂O₂. En el experimento anterior, se establecieron un grupo de control de blanco sin células, un grupo de control sin tratar las células y un grupo de control de lesión con células tratadas con H₂O₂ 100 μ M.

Los resultados mostraron que los AuC modificados con ligando proporcionados en la presente invención podían aumentar significativamente la viabilidad celular de células con lesión por H₂O₂ en el modelo de células RGC, lo que indicó que podían resistir la apoptosis de RGC desencadenada por estrés oxidativo. En comparación, las nanopartículas de oro modificadas con el mismo ligando pero de mayor tamaño no tuvieron un efecto bueno u evidente sobre la apoptosis de RGC desencadenada por estrés oxidativo, y L-NIBC no tuvo un efecto evidente sobre la apoptosis de RGC desencadenada por estrés oxidativo. Los AuC modificados con diferentes ligandos tuvieron un efecto similar, mientras que los ligandos correspondientes *per se* no tuvieron un efecto evidente, lo que indicó que este efecto se originó a partir de los AuC, más que del ligando.

Experimento 2:

Se diluyeron células RGC-5 en fase de crecimiento logarítmico con medio completo (MEM + FBS al 10% + penicilina-estreptomicina al 1%) para obtener una suspensión celular en una densidad de 5x10⁴/ml. Se inoculó la suspensión a 100 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivó en un incubador con el 5% de CO₂ a 37°C. Se retiró el medio de cultivo original cuando se adhirieron las células a los pocillos, y se añadieron 50 μ l de disoluciones de AuC o nanopartículas de oro a diferentes concentraciones preparadas mediante medio de mantenimiento (medio DMEM + FBS al 2% + penicilina-estreptomicina al 1%) a diferentes pocillos para hacer la concentración final fuese de 0,1, 1 y 10 ppm, respectivamente, luego se añadieron 50 μ l de H₂O₂ (la concentración final fue de 105 μ M) al grupo de

administración y al grupo del modelo después de pretratamiento durante 2 horas. Se incubaron las células durante 24 h, luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto protector previo de los AuC sobre la lesión por H₂O₂. En el experimento anterior, un grupo de control de blanco sin ningún tratamiento, un grupo de control del modelo de células tratadas con 105 µM de H₂O₂, se establecieron al mismo tiempo un grupo de control de AuC de células a las que se les añadieron 100 ppm de AuC pero sin H₂O₂, y un grupo de control de ligando de células a las que se les añadieron 10 ppm de ligando y 105 µM de H₂O₂ pero sin AuC o nanopartículas de oro.

Los resultados experimentales de nanopartículas de oro o AuC modificados con L-NIBC, por ejemplo, se muestran en la figura 13. Los resultados indicaron que después de cultivo durante 24 horas, la viabilidad celular del grupo de control de AuC al que se le añadieron 100 ppm de AuC, pero no se trató con H₂O₂ aumentó hasta el $111,5 \pm 6,2\%$ en relación con el grupo de control de blanco (establecido para ser el 100%) ($P < 0,05$), lo que sugirió que los AuC no eran tóxicos. La viabilidad celular del grupo de control del modelo al que se le añadió H₂O₂ 100 µM pero sin AuC o nanopartículas de oro disminuyó hasta el $43,0 \pm 7,8\%$ (en relación con el grupo de control de blanco, $P < 0,005$), y la viabilidad celular del grupo de control de ligando al que se le añadieron 10 ppm de L-NIBC y H₂O₂ 100 µM, pero sin AuC o nanopartículas de oro fue del $47,5 \pm 6,6\%$ (en relación con el grupo de control de blanco, $P < 0,01$; y el grupo de control del modelo, $P > 0,05$), lo que sugirió que el ligando solo no aumentó la viabilidad celular del modelo de células con lesión por H₂O₂. Mientras que la viabilidad celular del grupo de administración al que se le añadieron 0,1 ppm, 1 ppm y 10 ppm de los AuC aumentó hasta el $69,8 \pm 9,5\%$ (en relación con el grupo de control del modelo, $P < 0,05$), el $83,3 \pm 6,1\%$ (en relación con el grupo de control del modelo, $P < 0,01$) y el $86,8 \pm 7,4\%$ (en relación con el grupo de control del modelo, $P < 0,01$), respectivamente. Por otro lado, las nanopartículas de oro del ligando correspondiente de un tamaño promedio de 6,0 nm a tres concentraciones experimentales no tenían diferencias evidentes con respecto al grupo de control del modelo en términos de viabilidad celular ($P > 0,05$).

Los resultados anteriores indicaron que los AuC modificados con ligando proporcionados en la presente invención podían aumentar significativamente la viabilidad celular en el modelo de células RGC con lesión por H₂O₂, lo que sugirió que podían resistir la apoptosis de RGC desencadenada por estrés oxidativo, mientras que L-NIBC no tuvo un efecto evidente contra la apoptosis de RGC desencadenada por estrés oxidativo, y este efecto fue de los AuC más que del ligando. Las nanopartículas de oro modificadas con el mismo ligando pero de mayor tamaño no tenían un efecto evidente contra la apoptosis de RGC desencadenada por estrés oxidativo, lo que sugirió que las nanopartículas de oro no podían usarse como fármacos para prevenir y tratar el glaucoma.

Las nanopartículas de oro o los AuC se modificaron con diferentes ligandos enumerados en la tabla 1, se adoptaron las mismas etapas para llevar a cabo el experimento. Los efectos fueron similares, de modo que no se describirán con detalle en el presente documento.

Realización 5: Experimento del modelo de excitotoxicidad de células RGC-5 inducida por ácido N-metil-D-asparágico (NMDA)

Esta realización usó la tasa de supervivencia celular como índice. El resultado de la prueba del método de cck-8 reflejó el efecto de AuC modificados con ligando contra la citotoxicidad inducida por NMDA para mostrar que los AuC tenían un efecto neuroprotector sobre el mecanismo de lesión excitotóxica por neurotransmisores.

Se diluyeron células RGC-5 en fase de crecimiento logarítmico con medio completo para obtener una suspensión celular en una densidad de 5×10^4 /ml. Se inoculó la suspensión a 100 µl por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivó en un incubador con el 5% de CO₂ a 37°C. Uno de los modos de administración en un grupo experimental es: se retiró el medio de cultivo original cuando se adhirieron las células a los pocillos y se añadieron 50 µl de disoluciones de sustancias de prueba (las sustancias de prueba fueron: tres clases de AuC modificados con L-NIBC de tamaños de partícula de 2,6 nm, 1,8 nm o 1,1 nm, o cuatro clases de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC de tamaños de partícula de 18,2 nm, 10,1 nm, 6,0 nm o 3,6 nm, o moléculas de L-NIBC no unidas con AuC o nanopartículas de oro como referencia) en diferentes concentraciones preparadas mediante medio de mantenimiento a diferentes pocillos para hacer que la concentración final fuese de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 ppm, respectivamente, luego se añadieron 50 µl de NMDA (la concentración final fue 250 µM) al grupo de administración y grupo del modelo después de pretratamiento durante 2 horas. Se incubaron las células durante 24 h, luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto protector previo de los AuC sobre la lesión por NMDA. Los otros modos de administración en un grupo experimental son: se retiró el medio de cultivo original cuando las células unidas a los pocillos, se añadieron 50 µl de disolución de NMDA preparada mediante medio de mantenimiento (la concentración final fue de 250 µM), y se incubó durante 4 h, 8 h, 12 h y 24 h, respectivamente, y luego se añadieron 50 µl de disolución de sustancia de prueba preparada mediante medio de mantenimiento a diferentes concentraciones para hacer que la concentración final fuese de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 ppm, luego se incubó durante 24 h, respectivamente. Luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto curativo de los AuC sobre la lesión por NMDA. En el experimento anterior, se establecieron un grupo de control de blanco sin células, un grupo de control sin tratar las células y un grupo de control de lesión con células tratadas con NMDA 250 µM.

Los resultados mostraron que los AuC modificados con ligando proporcionados en la presente invención podían aumentar significativamente la viabilidad celular de la lesión excitotóxica inducida por NMDA en el modelo de células RGC, lo que indicó que podían inhibir la apoptosis de RGC excitadora mediada por neurotransmisores. En comparación, las nanopartículas de oro modificadas con el mismo ligando pero de mayor tamaño no tuvieron un efecto bueno u evidente sobre la apoptosis de RGC excitadora mediada por neurotransmisores, y L-NIBC no tuvo un efecto evidente sobre la apoptosis de RGC excitadora mediada por neurotransmisores. Los AuC modificados con diferentes ligandos tuvieron un efecto similar, mientras que los ligandos correspondientes *per se* no tuvieron un efecto evidente, lo que indicó que este efecto se originó a partir de los AuC, más que del ligando.

Realización 6: Experimento del modelo de apoptosis de RGC-5 inducida por nitroprusiato de sodio (SNP)

Se usó la viabilidad celular como índice en el experimento de esta realización. El resultado de prueba del método de CCK-8 reflejó los efectos de los AuC modificados con ligando sobre la citotoxicidad inducida por SNP y mostró que los AuC modificados con ligando tenían un efecto neuroprotector sobre la apoptosis de RGC-5 inducida por SNP.

Experimento 1:

Se diluyeron células RGC-5 en fase de crecimiento logarítmico con medio completo para obtener una suspensión celular en una densidad de $5 \times 10^4/\text{ml}$. Se inoculó la suspensión a 100 μl por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivó en un incubador con el 5% de CO_2 a 37°C . Uno de los modos de administración en un grupo experimental es: se retiró el medio de cultivo original cuando se adhirieron las células a los pocillos y se añadieron 50 μl de disoluciones de sustancias de prueba (las sustancias de prueba fueron: tres clases de AuC modificados con L-NIBC de tamaños de partícula de 2,6 nm, 1,8 nm o 1,1 nm, o cuatro clases de nanopartículas de oro modificadas con L-NIBC de tamaños de partícula de 18,2 nm, 10,1 nm, 6,0 nm o 3,6 nm, o moléculas de L-NIBC no unidas con AuC o nanopartículas de oro como referencia) en diferentes concentraciones preparadas mediante medio de mantenimiento para hacer que la concentración final fuese de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 ppm, respectivamente, luego se añadieron 50 μl de disolución de SNP (la concentración final fue de 750 μM) preparada mediante medio de mantenimiento al grupo de administración y grupo del modelo después de pretratamiento durante 2 horas. Se incubaron las células durante 24 h, luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto protector previo de los AuC sobre la lesión por SNP. Los otros modos de administración en un grupo experimental son: se retiró el medio de cultivo original cuando se adhirieron las células a los pocillos, se añadieron 50 μl de disolución de SNP preparada mediante medio de mantenimiento (la concentración final fue de 750 μM), y se incubó durante 4 h, 8 h, 12 h y 24 h, respectivamente, y luego se añadieron 50 μl de disolución de sustancia de prueba preparada mediante medio de mantenimiento a diferentes concentraciones para hacer que la concentración final fuese de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 ppm, luego se incubó durante 24 h, respectivamente. Luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto curativo de los AuC sobre la lesión por SNP. En el experimento anterior, se establecieron un grupo de control de blanco sin células, un grupo de control sin tratar las células y un grupo de control de lesión con células tratadas con SNP 250 μM .

Los resultados mostraron que los AuC modificados con ligando proporcionados en la presente invención podían aumentar significativamente la viabilidad celular de células con lesión por SNP en el modelo de células RGC, lo que indicó que tenían un efecto protector sobre la apoptosis de RGC inducida por isquemia e hipoxia cerebral. En comparación, las nanopartículas de oro modificadas con el mismo ligando pero de mayor tamaño no tuvieron un efecto protector bueno u evidente sobre la apoptosis de RGC inducida por isquemia e hipoxia cerebral, y L-NIBC no tuvo un efecto protector evidente sobre la apoptosis de RGC inducida por isquemia e hipoxia cerebral. Los AuC modificados con diferentes ligandos tuvieron un efecto similar, mientras que los ligandos correspondientes *per se* no tuvieron un efecto evidente, lo que indicó que este efecto se originó a partir de los AuC, más que del ligando.

Experimento 2:

Se diluyeron células RGC-5 en fase de crecimiento logarítmico con medio completo para obtener una suspensión celular en una densidad de $5 \times 10^4/\text{ml}$. Se inoculó la suspensión a 100 μl por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivó en un incubador con el 5% de CO_2 a 37°C . Uno de los modos de administración en un grupo experimental es: se retiró el medio de cultivo original cuando se adhirieron las células a los pocillos, y se añadieron 50 μl de disoluciones de AuC o nanopartículas de oro a diferentes concentraciones preparadas mediante medio de mantenimiento para hacer que la concentración final fuese de 0,1, 1 y 10 ppm, respectivamente, luego se añadieron 50 μl de disolución de SNP (la concentración final fue de 700 μM) preparada mediante medio de mantenimiento al grupo de administración y al grupo del modelo después de pretratamiento durante 2 horas. Se incubaron las células durante 24 h, luego se añadió CCK-8 al 10% a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Se midió el valor de absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm para evaluar el efecto protector previo de los AuC sobre la lesión por SNP. En el experimento anterior, un grupo de control de blanco sin ningún tratamiento, un grupo de control del modelo de células tratadas con SNP 700 μM , se establecieron al mismo tiempo un grupo de células de control de AuC a las que se les añadieron 100 ppm de AuC pero sin SNP, y un grupo de células de control de ligando a las que se les añadieron

10 ppm de ligando y 700 μ M de SNP pero sin AuC o nanopartículas de oro.

Los resultados experimentales de nanopartículas de oro o AuC modificados con L-NIBC, por ejemplo, se muestran en la figura 14. Los resultados indicaron que después de cultivo durante 24 horas, la viabilidad celular del grupo de control de AuC al que se les añadieron 100 ppm de AuC, pero no tratado con SNP, aumentó hasta el $115,4 \pm 4,8\%$ en relación con el grupo de control de blanco (establecido para que sea el 100%). ($P < 0,05$), lo que sugirió que los AuC no eran tóxicos. La viabilidad celular del grupo de control del modelo disminuyó hasta el $56,7 \pm 6,0\%$ (en relación con el grupo de control de blanco, $P < 0,001$), y la viabilidad celular del grupo de control de ligando fue del $52,8 \pm 8,0\%$ (en relación con el grupo de control de blanco, $P < 0,01$; y el grupo de control del modelo, $P > 0,05$), lo que sugirió que el ligando solo no aumentaba la viabilidad celular en el modelo de células con lesión por SNP. Mientras que la viabilidad celular del grupo de administración al que se le añadieron 0,1 ppm, 1 ppm y 10 ppm de los AuC aumentó hasta el $89,0 \pm 7,2\%$ (en relación con el grupo de control del modelo, $P < 0,01$), el $92,5 \pm 7,7\%$ (en relación con el grupo de control del modelo, $P < 0,01$) y el $83,5 \pm 5,2\%$ (en relación con el grupo de control del modelo, $P < 0,01$), respectivamente. Por otro lado, las nanopartículas de oro del ligando correspondiente de un tamaño promedio de 6,0 nm a tres concentraciones experimentales no tenían diferencias evidentes con respecto al grupo de control del modelo en términos de viabilidad celular ($P > 0,05$).

Los resultados anteriores indicaron que los AuC modificados con ligando proporcionados en la presente invención podían aumentar significativamente la viabilidad celular en el modelo de células RGC con lesión por SNP, lo que sugirió que podían resistir la apoptosis de RGC inducida por SNP, mientras que L-NIBC no tenía un efecto evidente contra la apoptosis de RGC inducida por SNP, y este efecto fue de AuC más que del ligando. Las nanopartículas de oro modificadas con el mismo ligando pero de mayor tamaño no tuvieron un efecto evidente contra la apoptosis de RGC inducida por SNP, lo que sugirió que las nanopartículas de oro no podían usarse como fármacos para prevenir y tratar el glaucoma.

Las nanopartículas de oro o los AuC se modificaron con diferentes ligandos enumerados en la tabla 1, se adoptaron las mismas etapas para llevar a cabo el experimento. Los efectos fueron similares, de modo que no se describirán con detalle en el presente documento.

Realización 7: Experimento del modelo de rata con lesión por aplastamiento del nervio óptico

El modelo de rata con lesión por aplastamiento del nervio óptico es un modelo animal ampliamente usado para el glaucoma sin presión intraocular elevada. El modelo es un modelo de lesión incompleto que se prepara pinzando el nervio óptico de la rata con pinzas inversas a una presión constante. Mantiene la integridad del epineuro del nervio óptico, es fácil de operar, tiene buena reproducibilidad y se acerca a las características clínicas del glaucoma. Es un modelo animal maduro para la investigación del daño del nervio óptico y la función de la retina relacionados con el glaucoma. En particular, este modelo se usa ampliamente en el proceso patológico de muerte de RGC y en la investigación de fármacos para inhibir o ralentizar el daño del nervio óptico y la apoptosis de RGC.

Experimento 1:

1) Preparación del modelo de lesión por pinzamiento del nervio óptico de rata

Se anestesiaron 108 ratas Brown Norway macho adultas SPF, después de una semana de alimentación adaptativa, con hidrato de cloral al 5% mediante inyección intraperitoneal. Se desinfectó de manera rutinaria la piel alrededor del ojo derecho de las ratas. Bajo el microscopio quirúrgico binocular, se abrieron mediante incisión el canto lateral y la conjuntiva, se forzó la apertura de la glándula de Hada y el tejido de la glándula lagrimal y se separaron a lo largo de la pared escleral hasta el músculo recto externo. Se separó y dejó expuesto el nervio óptico. Se pinzó el nervio óptico con un pinzamiento vascular no invasivo a 1 mm de manera posterior con respecto al globo ocular durante 10 s para provocar una lesión del nervio óptico. Deben evitarse los vasos sanguíneos durante el proceso de pinzamiento. Una vez finalizado el pinzamiento, se suturó el extremo roto del músculo recto externo y las capas de tejido para restaurar el saco conjuntival. Tras la operación se observó el estado de los vasos del fondo de ojo de la retina, se aplicaron colirios de tobradex y se suturó el párpado. El primer día después de la operación, se observó si el modelo de pinzamiento del nervio óptico de rata se había preparado con éxito. Se consideró un modelo exitoso si no se observaron complicaciones (tales como isquemia retiniana y hemorragia vítrea prerretiniana). Los modelos fallidos se eliminarán del experimento. Los ojos izquierdos de todas las ratas no se trataron como control.

2) Experimento con animales: se dividieron 108 ratas del modelo de lesión por pinzamiento del nervio óptico en tres grupos al azar según el tiempo de dosificación, a saber: grupos de muestreo del día 7, el día 14 y el día 21, $n = 36$ ratas/grupo. Se dividió cada grupo adicionalmente al azar en 3 subgrupos, incluyendo el grupo de dosis alta (concentración de AuC: 5 g/l), el grupo de dosis baja (concentración de AuC: 1 g/l) y el grupo de control (solución salina normal), $n = 12$ ratas/grupo. Desde el día de la preparación del modelo, se añadieron gota a gota 20 μ l/ojo de la disolución del compuesto de prueba al ojo derecho de las ratas del grupo de dosis alta y del grupo de dosis baja. Desde el día en que el modelo se preparó con éxito, se añadieron gota a gota 10 μ l/ojo de solución salina normal al ojo derecho de las ratas del grupo de control. Se añadieron gota a gota 10 μ l/ojo de solución salina normal a los ojos

izquierdos de las ratas (incluyendo el grupo de control, el grupo de dosis alta y el grupo de dosis baja) como control. La frecuencia y el tiempo de adición gota a gota fueron 3 veces/día (7,00 a. m., 3,00 p. m. y 11,00 p. m.), durante 7 días, 14 días y 21 días, respectivamente.

5 3) Indicadores de detección y métodos de detección

Fotografías del fondo de ojo: se tomaron fotografías del fondo de ojo de cada rata 7/14/21 días antes y después de la administración. Después de la anestesia general de las ratas con hidrato de cloral al 5% mediante inyección intraperitoneal, se cortaron los bigotes de las ratas, se realizó midriasis a las ratas con colirios de topiramina compuestos, se ajustó la dirección de la lente con los ojos de rata expuestos hasta que los vasos sanguíneos de la retina diana fueran claramente visibles en la pantalla, y finalmente se tomaron fotografías en color del fondo de ojo. Nota: En todo el proceso, se humedeció la córnea con colirios de hipromelosa.

Detección de PEV (potencial evocado visual): se detectó el PEV de los dos ojos de cada rata 7/14/21 días antes y después de la administración en referencia a la norma internacional de electrofisiología clínica de la visión. Después de la anestesia de los animales con hidrato de cloral al 5% mediante inyección intraperitoneal, se realizó midriasis a las ratas mediante colirios de topiramina compuestos. Para reducir la resistencia a la interferencia, se eliminó el pelo de la superficie corporal correspondiente a la fontanela anterior y la corteza visual de las ratas. Se mantuvieron las ratas en una sala oscura y se adaptaron al entorno durante 30 min. Se adoptó un estimulador de destellos de campo completo (frecuencia del estímulo de 1,0 Hz; ancho de banda de frecuencia de 0,1 ~ 75Hz). El tiempo de análisis fue de 250 ms, la frecuencia de muestreo fue de 2,7 Hz y se solapó 100 veces; se realizó la medición al menos 3 veces seguidas. El electrodo de registro en la piel fue de cloruro de plata en forma de disco de 7 mm, el electrodo de trabajo se colocó en la superficie de la córnea, se colocó el electrodo de referencia en la entropierna ipsilateral y el electrodo de tierra se colocó en el tejido subcutáneo de la cola. Cuando se revisó un ojo, el otro ojo estaba cubierto por completo con una máscara de ojos negra opaca. Se adoptó el método de calibración de ondas ab en la descripción del PEV. Para excluir otras interferencias de variación de la latencia y amplitud, se usaron como indicadores de observación L5b y amplitud A5 según la práctica clínica. Cada vez se observaron y registraron 3 formas de onda estables, y se usaron los valores promedio de L5b y A5 como valores de observación.

Tinción convencional con hematoxilina y eosina (tinción HE): se seleccionaron 6 ratas al azar de cada grupo y se extirparon por completo los globos oculares y los nervios ópticos orbitarios después de la anestesia con hidrato de cloral al 5% mediante inyección intraperitoneal. Se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se extirparon la córnea, el cristalino y el cuerpo vítreo bajo un microscopio quirúrgico. Se sumergieron la copa ocular y el nervio óptico en tampón de paraformaldehído al 4% para fijarlos durante 24 h. Se extrajo el tejido, se enjuagó con PBS tres veces y se deshidrató con etanol en gradiente (etanol al 50% durante 90 min, etanol al 70% durante 90 min, etanol al 85% durante 90 min, etanol al 95% durante 60 min, etanol al 100% durante 60 min). Se empapó en una mezcla 1:1 de xileno y etanol durante 1 h, y luego se empapó en xileno puro durante 1 h. Inmersión en parafina, incrustación y corte en secciones: se sumergió el tejido hialinizado en una mezcla 1:1 de parafina y xileno durante 90 min, luego se colocó en parafina durante 120 min y se enfrió de una vez. Luego, se cortaron las muestras de copa ocular a 5 µm en rodajas de una vez y se calentaron en estufa a 60°C para uso futuro. Se sumergieron los portaobjetos en xileno durante 5 min y se repitió la operación 3 veces. Se sumergieron los portaobjetos en etanol en gradiente por turnos (al 100%, al 90% y al 70%) cada uno durante 5 min, y finalmente se lavaron las secciones con agua del grifo durante 5 min. Se tiñeron los portaobjetos con tinción de hematoxilina durante 5 min. Se retiró por lavado con agua la tinción en exceso en los portaobjetos antes de la separación de 10 s del color con una disolución etanólica de HCl al 75%, y se lavaron los portaobjetos con agua del grifo hasta que se detectaron claramente el micronúcleo y la cromatina nuclear al microscopio. Se tiñó con disolución de eosina al 0,5% durante 5 min y se deshidrató con etanol al 70%, al 85%, al 95% y al 100% por turnos durante 2 min. Se hialinizó con xileno dos veces durante 1 min cada vez. Se limpió el xileno en exceso alrededor de las secciones (se observó que no deben estar secas), se añadió gota a gota rápidamente una cantidad adecuada de goma neutra, se cubrieron los portaobjetos antes de que se observaran cambios de morfología de la retina y de RGC con un microscopio óptico y fotografías de muestra.

Parche retiniano completo, tinción por inmunofluorescencia de Brn3a y análisis de imágenes por ordenador de las RGC: se seleccionaron 6 ratas al azar de cada grupo, se extirparon por completo sus globos oculares después de la anestesia con hidrato de cloral al 5% mediante inyección intraperitoneal y se enjuagaron con PBS. Se sumergieron los globos oculares en tampón de paraformaldehído al 4% para fijarlos a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se extirparon la córnea, el iris y el cristalino bajo un microscopio quirúrgico, y volvió a sumergirse el tejido restante de la copa ocular en tampón de paraformaldehído al 4% para fijarlos a temperatura ambiente durante 30 min. Se cortaron 4 incisiones radiales en la esclerótica para aplanar la retina. La retina se despegó suavemente, se enjuagó con PBS una vez; luego se colocó el cuerpo vítreo hacia arriba, y se retiró el vidrio residual cuidadosamente con la punta de un cepillo, y se preparó el parche retiniano y se secó a 4°C durante la noche. Se enjuagó el parche retiniano con PBS durante 5 min para un total de 3 veces, y se bloqueó toda la retina con Triton-X100 al 0,5% (preparado con PBS). Se confinó la disolución de bloqueo a temperatura ambiente durante 15 min. Se enjuagó la disolución de bloqueo en exceso con PBS durante 5 min para un total de 3 veces, y luego se incubó con diluyente que contenía anticuerpo primario Brn3a (se disolvieron albúmina de suero bovino al 2% y Triton-X100 al 2% en PBS. El factor de dilución del anticuerpo era de 1:100) a 4°C durante la noche. Se enjuagó con PBS durante 5 min para un total de 3 veces. Se añadió el anticuerpo secundario preparado con diluyente (anticuerpo secundario anti-cabra de asno marcado con Cy3,

factor de dilución 1:200) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, se enjuagó con PBS durante 10 min para un total de 3 veces, se bloqueó, luego se colocó bajo un microscopio de fluorescencia, y se observó y fotografió. Se usaron la cámara y el software Adobe Photoshop para recopilar imágenes del parche retiniano de prueba con papilas ópticas como el centro. Se usó el software de análisis de imágenes Scion (Scion Corp., Frederick, MD) para contar el número total de células retinianas positivas para Brn3a en el campo visual (7.200 micrómetros cuadrados, aumento de 40X). Se contaron las RGC de 4-6 regiones diferentes con una distancia igual de las papilas ópticas bajo el microscopio. Se calculó el valor promedio para representar el parámetro de comparación del recuento de células marcadas en la retina. Se adoptó el software estadístico SPSS 21.0 (Chicago, IL) para realizar el análisis estadístico de los datos. Se expresaron los datos experimentales con la media $\pm$ desviación estándar del experimento (media $\pm$ EEM). Se analizaron los datos mediante la varianza y el análisis estadístico entre grupos se inspeccionó Anova de un factor. $P < 0,05$ significó que la diferencia era estadísticamente significativa.

Los resultados mostraron que los AuC modificados con ligando proporcionados en la presente invención podían reducir el defecto del campo visual del ojo derecho de las ratas del modelo en el grupo de administración, reducir la apoptosis de las RGC, mejorar la estructura y disposición de las células retinianas y desempeñar un papel importante en el alivio de la disfunción del ojo derecho de las ratas del modelo, lo que indicó que los AuC podían usarse para preparar fármacos para prevenir y tratar el glaucoma.

Experimento 2:

1) Preparación del modelo de rata con lesión por aplastamiento del nervio óptico

Se anestesiaron ratas Sprague Dawley (SD) macho adultas SPF, después de la adaptación durante una semana, con ketamina (50 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. Se desinfectaron el pelo y la piel alrededor de los ojos de las ratas con una disolución de povidona yodada con un factor de dilución 1:10 y se lavó el saco conjuntival con solución salina normal. Se cortó mediante incisión la conjuntiva desde la ubicación a unos 2 mm por encima del canto lateral para evitar la expansión de los vasos, y se realizó una disección roma hacia atrás a lo largo de la dirección del músculo recto externo, y se levantó la conjuntiva bulbar y se empujó ligeramente el globo ocular hacia adelante para exponer el nervio óptico. Entonces, se usaron pinzas hemostáticas para pinzar el nervio óptico unos 2 mm detrás del globo ocular durante 30 s, se devolvió el globo ocular cuidadosamente al lugar original y se aplicó gel antibiótico oftálmico al saco conjuntival operatorio. Volvieron a ponerse los animales en la jaula y se observaron hasta que se recuperaron. El analgésico se administró 1-3 días después de que se preparó el modelo. Después de la operación, se observó si el modelo de rata con aplastamiento del nervio óptico se había preparado con éxito. Se consideró un modelo exitoso si no se observaron complicaciones (tales como isquemia retiniana y hemorragia vítrea prerretiniana). Los modelos fallidos se eliminarán del experimento. Los ojos izquierdos de todas las ratas no se trataron como control.

2) Experimento con animales: se adoptó el método aleatorio generado por ordenador para dividir 60 ratas SD adultas SPF en 5 grupos ($n = 12$ ratas/grupo). Uno de los grupos de animales no se trató en absoluto como grupo de control normal. Se usaron los ojos derechos de otros grupos de animales para preparar un modelo de aplastamiento del nervio óptico de rata mediante el método de pinzamiento. Fueron el grupo de control negativo, el grupo de dosis baja, el grupo de dosis media y el grupo de dosis alta. El día de preparación del modelo se registró como el primer día. Se añadieron gota a gota AuC modificados con L-NIBC 0,1 g/l, 0,2 g/l o 0,5 g/l en solución salina normal en el ojo derecho de las ratas en los grupos de dosis baja, dosis media y dosis alta, respectivamente, tres veces al día con 10 μ l/ojo desde el día de la preparación del modelo (el intervalo de dosificación fue de $5 \pm 0,5$ h). Se añadió gota a gota solución salina normal al ojo derecho de las ratas en el grupo de control 3 veces al día con 10 μ l/ojo desde el día de la preparación del modelo como control. Se midieron los PEVd (potenciales evocados visuales de destellos) de las ratas de cada grupo el día 7 y el día 14, respectivamente. El día 15, se sacrificaron todos los animales. Se les extrajo el ojo derecho y se trataron adecuadamente, y se les realizó tinción con HE y tinción con inmunofluorescencia ($n = 6$ /grupo).

3) Indicadores de detección y métodos de detección

Potenciales evocados visuales de destellos (PEVd): se adoptaron los sistemas de diagnóstico electrofisiológico de Roland Consult (RETIport VEP-ERG-AEP versión 6.16.3.4, Alemania) para realizar la verificación de PEVd de todos los animales antes del experimento, y luego se llevó a cabo la verificación de PEVd del ojo derecho de los animales en cada grupo el día 7 y el día 14. Etapas principales: antes del examen, se permitió que los animales se adaptaran a la oscuridad durante al menos 12 h. Se realizó midriasis a los animales con tropicamida al 1,0% y se anestesiaron los animales con ketamina (50 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. Se colocaron los animales en la plataforma elevadora en un estado postrado, se insertó el electrodo de conexión a tierra en el tejido subcutáneo en la raíz de la cola de la rata, se colocó el electrodo de referencia en la boca de la rata y se insertó el electrodo de prueba en el tejido subcutáneo de la tuberosidad occipital de la rata. Se comprobó la resistencia de cada electrodo. La recopilación de señales electrofisiológicas comenzó (frecuencia del estímulo de 1,3 Hz; banda de frecuencia de 7,3 Hz) después de que se cumplieron los requisitos, la forma de onda de PEVd se describió mediante el método de calibración de ondas NP, se eligió el valor promedio de N2 y P2 como valor de observación y se recogió repetidamente la forma de onda estable de cada animal para 3 veces. Se adoptó el software estadístico SPSS 21.0 (Chicago, IL)

para realizar un análisis estadístico de los datos. Se expresaron los datos experimentales con la media $\pm$ desviación estándar (media $\pm$ EEM). Se analizaron los datos mediante la varianza y se inspeccionó el análisis estadístico entre grupos mediante la prueba Anova de un factor. $P < 0,05$ significó que la diferencia fue estadísticamente significativa.

5 Parche de retina completo y tinción por inmunofluorescencia de Brn3a: se seleccionaron 6 ratas al azar de cada grupo; se extirparon los globos oculares derechos después del sacrificio, se perforaron algunos orificios en la unión corneoescleral con una aguja, se mantuvieron en paraformaldehído al 4% durante aproximadamente 20 min, luego se extirparon los globos oculares y se extirparon la córnea y el cristalino. La retina se despegó con cuidado sobre una superficie de hielo, se cortó en forma de cuatro hojas y volvió a colocarse en paraformaldehído al 4% para fijarla
10 durante 5 min. Se enjuagó la retina con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 mol/l durante 6 min. Se añadió disolución de bloqueo (reactivo de bloqueo UltraCruz®, n.º de producto: SC-516214, n.º de lote: C1317, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y se agitó en un agitador a temperatura ambiente durante 2 h, luego se aspiró. Se añadió anticuerpo Brn-3a (14A6) (n.º de producto: SC-8429, n.º de lote B1216, Santa Cruz Biotechnology, Inc., usado después de diluir con diluyentes a 1:50; diluyente: se añadieron 2,5 ml de disolución de bloqueo y 0,15 ml de TritonX-100 a
15 47,35 ml de PBS y se mezclaron bien). Se agitó y se incubó en un agitador a 2-8°C durante aproximadamente 72 h. Luego se extrajo y se equilibró hasta temperatura ambiente durante 30 min, y luego se lavó con PBS 5 veces. Se añadió M-IgGκ BP-CFL 488 (n.º de producto: SC-516176, n.º de lote A1917, Santa Cruz Biotechnology, Inc., usado después de diluir con diluyentes a 1:100), se agitó y se incubó en un agitador a 2-8°C durante la noche. Se lavó con PBS 5 veces y se colocó sobre un portaobjetos. Luego, se selló el portaobjetos con medio de preparación. Se usó un
20 microscopio de fluorescencia para observar y evaluar las células ganglionares positivas teñidas con Brn3a (células ganglionares de la retina, RGC). Se fotografió el centro de cada hoja del parche retiniano de 4 hojas bajo un microscopio confocal de 40x, se contaron las RGC en cada fotografía mediante ImageJ equipado con el software Java1.6.0_24 de 64 bits (intervalo de selección de dimensión: 50-infinito), y se usó el valor promedio de 4 recuentos como cantidad de RGC de este animal. Se adoptó el software estadístico SPSS 21.0 (Chicago, IL) para realizar un
25 análisis estadístico de los datos. $P < 0,05$ significó que la diferencia fue estadísticamente significativa.

Examen histopatológico (tinción con hematoxilina-eosina, tinción HE): se seleccionaron 6 ratas al azar de cada grupo, cuyos globos oculares se obtuvieron después del sacrificio, se colocaron en disolución de Davidson modificada para fijarlos durante 24-72 h, y luego se transfirieron a disolución de formalina tamponante neutra al 10%. Se extrajeron los
30 globos oculares antes de la tinción HE, se lavaron con PBS tres veces y se deshidrataron con etanol en gradiente (etanol al 50% durante 90 min, etanol al 70% durante 90 min, etanol al 85% durante 90 min, etanol al 95% durante 60 min, etanol al 100% durante 60 min). Se empapó en una mezcla 1:1 de xileno y etanol durante 1 h, y luego se empapó en xileno puro durante 1 h. Inmersión en parafina, incrustación y corte en secciones: se sumergió el tejido hialinizado en una mezcla 1:1 de parafina y xileno durante 90 min, luego se colocó en parafina durante 120 min y se
35 enfrió de una vez. Luego, se cortaron las muestras de copa ocular a 5 μ m en rodajas de una vez y se secaron en estufa a 60°C para uso futuro. Se sumergieron los portaobjetos en xileno durante 5 min y se repitió el procedimiento 3 veces. Se sumergieron los portaobjetos en etanol en gradiente por turnos (al 100%, al 90% y al 70%) cada uno durante 5 min, y finalmente se lavaron los portaobjetos con agua del grifo durante 5 min. Se tiñeron los portaobjetos con tinción de hematoxilina durante 5 min. Se retiró por lavado con agua la tinción en exceso en los portaobjetos antes de la
40 separación de 10 s del color con una disolución etanólica de HCl al 75%, y se lavaron los portaobjetos con agua del grifo hasta que se detectaron claramente el micronúcleo y la cromatina nuclear al microscopio. Se tiñó con disolución de eosina al 0,5% durante 5 min y se deshidrató con etanol al 70%, al 85%, al 95% y al 100% por turnos durante 2 min. Se hialinizó con xileno dos veces durante 1 min cada vez. Se limpió el xileno en exceso alrededor de las secciones (se observó que no deben estar secas), se añadió gota a gota rápidamente una cantidad adecuada de goma neutra y se cubrieron los portaobjetos. Se observaron las secciones patológicas bajo un microscopio óptico, se fotografiaron
45 bajo una lente óptica de 40x. Se fotografió cada disección seleccionando dos campos visuales en los dos lados del nervio óptico, luego se estiró con marcos de recuento del mismo tamaño (dimensiones de los marcos de recuento: L 18,00 cm $\times$ W 3,47 cm). Se contó la cantidad de RGC en los marcos de recuento de cada fotografía por 2 personas, respectivamente. El valor promedio de los recuentos de las 2 personas se consideró como la cantidad de células en cada fotografía. Al final, el valor promedio de 4 recuentos de cada ojo se consideró como la cantidad de RGC de este animal. Se adoptó el software estadístico SPSS 21.0 (Chicago, IL) para realizar un análisis estadístico de los datos. $P < 0,05$ significó que la diferencia fue estadísticamente significativa.

Los resultados experimentales fueron los siguientes:

55 1) Efectos de los AuC a diferentes dosis sobre el PEVd de ratas del modelo

En este experimento, se estableció un modelo de lesión del nervio óptico de rata mediante un método de aplastamiento. Se evaluaron los efectos de los AuC en diferentes dosis sobre PEVd de ratas SD al administrárseles
60 gota a gota a los ojos durante 14 días consecutivos, 3 veces al día (intervalo de dosificación de $5 \pm 0,5$ h) con 10 μ l/ojo cada vez, PEVd el día 7 y el día 14, respectivamente. Después de que se aplastó el nervio óptico, una menor amplitud de PEVd, una forma de onda más ancha y una latencia más larga significaron un daño más grave.

Latencia de N2 y P2: antes de la preparación y administración del modelo, los animales en el grupo de control normal, el grupo de control negativo y los grupos de dosis baja, media y alta no tenían diferencias significativas en la latencia
65

de N2 y P2 ($P > 0,05$) (figura 15 y figura 16), lo que sugirió que la agrupación de experimentos no afectó a los resultados de los experimentos posteriores. El día 7 y el día 14 después de la preparación y administración del modelo, en comparación con el grupo de control normal, la latencia de N2 y P2 de los animales en el grupo de control negativo y los grupos de dosis baja, media y alta se alargó significativamente ($P < 0,0001$) (figuras 15 y 16). Mostró que en este experimento se estableció con éxito un modelo de rata con aplastamiento del nervio óptico. El día 7 y el día 14 después de la preparación y administración del modelo, en comparación con el grupo de control negativo, la latencia de N2 y P2 de los animales en los grupos de dosis baja, media y alta no tuvo una diferencia significativa ($P > 0,05$) (remítase a las figuras 15 y 16).

Amplitud de N2-P2: antes de la preparación y administración del modelo, los animales en el grupo de control normal, el grupo de control negativo y los grupos de dosis baja, media y alta no tenían diferencias significativas en la amplitud de N2-P2 ($P > 0,05$) (paneles A y B de la figura 17), lo que sugirió que la agrupación de experimentos no afectó a los resultados de los experimentos posteriores. El día 7 después de la preparación y administración del modelo, en comparación con el grupo de control normal ($22,2 \pm 2,3 \mu V$), la amplitud de N2-P2 ($14,7 \pm 1,2 \mu V$) del grupo de control negativo disminuyó significativamente (se redujo en el $33,7 \pm 5,4\%$, $P < 0,05$), lo que indicó que la función visual y el nervio óptico de las ratas se vieron influenciados significativamente y se preparó con éxito en este experimento un modelo de rata con aplastamiento del nervio óptico. En comparación con el grupo de control negativo, la amplitud de N2-P2 ($22,0 \pm 2,0 \mu V$) del grupo de dosis alta aumentó significativamente (hasta en el $49,4 \pm 9,1\%$, $P < 0,05$). En comparación con el grupo de control negativo, la amplitud de N2-P2 de los grupos de dosis baja y media aumentó en cierta medida (grupo de dosis baja: $20,2 \pm 1,6 \mu V$, hasta el $37,6 \pm 7,3\%$; grupo de dosis media: $29,9 \pm 1,5 \mu V$, hasta en el $35,5 \pm 6,8\%$), pero no tuvieron una diferencia significativa ($P > 0,05$). El día 14 después de la preparación y administración del modelo, la amplitud de N2-P2 del grupo de control negativo ($13,2 \pm 1,5 \mu V$) fue significativamente menor que la del grupo de control normal ($19,7 \pm 1,2 \mu V$) (disminuyó en el $32,9 \pm 8,0\%$, $P < 0,05$). En comparación con el grupo de control negativo, la amplitud de N2-P2 ($22,4 \pm 1,7 \mu V$) de la rata en el grupo de dosis alta de AuC aumentó en un gran margen (hasta en el $69,0 \pm 8,5\%$, $P < 0,01$), mientras que los grupos de dosis baja y de dosis media no tuvieron un efecto significativo en la mejora de la amplitud de N2-P2 (grupo de dosis baja: $15,2 \pm 1,2 \mu V$, hasta en el $14,5 \pm 6,2\%$, $P > 0,05$; grupo de dosis media: $17,6 \pm 1,4 \mu V$, hasta en el $32,8 \pm 7,0\%$, $P > 0,05$). El resultado anterior indicó que la administración a corto y largo plazo de AuC podía aumentar significativamente la amplitud de N2-P2 de las ratas SD y este efecto fue dependiente de la dosis. Mientras tanto, la observación al microscopio halló que la administración de AuC podía mejorar significativamente el defecto del campo visual provocado por el modelo de lesión por aplastamiento del nervio óptico, que también dependía de la dosis. Mostró que los AuC tenían un efecto de mejora evidente sobre la lesión del nervio óptico de los animales.

2) Inmunotinción de Brn3a para verificar los efectos de la administración continua de AuC durante 14 días en diferentes dosificaciones sobre las RGC de ratas SD

Brn3a tuvo un efecto importante sobre la supervivencia de las neuronas, la activación de genes relacionados con la diferenciación, y la diferenciación y supervivencia de las RGC y la extensión de los axones durante el desarrollo de la retina de roedores. Fue un marcador importante y altamente factible para las RGC. En la inmunotinción de Brn3a, un mayor número de células positivas para Brn3a significa la supervivencia de más RGC. Se muestran los resultados en la figura 18. En comparación con el grupo de control normal (panel A de la figura 18) (número de células positivas teñidas con Brn3a en un único marco de recuento: $126,5 \pm 7,0$), el número de células positivas para Brn3a ($7,6 \pm 1,6$) en el grupo de control negativo (imagen B de la figura 18) fue sólo el $6,0 \pm 1,3\%$ del del grupo de control normal ($P < 0,01$) (panel F de la figura 18), lo que sugirió que después del aplastamiento del nervio óptico, se perdieron muchas células ganglionares de los animales. En comparación con el grupo de control negativo, el número de células positivas para Brn3a ($50,8 \pm 22,9$) en el grupo de dosis alta de AuC (panel E de la figura 18) aumentó significativamente (hasta 5,6 veces, $P < 0,01$) (panel F de Figura 18). En comparación con el grupo de control negativo, las cantidades de RGC en el grupo de dosis baja (panel C de la figura 18) y el grupo de dosis media (panel D de la figura 18) de AuC aumentaron en cierta medida ($19,6 \pm 9,6$ y $15,8 \pm 5,4$, respectivamente), pero no tenían una diferencia estadística ($P > 0,05$) (panel F de la figura 18). El resultado anterior respaldó los resultados experimentales de PEVd, lo que sugirió que los AuC tenían un efecto protector evidente sobre la pérdida de células ganglionares después de que se dañara el nervio óptico, y el efecto era dependiente de la dosis.

3) Tinción HE para verificar los efectos de la administración continua de AuC durante 14 días en diferentes dosificaciones sobre la morfología del tejido retiniano y la cantidad de RGC de ratas SD

Las secciones de los casos de retina de rata se tiñeron con hematoxilina-eosina (tinción con hematoxilina-eosina, tinción HE). De este modo, pudo observarse la morfología del tejido retiniano desde otro ángulo bajo un microscopio y mientras tanto se contaba el número de RGC. Se muestran los resultados en la figura 19. En comparación con el grupo de control normal (panel A de la figura 19) (número de RGC en un único marco de recuento: $27,1 \pm 0,9$), la retina en el grupo de control negativo (panel B de la figura 19) mostró un edema tisular evidente con un grosor desigual, pérdida de RGC ($15,5 \pm 0,5$, un descenso del $44,8 \pm 1,8\%$, $P < 0,01$) y una disposición desigual evidente de las RGC. En comparación con el grupo de control negativo, la cantidad de RGC ($19,1 \pm 1,2$) en el grupo de dosis alta de AuC (panel E de la figura 19) aumentó significativamente (hasta en el $27,4 \pm 4,4\%$, $P < 0,05$), la estructura del tejido retiniano mejoró de manera evidente y se redujeron de manera evidente el edema tisular y la vacuolización. En comparación

con el grupo de control negativo, las cantidades de RGC del grupo de dosis baja (panel C de la figura 19) y del grupo de dosis media (panel D de la figura 19) de AuC aumentaron en cierta medida (grupo de dosis baja: $16,5 \pm 0,6$, hasta en el $10,4 \pm 2,4\%$; grupo de dosis media $16,2 \pm 1,1$, hasta en el $8,4 \pm 4,1\%$), pero no tuvieron una diferencia significativa ($P > 0,05$) (panel F de la figura 19). El resultado anterior correspondió al resultado del recuento de RGC inmunoteñidas por Brn3a, lo que sugirió que los AuC podían reducir la pérdida de RGC provocada por el daño del nervio óptico, y mejoraron significativamente la estructura de la retina y la disposición de las RGC, y tuvo un efecto protector sobre el nervio óptico, que fue dependiente de la dosis.

El resultado anterior indicó que los AuC podían aumentar significativamente la amplitud de N2-P2 de PEVd de las ratas en el modelo de rata con lesión por aplastamiento del nervio óptico y redujeron significativamente la pérdida de RGC, tuvieron un efecto protector contra el daño del nervio óptico, defectos del campo visual y apoptosis de las RGC, desempeñando un papel importante en la mejora de las estructuras del tejido del nervio óptico y de la retina y el alivio de la disfunción visual, y podían usarse como sustancias que contienen AuC para preparar fármacos que prevengan o traten el glaucoma.

Los AuC modificados con otros ligandos enumerados en la tabla 1 tuvieron un efecto similar, de modo que no se describirían con detalle en el presente documento.

Realización 8: Evaluación de la seguridad biológica

1. Se adoptó la línea celular SH-sy5y para evaluar la seguridad biológica de las sustancias que contienen AuC a nivel celular.

Método específico: se recogieron células SH-sy5y en la fase de crecimiento logarítmico de las células (células en el pase 6). Se ajustó la concentración de la suspensión celular y se añadieron 100 μ l en cada pocillo. Se sembraron en placa las células y se ajustó la densidad celular a 1000-10000 por pocillo. Se pusieron las placas de cultivo celular (se llenaron los pocillos marginales de las placas de 96 pocillos con medio de cultivo celular) en un incubador de células y se incubaron en un entorno con el 5% de CO₂, a 37°C durante 24 h para que las células se adhirieran a la pared. Se extrajeron las placas de 96 pocillos y luego se pusieron en una cabina de seguridad biológica después de desinfectarlas con alcohol. Se aspiró el medio de cultivo celular original y luego se añadieron disoluciones de AuC modificados con ligando enumerados en la tabla 1, que se diluyeron con medio de cultivo celular para obtener una concentración final de 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm y 500 ppm, respectivamente. Se añadió un volumen igual de medio de cultivo celular nuevo al grupo de control (sin AuC). Y se pusieron en un incubador de células, y se incubó durante 48 h. Se establecieron 6 pocillos replicados para cada uno del grupo experimental y el grupo de control. Después de 48 h de incubación, se retiró el medio de cultivo por centrifugación, luego se lavó con PBS 2-3 veces. Se añadieron 100 μ l de medio de cultivo nuevo y 20 μ l de disolución de metiltiazoliltetrazolio (MTT) (5 mg/ml, es decir, MTT al 0,5%) a cada pocillo y se continuó cultivando durante 4 h. Se terminó el cultivo, se extrajo la placa de 96 pocillos y se centrifugó (1000 r/min) durante 10 min. Se aspiró el sobrenadante y se añadieron 200 μ l de DMSO a cada pocillo, se colocaron en una mesa de vibración y se hizo oscilar a baja velocidad durante 10 min hasta que el color en los pocillos fue uniforme y se disolvió el cristal por completo. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 490 nm mediante un lector de microplacas. Las operaciones anteriores deben realizarse en un entorno estéril. Excepto la detección, se completaron todas las etapas en una cabina de seguridad biológica. Los suministros experimentales se desinfectaron en un autoclave antes de su uso.

Se tomaron AuC modificados con L-NIBC en la realización 2, por ejemplo, se muestran los resultados en la figura 20 en la que los paneles A-C mostraron los efectos de AuC con tamaños de partícula de 2,6 nm, 1,8 nm o 1,1 nm y en concentraciones finales de 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm o 500 ppm sobre la viabilidad de las células SH-sy5y. Se indicó que a una concentración bastante alta (tal como: 100 ppm), la adición de AuC modificados con L-NIBC casi no tuvo ninguna influencia sobre la viabilidad celular. A una mayor concentración (tal como: 200 y 500 ppm), la adición de AuC modificados con L-NIBC provocaría una leve lesión celular (la tasa de muerte celular es menor del 20%). Dado que 100 ppm era mucho mayor que la menor concentración con efecto de los AuC (0,1 ppm o menos), pudo concluirse que los AuC modificados con L-NIBC tenían una alta seguridad a nivel celular.

Otros AuC modificados con ligando con diferentes tamaños también tuvieron efectos similares. No se describirán con detalle en este caso.

2. Adoptar un estudio de toxicidad aguda en ratones para evaluar la toxicidad aguda de sustancias que contienen AuC.

Método específico: para diferentes AuC modificados con ligando enumerados en la tabla 1 (se tomaron AuC modificados con L-NIBC con un diámetro promedio de 1,8 nm en la realización 2, por ejemplo), se dividieron 60 ratones adultos en cuatro grupos con 15 ratones en cada grupo, que fueron: un grupo de control y tres grupos experimentales. En el grupo de control, se alimentaron los ratones normalmente, mientras que en los tres grupos experimentales, se alimentaron los ratones con AuC mediante administración oral (por sonda gástrica) a una dosis de 0,1 g/kg de peso corporal, 0,3 g/kg de peso corporal y 1 g/kg de peso corporal al día, respectivamente durante una semana en condiciones de dieta normal. Se alimentaron los ratones normalmente durante 30 días después de que se terminó la

alimentación con AuC. Se observaron respuestas anómalas de los ratones.

En el experimento con ratones, la ingestión de AuC de diferentes tamaños en tres concentraciones no influyó en la supervivencia y actividad de los ratones. Aunque para una ingesta de dosis alta de 1 g/kg de peso corporal, los ratones se mantuvieron sanos.

Otros AuC modificados con ligando enumerados en la tabla 1 también tuvieron resultados similares. No se describirán con detalle en el presente documento. Basándose en los resultados anteriores, pudo concluirse que los AuC eran muy seguros.

Realización 9: Distribución metabólica y en tejidos de AuC en ratones

Experimento 1:

Etapas operativas: se dividieron 80 ratones aleatoriamente en cuatro grupos, 20 ratones en cada grupo, y se alimentaron con AuC modificados con ligando enumerados en la tabla 1 mediante administración oral (por sonda gástrica) a dosis de 100 mg/kg, 20 mg/kg, 5 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente en los grupos. Después de la alimentación de AuC, se dividieron los 20 ratones de cada grupo aleatoriamente en 4 subgrupos con 5 ratones en cada subgrupo. Se sacrificaron en los puntos de tiempo de 2 h, 6 h, 24 h y 48 h, respectivamente después de la alimentación. Se tomaron por separado tejidos del corazón, hígado, bazo, pulmón, riñón y cerebro. Se pesó cada tejido y se añadieron 2 ml de agua para homogeneizar, y luego se añadieron 2 ml de agua regia y se mezcló en vórtice, y se hizo oscilar durante 72 h en un oscilador. Se añadió una disolución de ácido nítrico al 2% en peso hasta un volumen final de 10 ml y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min. Se aspiraron 4 ml de sobrenadante y se midió el contenido del elemento oro en el fluido tisular mediante espectrometría de absorción atómica.

Los resultados indicaron que los AuC podían atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Podían excretarse fuera del cuerpo con el tiempo, de modo que no tenían una acumulación evidente en el cuerpo. Por tanto, las sustancias que contienen AuC proporcionadas en la presente invención tenían buenas perspectivas en la aplicación de la preparación de medicamentos para tratar el glaucoma.

Experimento 2:

Etapas operativas: se dividieron 80 ratones aleatoriamente en cuatro grupos con 20 ratones en cada grupo, y se les inyectó por vía intraperitoneal AuC modificados con ligando enumerados en la tabla 1. Las dosis de AuC (se tomaron AuC modificados con L-NIBC con un diámetro promedio de 1,8 nm, por ejemplo) en cada grupo fueron de 100 ppm, 20 mg ppm, 5 ppm y 1 ppm de peso corporal de ratón, respectivamente. Después de la inyección de AuC, se dividieron los 20 ratones de cada grupo aleatoriamente en 4 grupos, 5 ratones en cada grupo. Se sacrificaron en puntos de tiempo de 2 h, 6 h, 24 h y 48 h, respectivamente después de la administración. Se tomaron por separado tejidos del corazón, hígado, bazo, pulmón, riñón y cerebro. Se pesó cada tejido y se añadieron 2 ml de agua para homogeneizar, luego se añadieron 2 ml de agua regia y se mezcló en vórtice, y se hizo oscilar durante 72 h en un oscilador. Se añadió una disolución de ácido nítrico al 2% en peso hasta un volumen final de 5 ml y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min. Se aspiró 1 ml de sobrenadante y se midió el contenido del elemento oro en el fluido tisular mediante espectrometría de absorción atómica.

Se adoptaron las etapas anteriores para llevar a cabo experimentos para AuC modificados con otros ligandos enumerados en la tabla 1.

Los resultados indicaron que después de 2 h, el contenido del elemento oro en el cerebro alcanzó el 1% - 10% de la concentración inicial. Después de 6 h, el contenido en el cerebro podía mantenerse a un nivel similar. Después de 24 h, el contenido en el cerebro disminuyó significativamente. A las 48 horas, el contenido disminuyó hasta cerca o por debajo del límite de detección, excepto para las muestras a una dosis de 100 ppm. Los resultados anteriores indicaron que las sustancias que contienen AuC también tenían una buena seguridad biológica a nivel animal, que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y no tenían una acumulación evidente en el cuerpo.

En resumen, los resultados experimentales anteriores ilustraron los siguientes puntos (las "nanopartículas de oro" y los "AuC" mencionados a continuación se refieren todos a los casos con modificación de ligando):

(1) En el experimento (realización 3) para la agregación de A β *in vitro*, se halló que el efecto de las nanopartículas de oro sobre la cinética de agregación de A β estaba relacionado con el tamaño. Cuando el diámetro de partícula era mayor de o igual a 10,1 nm, la adición de nanopartículas de oro podía acelerar la agregación de A β , y cuando el tamaño de partícula era menor de o igual a 6,0 nm, se inhibía la agregación de A β , pero no pudo lograrse la inhibición completa de la agregación de A β . Sin embargo, cuando se usaron AuC (el diámetro promedio es menor de 3 nm), todos los AuC podían inhibir significativamente la agregación de A β *in vitro*, y este efecto se relacionó con la concentración de AuC. Cuando la concentración de AuC alcanzó 5-10 ppm, pudo inhibirse la agregación de A β por completo, y la concentración mínima requerida para la inhibición completa se relacionó con el tipo de

ligando y el diámetro de AuC.

(2) En el experimento del modelo de lesión de células ganglionares ópticas RGC-5 (realización 4 - realización 6), se halló que los AuC modificados con diferentes ligandos y en diferentes tamaños (el diámetro promedio era menor de 3 nm) en la presente invención, podían aumentar significativamente la viabilidad celular del modelo de lesión de RGC-5, lo que sugirió que los AuC tenían una eficacia significativa a nivel celular. En comparación, las nanopartículas de oro de mayor tamaño no tuvieron un efecto significativo o no tuvieron efecto. Como ninguno de los ligandos tuvo un efecto sobre la agregación de A β y un modelo diferente de lesión de células ganglionares ópticas RGC-5 (realización 3 - realización 6), pudo concluirse que la eficacia de los AuC procedía de los propios AuC. Ofreció un nuevo enfoque para la aplicación de los AuC.

(3) Además, la presente invención adoptó el modelo de lesión por pinzamiento del nervio óptico por glaucoma de rata (realización 7) para verificar adicionalmente la eficacia de los AuC, lo que indicó que los AuC podían aumentar significativamente la amplitud N2-P2 de PEVd de las ratas en el modelo de lesión por aplastamiento del nervio óptico y redujeron significativamente la pérdida de RGC, tuvieron un efecto protector evidente contra el daño del nervio óptico, defecto del campo visual y apoptosis de RGC, desempeñaron un papel evidente en la mejora de la estructura y disposición de las células de la retina. Indicó que los AuC podían aliviar la disfunción visual relacionada con el glaucoma y podían usarse para preparar fármacos para prevenir y/o tratar enfermedades relacionadas.

(4) En el experimento para una evaluación adicional de la seguridad biológica (realización 8), cuando se cultivaron los AuC a una concentración de 100 ppm en peso (las siguientes ppm se refieren al porcentaje en peso) conjuntamente con células nerviosas, no tuvieron una influencia evidente en la viabilidad de las células; cuando la concentración superó las 100 ppm (mucho mayor que la menor concentración con efecto de los AuC), disminuyó ligeramente la viabilidad celular. Como la menor concentración con efecto de AuC (0,1-1 ppm) fue mucho menor de 100 ppm, pudo concluirse que los AuC tenían una excelente seguridad biológica a nivel celular. En la prueba de toxicidad aguda en ratones, se halló que una dosis de AuC de 1 g/kg de peso corporal (equivalente a 1000 ppm) administrada una vez al día durante siete días consecutivos no provocaba efectos adversos. En el estudio de la distribución y la farmacocinética *in vivo* en ratones (realización 9), el contenido del elemento oro en el cerebro alcanzó el 1% - 10% de la concentración inicial después de 2 h. Después de 6 h, se mantuvo el contenido en el cerebro en un nivel similar. Después de 24 h, el contenido en el cerebro disminuyó significativamente. A las 48 h, el contenido disminuyó por debajo del límite de detección excepto para las muestras a una dosis de 100 ppm. Los resultados anteriores indican que una sustancia que contiene AuC también tiene una buena seguridad biológica a nivel animal, podría atravesar la barrera hematoencefálica y no tiene una acumulación evidente en el cuerpo, de modo que tenía una buena perspectiva en la aplicación en la preparación de medicamentos que tratan el glaucoma.

(5) En comparación con la tecnología actual, los ligandos usados en la presente invención no se diseñaron específicamente para los comportamientos de agregación de A β , y el experimento de contraste indicó que los ligandos usados no tenían un efecto evidente sobre la agregación de A β (realización 3). Pero dado que el tamaño de los AuC era menor que el tamaño de la proteína A β en sí misma, la agregación de A β podría inhibirse en gran medida por la combinación del efecto de tamaño y las interacciones moleculares débiles. Las excelentes eficacias en el modelo de lesión de células ganglionares ópticas RGC-5 y el modelo de lesión por pinzamiento del nervio óptico de glaucoma de rata confirmaron adicionalmente la viabilidad de los AuC en la preparación de medicamentos para prevenir o tratar el glaucoma.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona la aplicación de sustancias que contienen AuC en la preparación de fármacos que previenen y/o tratan el glaucoma. Las sustancias que contienen AuC pueden reducir significativamente la pérdida de RGC de las ratas en el modelo de rata con lesión por aplastamiento del nervio óptico de glaucoma, y tienen un efecto protector evidente sobre el daño del nervio óptico, y pueden estrechar el defecto del campo visual y reducir la apoptosis de RGC, y desempeñar un papel significativo en la mejora de las estructuras del tejido del nervio óptico y de la retina y el alivio de la disfunción visual, y tienen una buena biocompatibilidad a nivel animal, y pueden usarse como nuevos fármacos para prevenir y/o tratar el glaucoma. Son adecuados para la aplicación industrial.

REIVINDICACIONES

1. Clúster de oro (AuC) o sustancias que contienen AuC para su uso en un método de prevención y/o tratamiento del glaucoma, en los que los AuC o las sustancias que contienen AuC comprenden AuC y el ligando Y que recubre los AuC externamente, en los que el diámetro del núcleo de oro de los AuC es menor de 3 nm, en los que el ligando Y incluye sin limitación uno o más de L(D)-cisteína y sus derivados, oligopéptidos que contienen cisteína y sus derivados, y otros compuestos que contienen tiol, en los que:
 - a) la L(D)-cisteína y sus derivados se seleccionan de L(D)-cisteína, N-isobutiril-L(D)-cisteína (L(D)-NIBC) o N-acetil-L(D)-cisteína (L(D)-NAC); y
 - b) los oligopéptidos que contienen cisteína y sus derivados se seleccionan de L-arginina-L-cisteína (RC), L-cisteína-L-arginina (CR), dipéptido de L-cisteína-L-histidina (CH), dipéptido de L-histidina-L-cisteína (HC), L-glutación (GSH), tripéptido de L-lisina-L-cisteína-L-prolina (KCP), tripéptido de L-prolina-L-cisteína-L-arginina (PCR), tripéptido de glicina-L-cisteína-L-arginina (GCR), tetrapéptido de glicina-L-serina-L-cisteína-L-arginina (GSCR) o tetrapéptido de glicina-L-cisteína-L-serina-L-arginina (GCSR).
2. AuC o sustancias para su uso en un método según la reivindicación 1, en los que se seleccionan otros compuestos que contienen tiol de 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (Cap), ácido tioglicólico, mercaptoetanol, tiofenol, D-3-trolovol, N-(2-mercaptopropionil)-glicina o dodecilmercaptano.
3. AuC o sustancias para su uso en un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que las sustancias que contienen AuC están en disolución, polvo o flóculo.
4. AuC o sustancias para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que el diámetro del núcleo de oro de los AuC es de 0,5-2,6 nm o 1,1-2,6 nm, preferiblemente 0,5-2,6 nm.
5. AuC o sustancias para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que los AuC se modifican con diferentes ligandos, que pueden ser principios activos o inactivos para el glaucoma.
6. AuC o sustancias para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que los AuC se modifican con ligando de N-isobutiril-L-cisteína (L-NIBC), N-isobutiril-D-cisteína (D-NIBC), L-cisteína-L-arginina (CR), L-arginina-L-cisteína (RC), N-acetil-L-cisteína (L-NAC), N-acetil-D-cisteína (D-NAC), L-glutación (GSH), 1-[(2S)-2-metil-3-tiol-1-oxopropil]-L-prolina (Cap), L-cisteína o D-cisteína.
7. AuC o sustancias para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en los que el método para preparar las sustancias que contienen AuC comprende las siguientes etapas:
 - (1) disolver HAuCl_4 en uno de metanol, agua, etanol, n-propanol y acetato de etilo, obteniéndose una disolución A en la que la concentración de HAuCl_4 es de 0,01~0,03 M;
 - (2) disolver el ligando Y en un disolvente, obteniéndose una disolución B en la que la concentración de ligando Y es de 0,01~0,18 M;
 - (3) mezclar la disolución A en la etapa (1) con la disolución B en la etapa (2) en las que la razón molar de HAuCl_4 y el ligando Y es de 1:0,01~1:100, agitar la mezcla en un baño de hielo durante 0,1~12 h, añadir disolución de NaBH_4 0,025~0,8 M, y luego agitar el sistema de reacción en un baño de hielo durante 0,1~12 h, en los que la razón molar de NaBH_4 y el ligando Y es de 1:0,01~1:100 para obtener las sustancias similares a una disolución que contienen AuC.
8. Sustancias para su uso en un método según la reivindicación 7, en las que el disolvente en la etapa (2) es uno o más de metanol, acetato de etilo, agua, etanol, n-propanol, pentano, ácido fórmico, ácido acético, dietil éter, acetona, anisol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, pentanol, etanol, acetato de butilo, tributil metil éter, acetato de isopropilo, dimetilsulfóxido, acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de metilo, acetato de metilo, 2-metil-1-propanol y acetato de propilo.
9. Sustancias para su uso en un método según la reivindicación 7 u 8, en las que las sustancias similares a una disolución que contienen AuC obtenidas en la etapa (3) se dializan y liofilizan a su vez para obtener sustancias pulverulentas o floculantes que contienen AuC; preferiblemente, la diálisis indica específicamente que las sustancias similares a una disolución que contienen AuC se colocan en una bolsa de diálisis y se dializan en agua a temperatura ambiente durante 1~7 días.

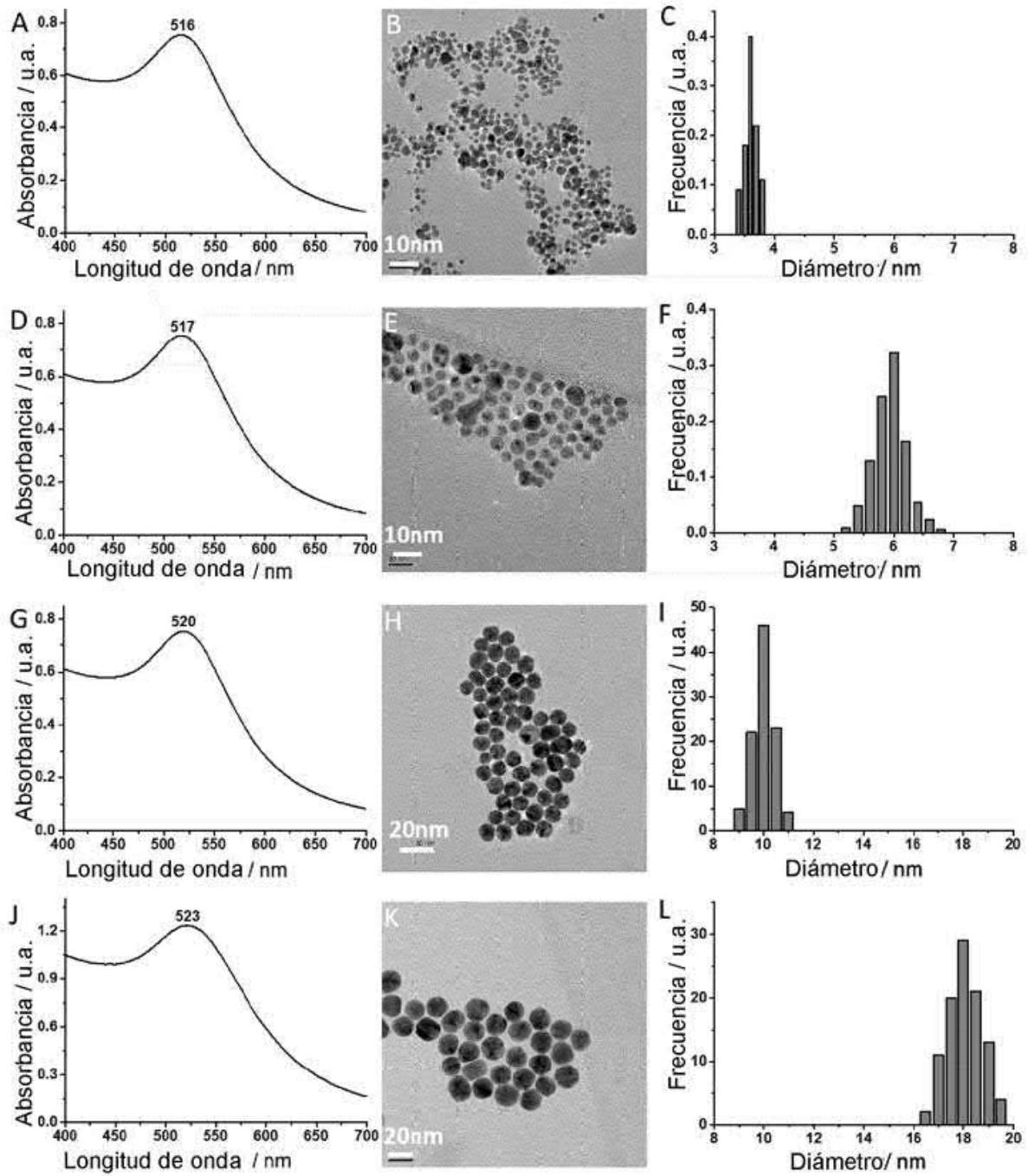


Fig. 1

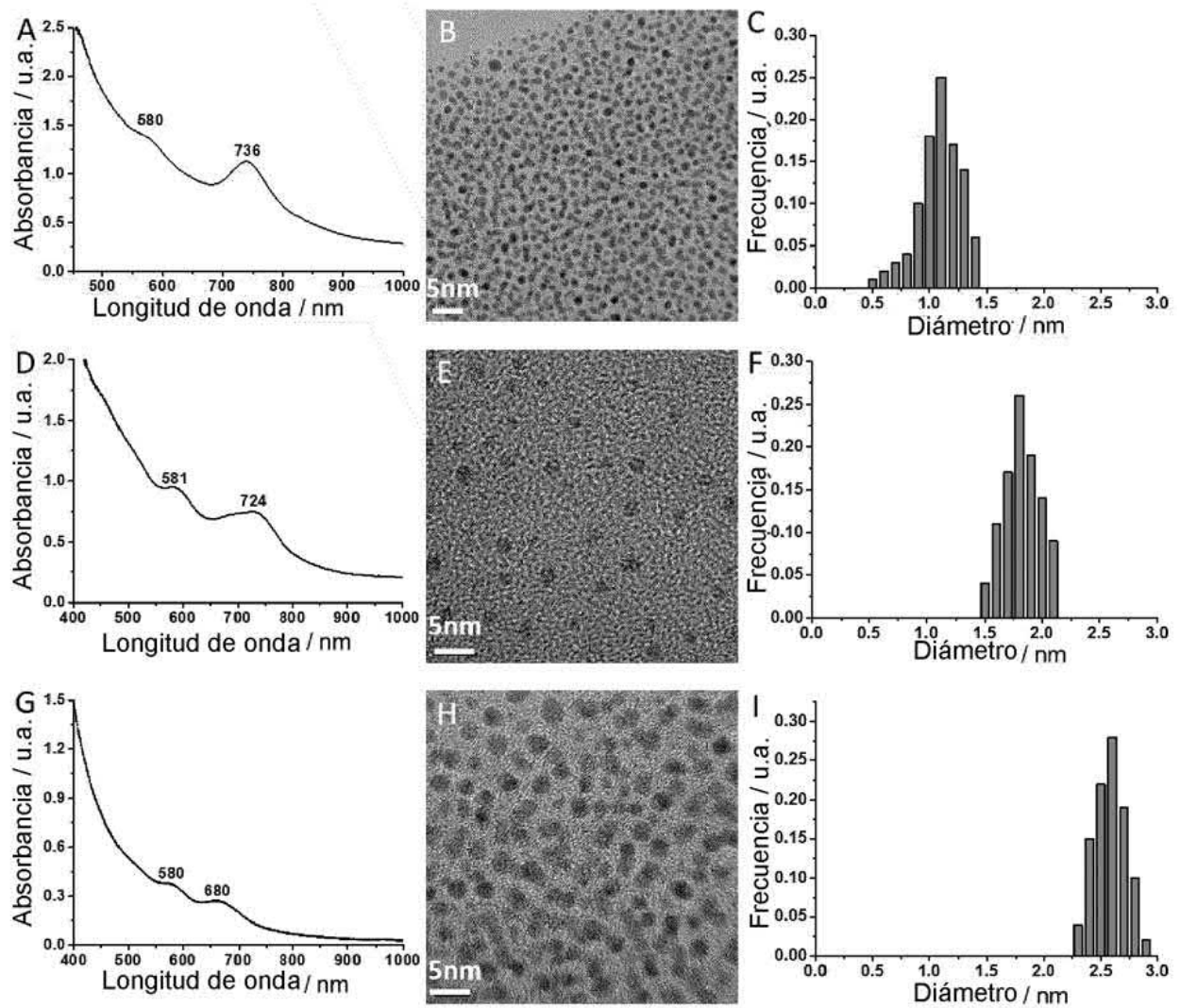


Fig. 2

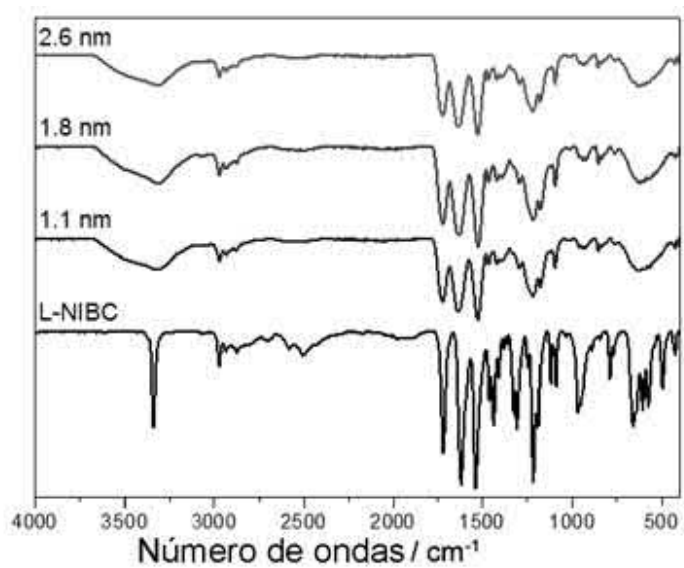


Fig. 3

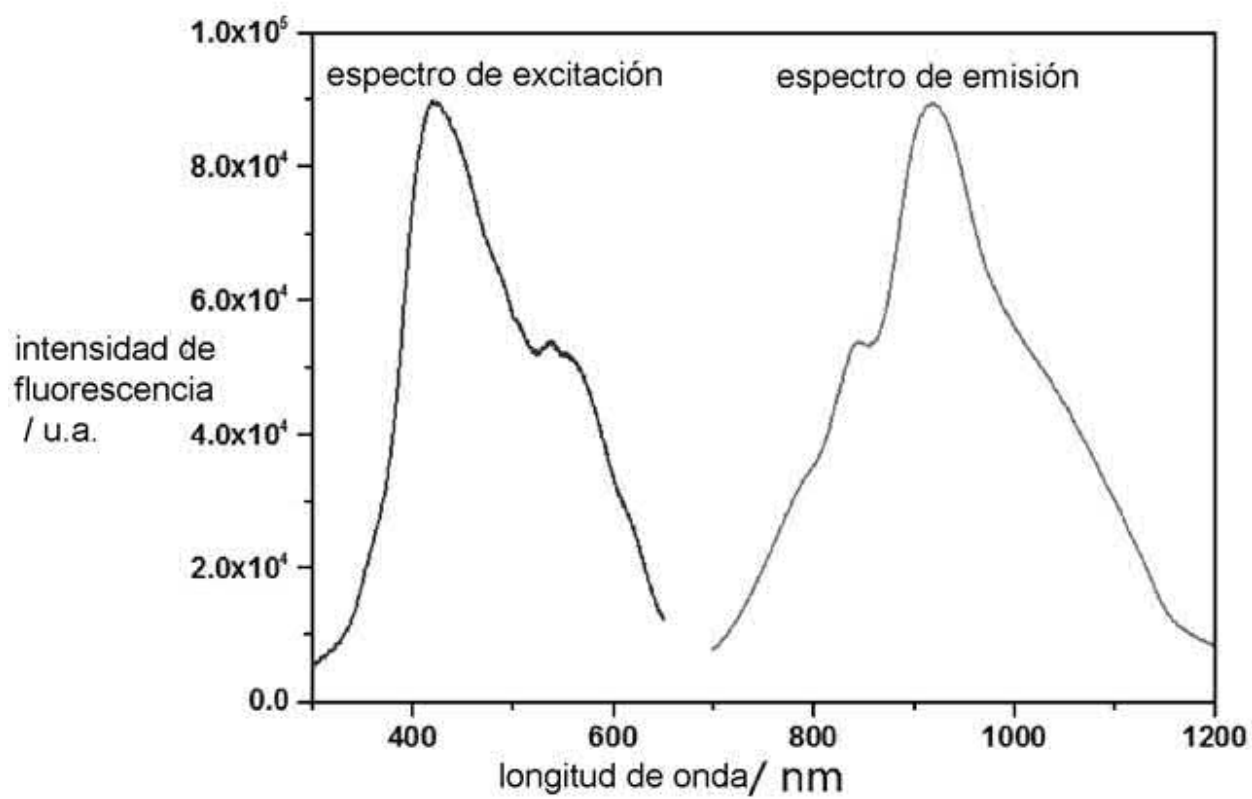


Fig. 4

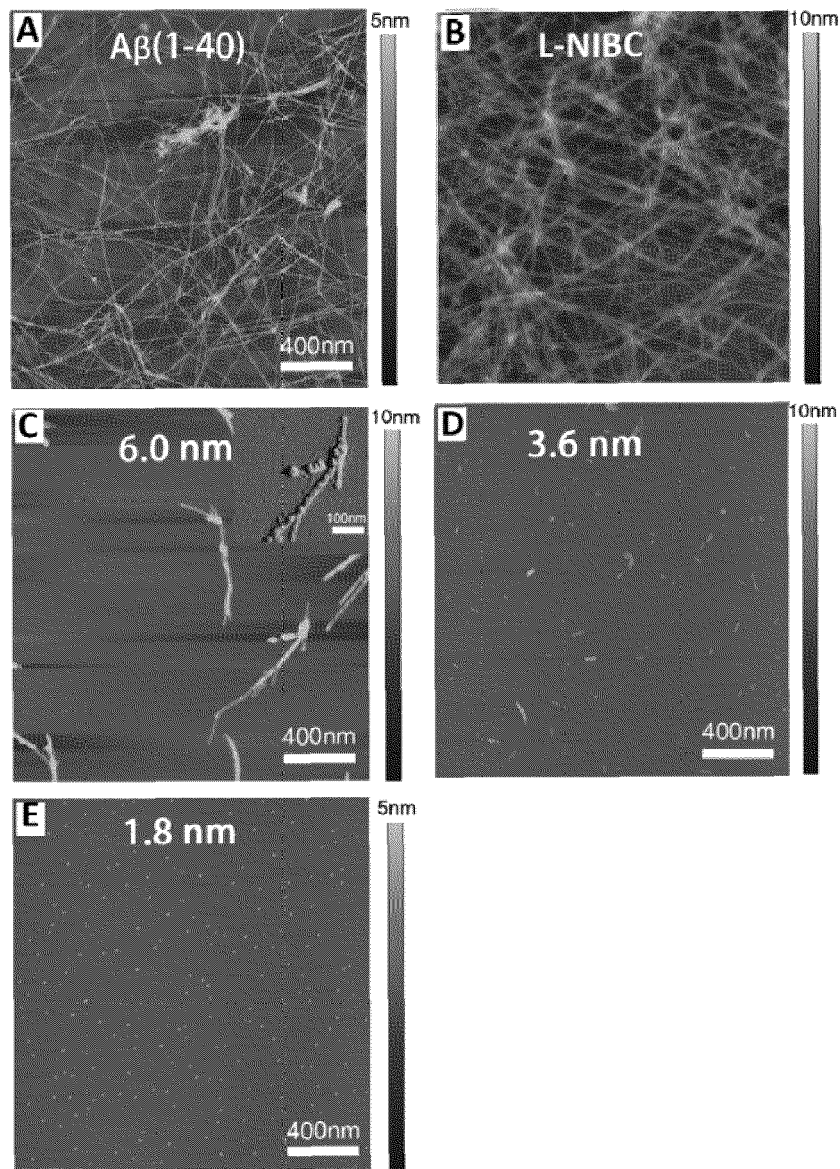


Fig. 5

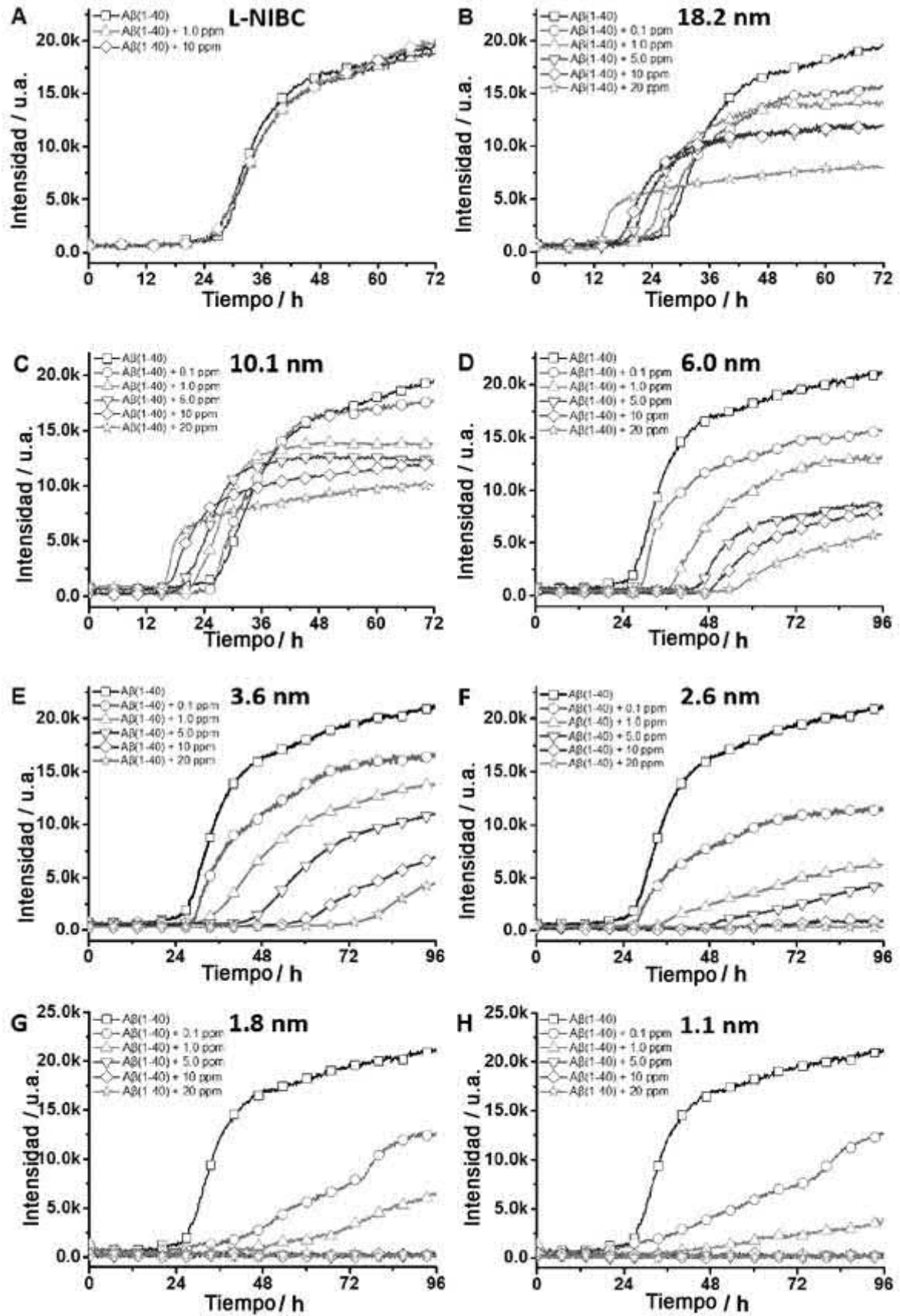


Fig. 6

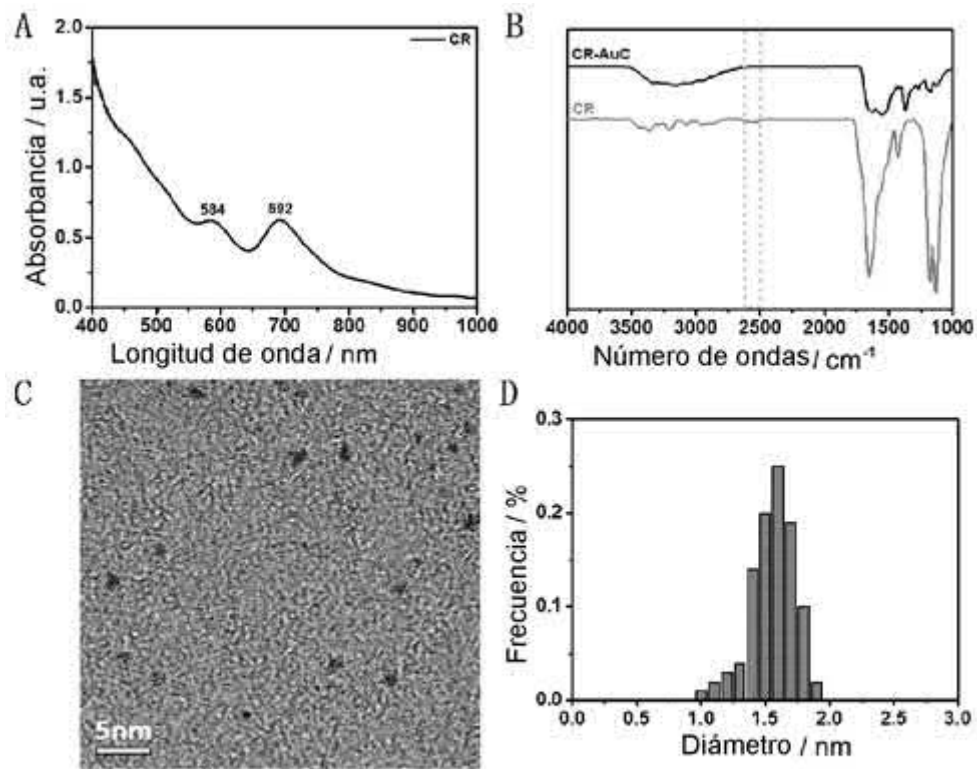


Fig. 7

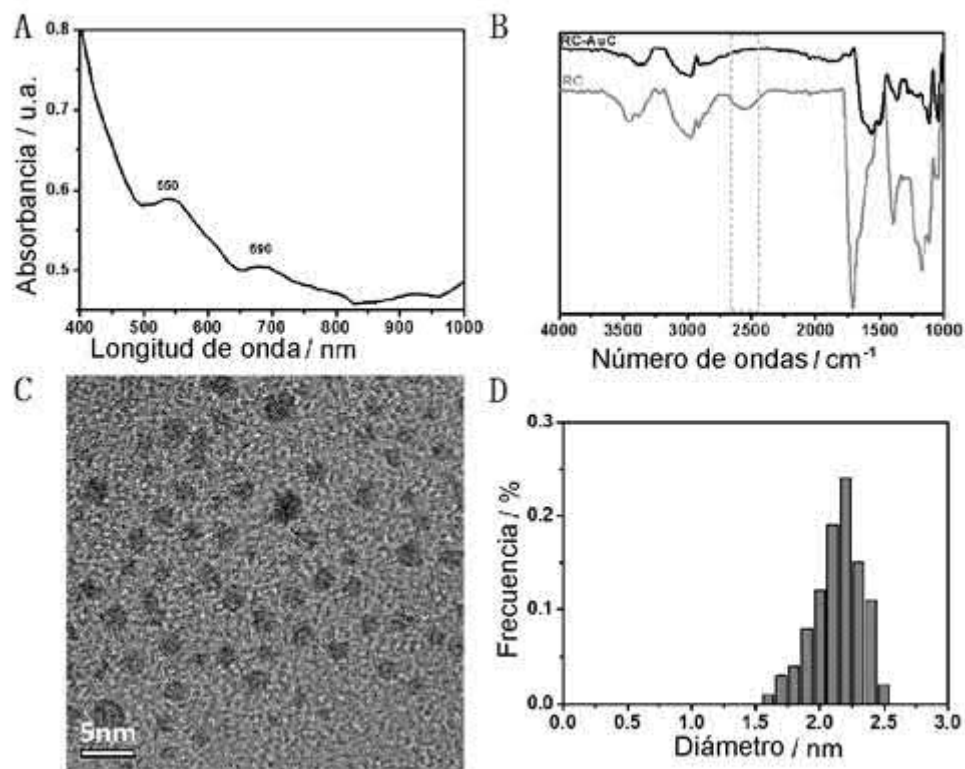


Fig. 8

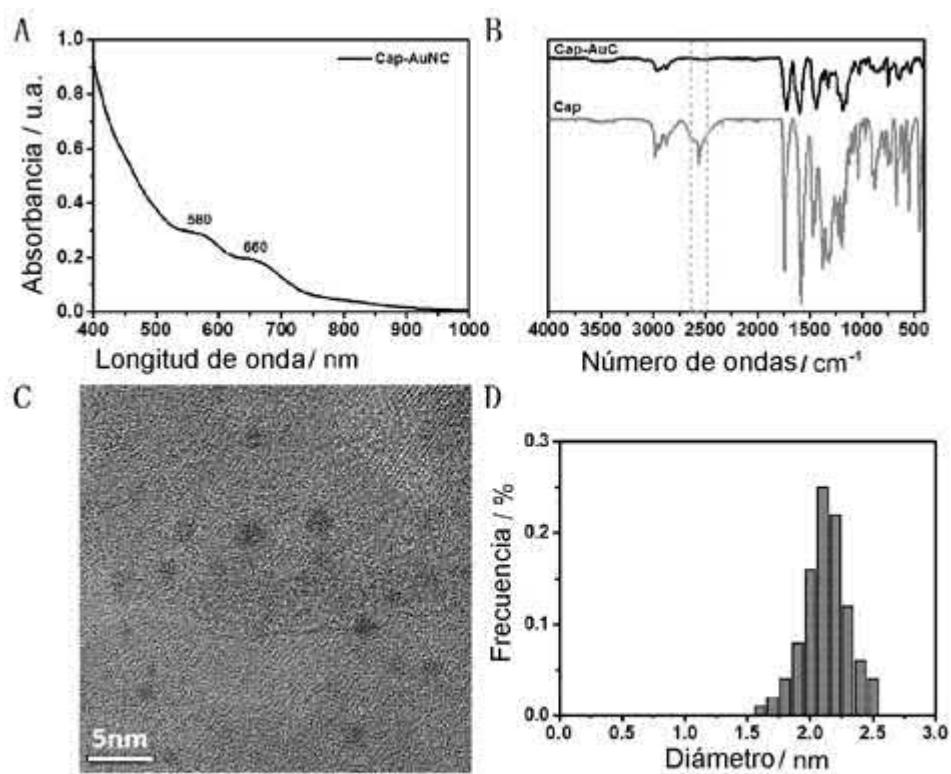


Fig. 9

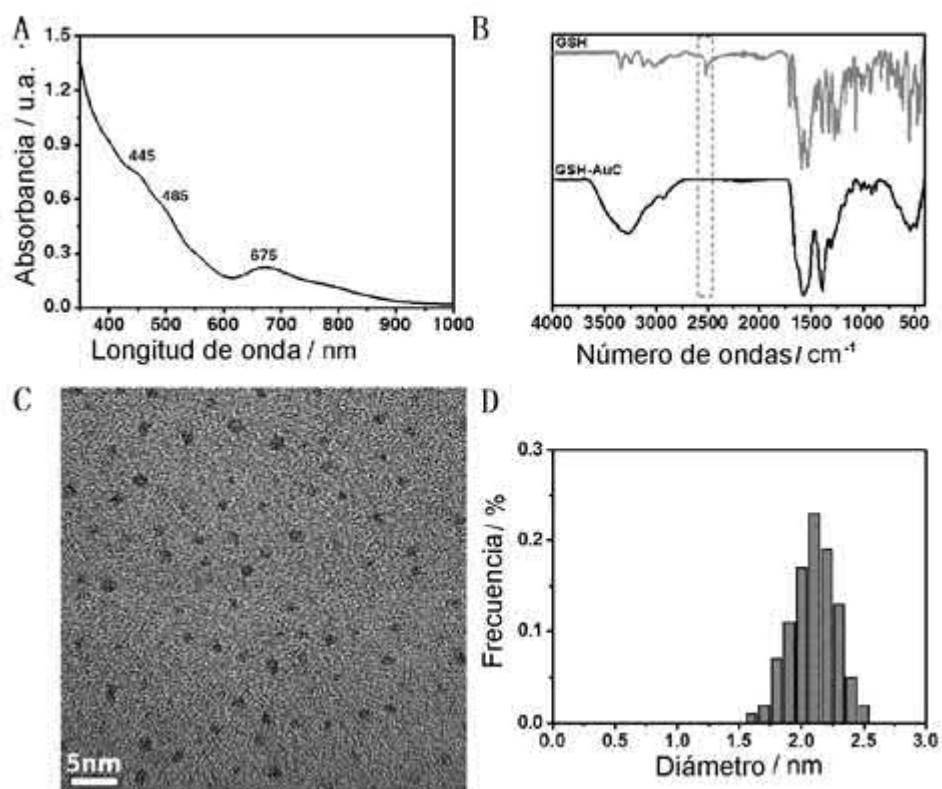


Fig. 10

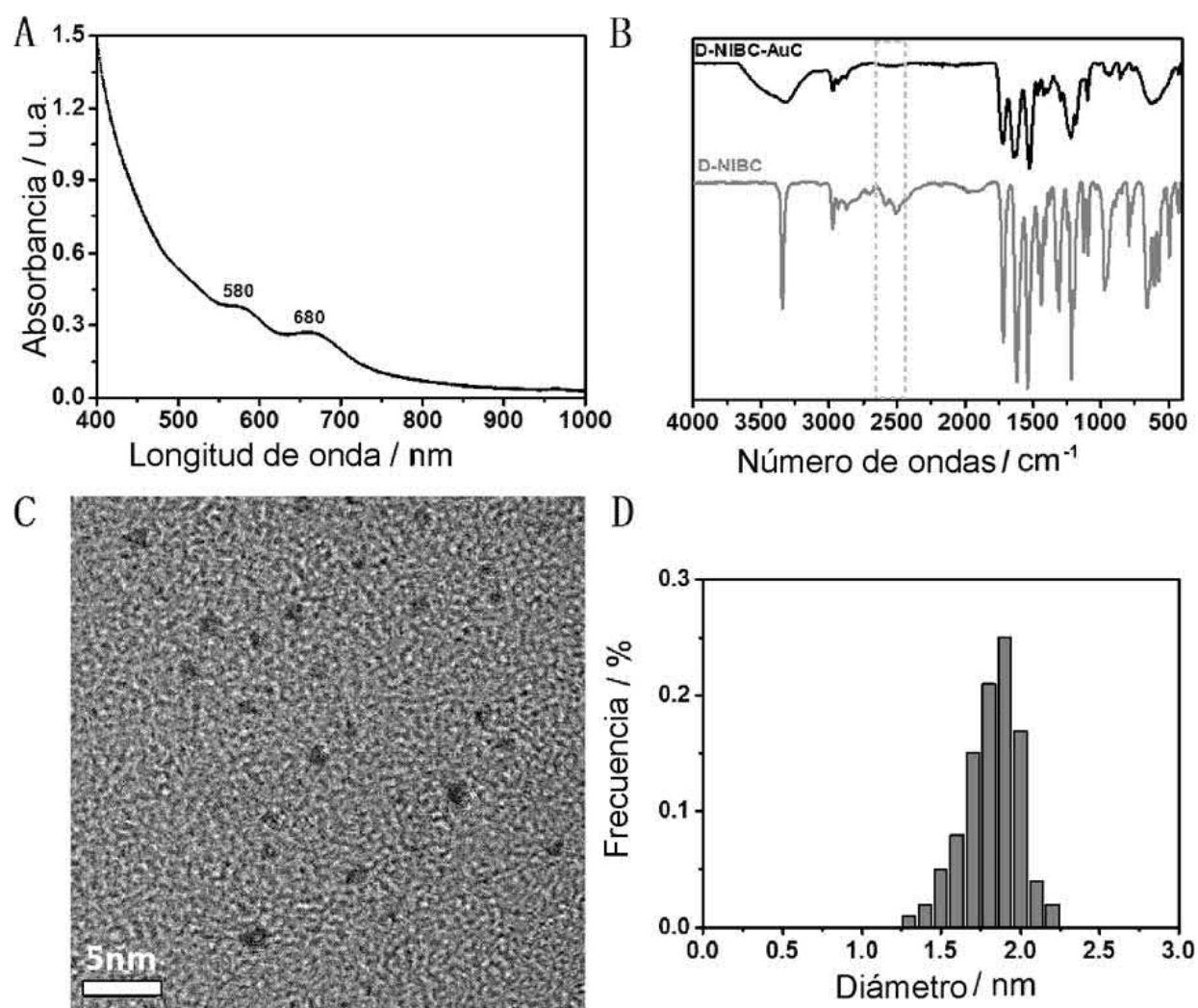


Fig. 11

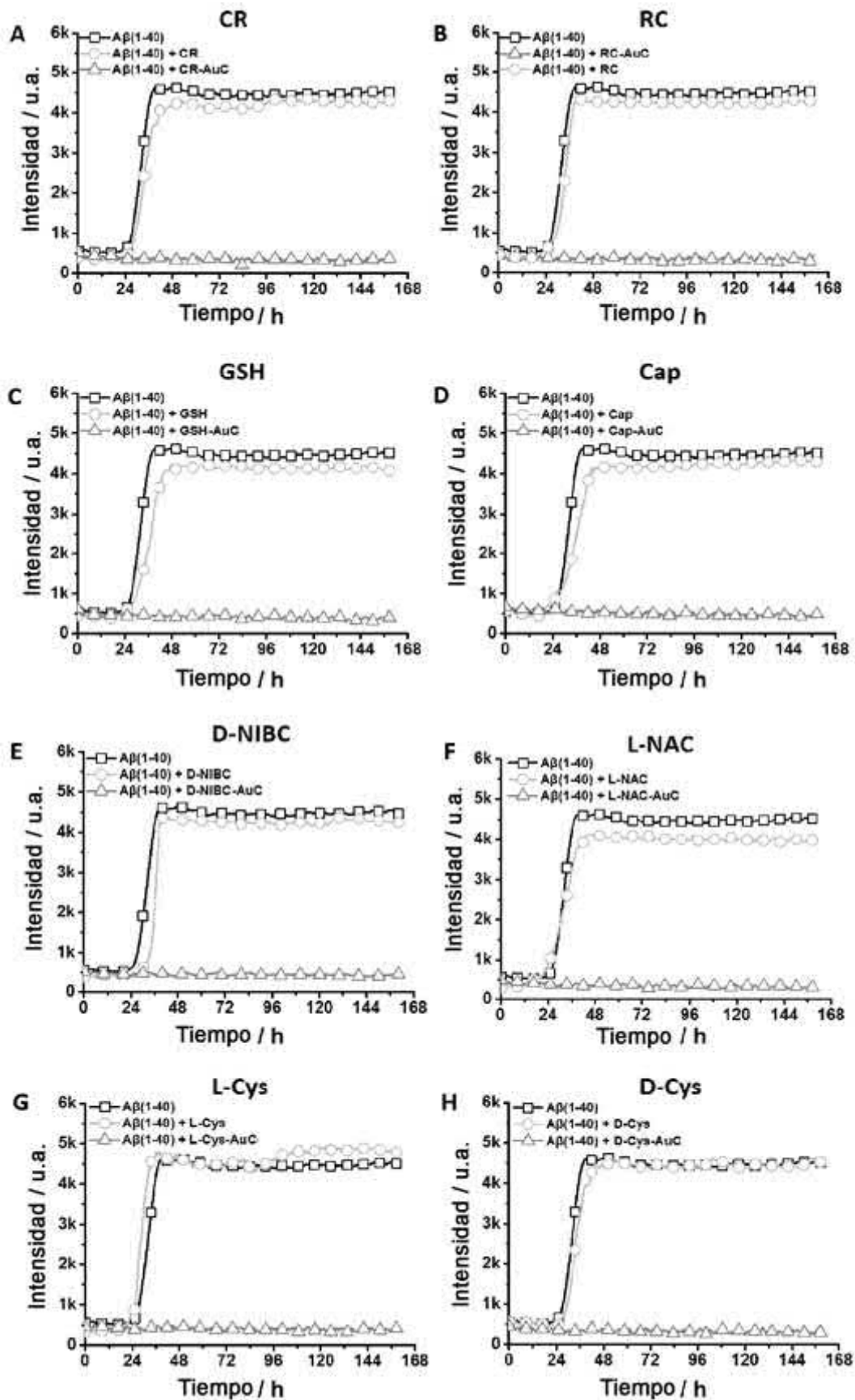


Fig. 12

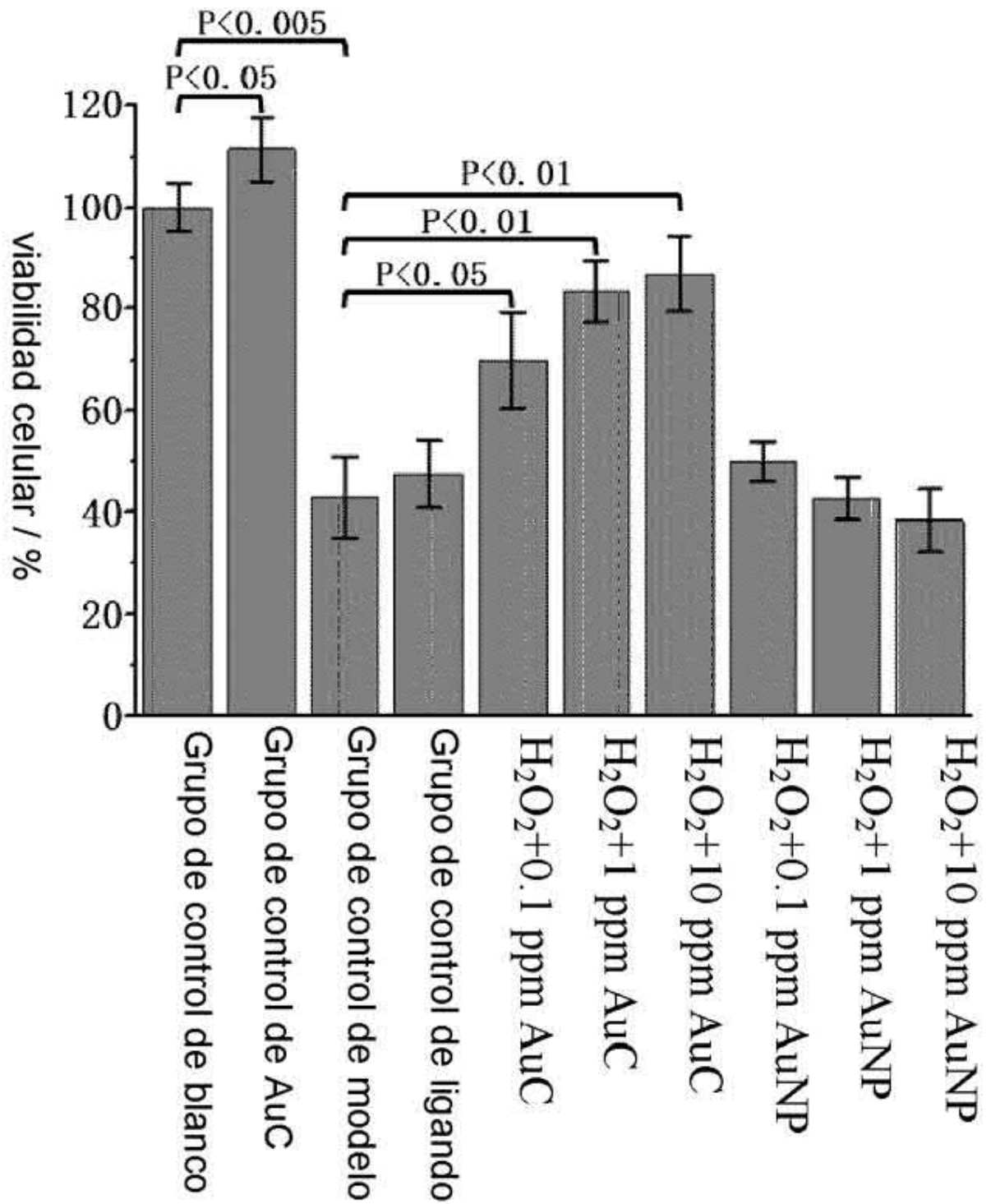


Fig. 13

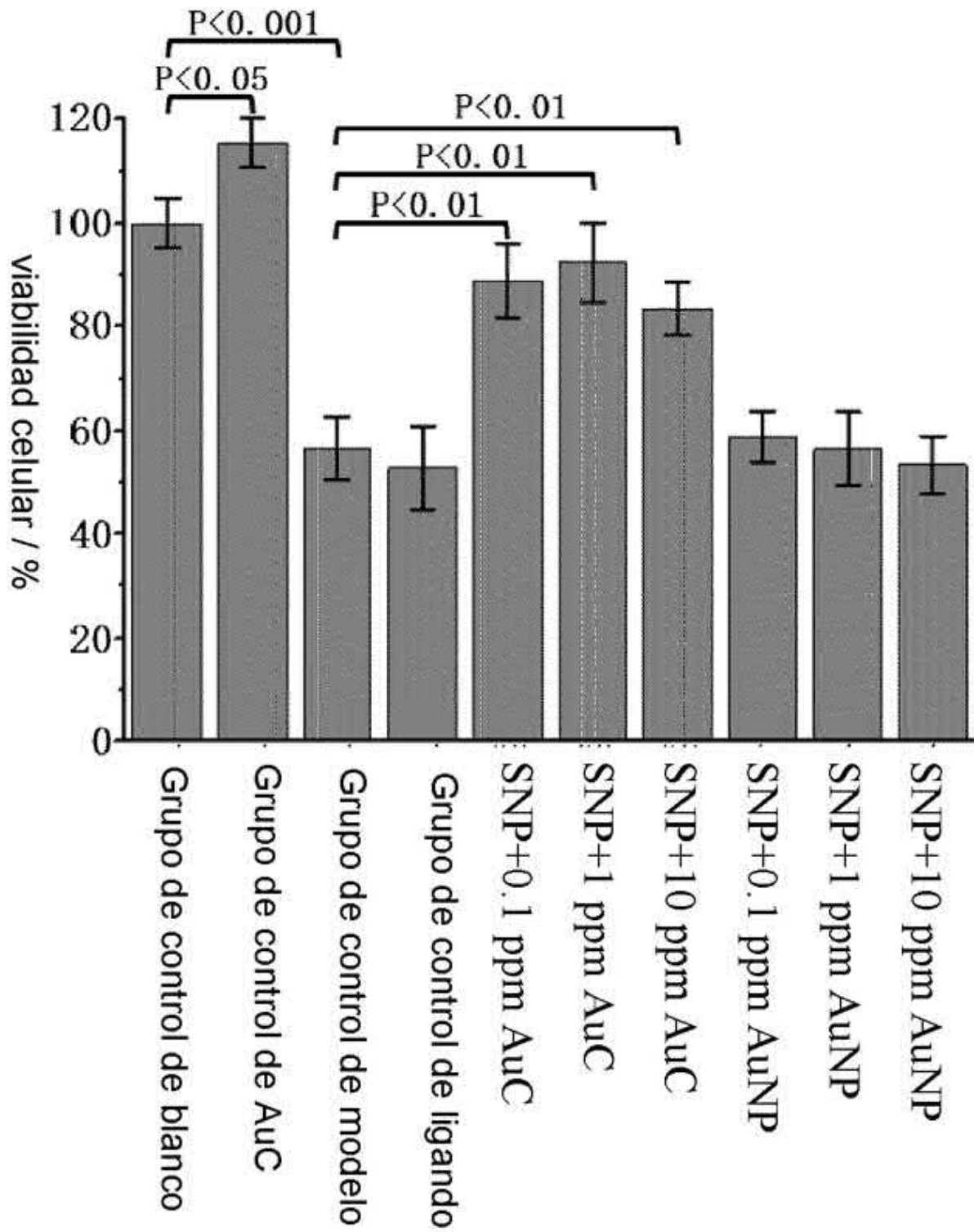


Fig. 14

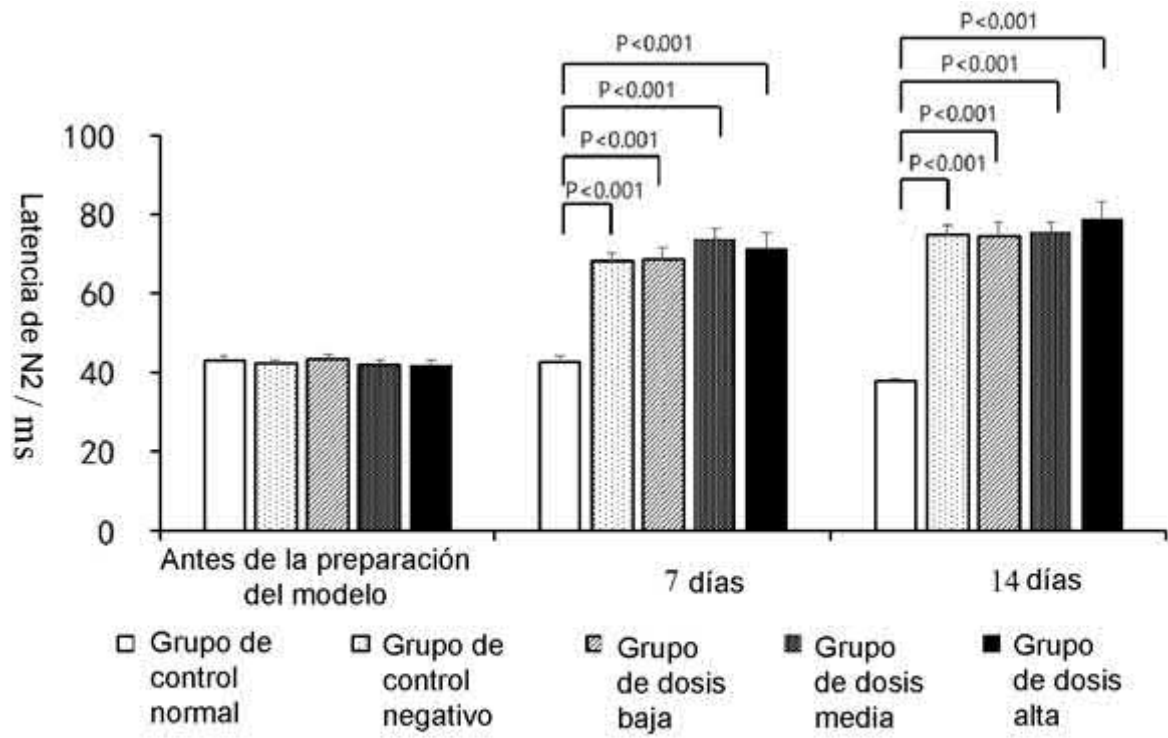


Fig. 15

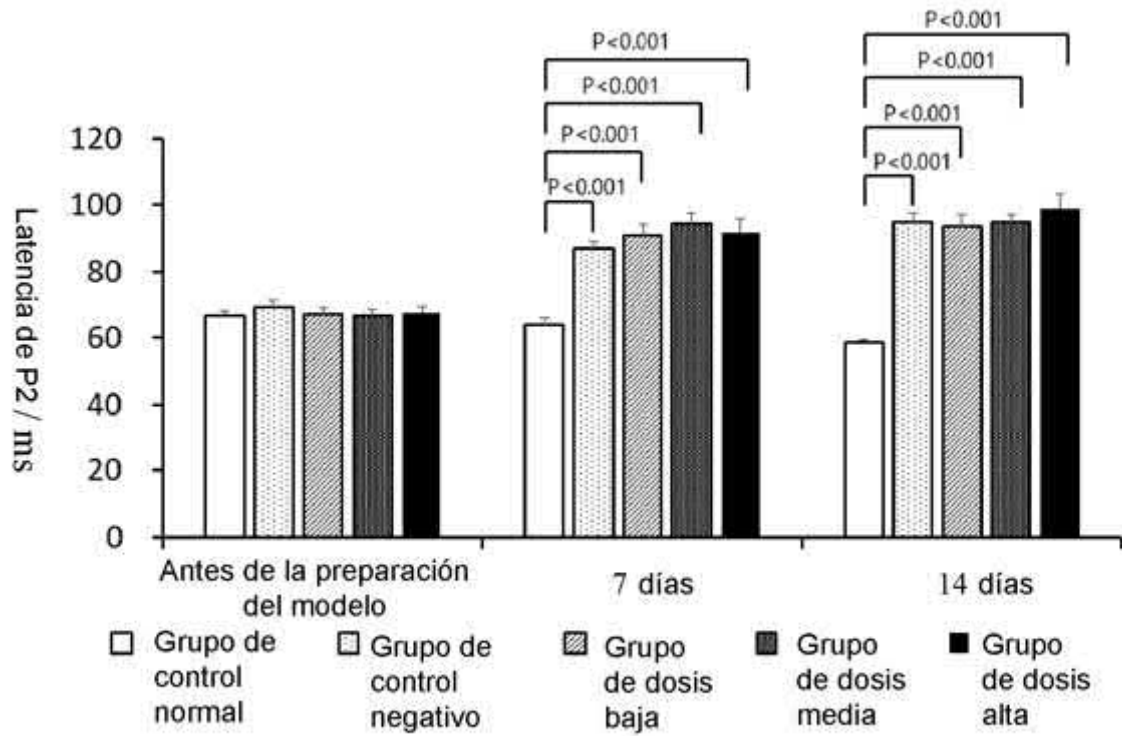


Fig. 16

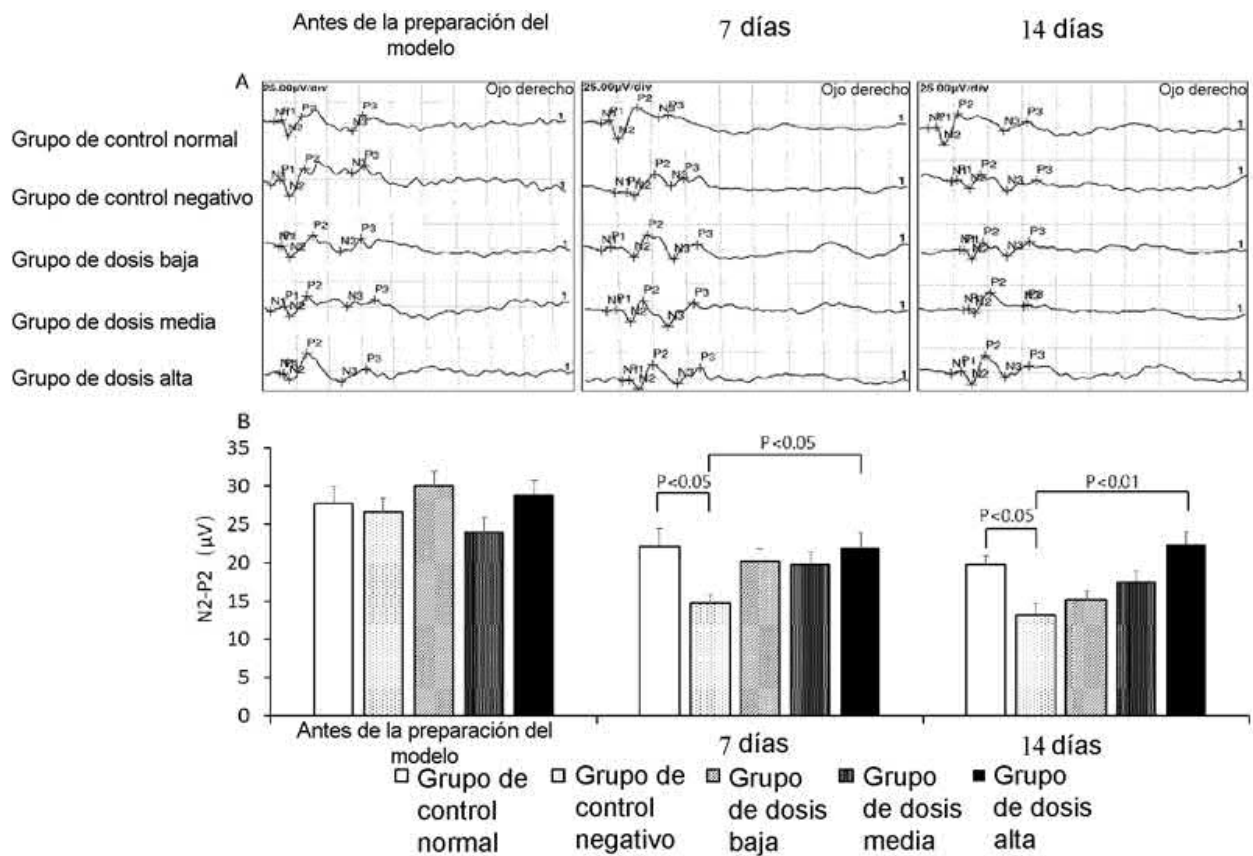


Fig. 17

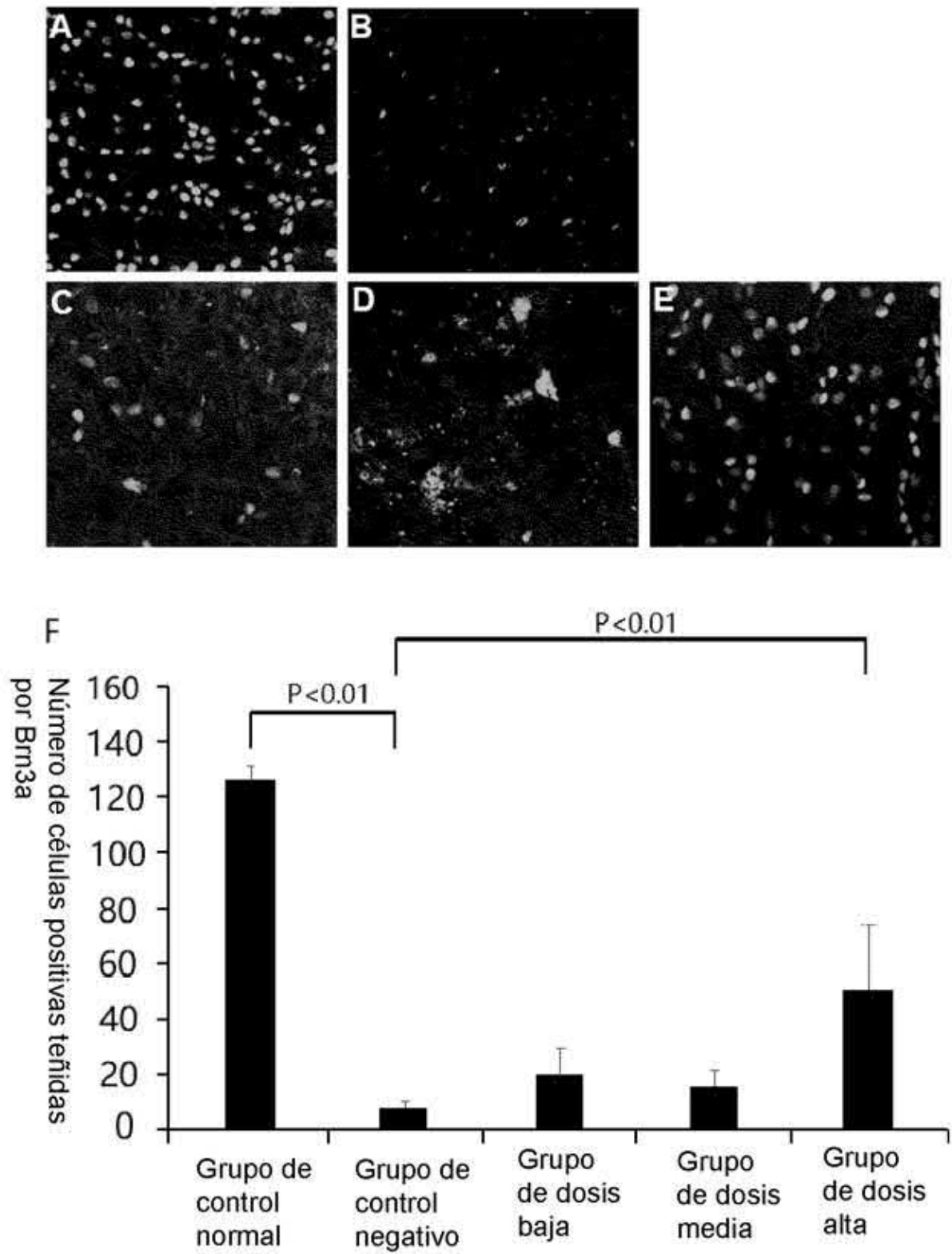


Fig. 18

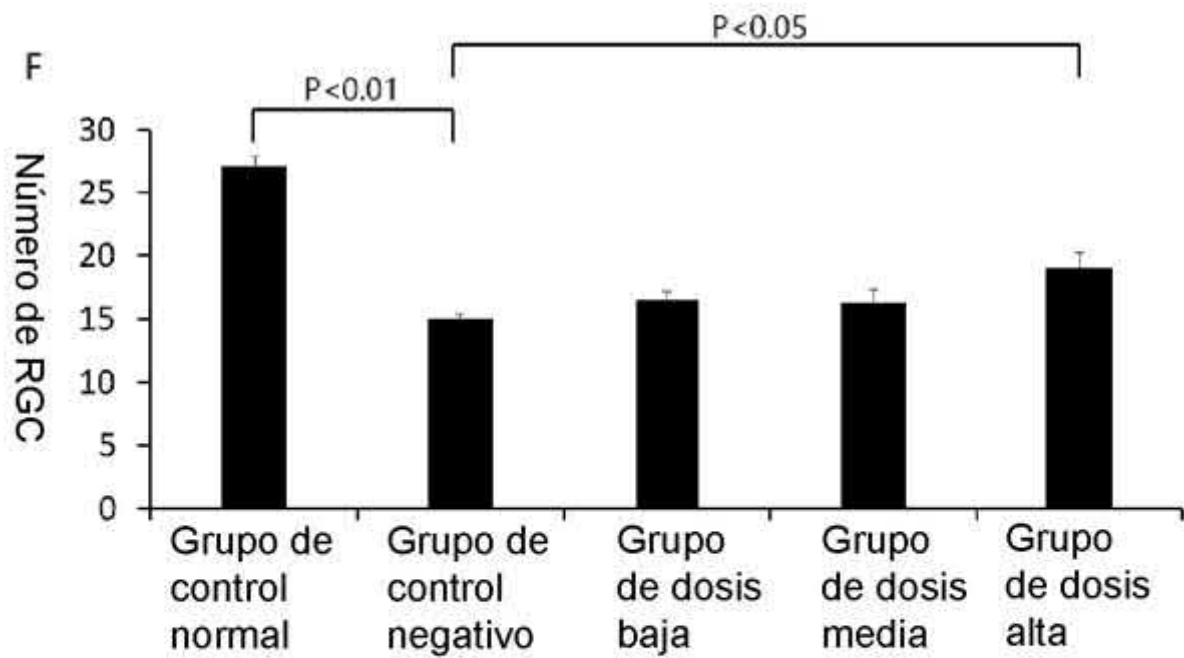
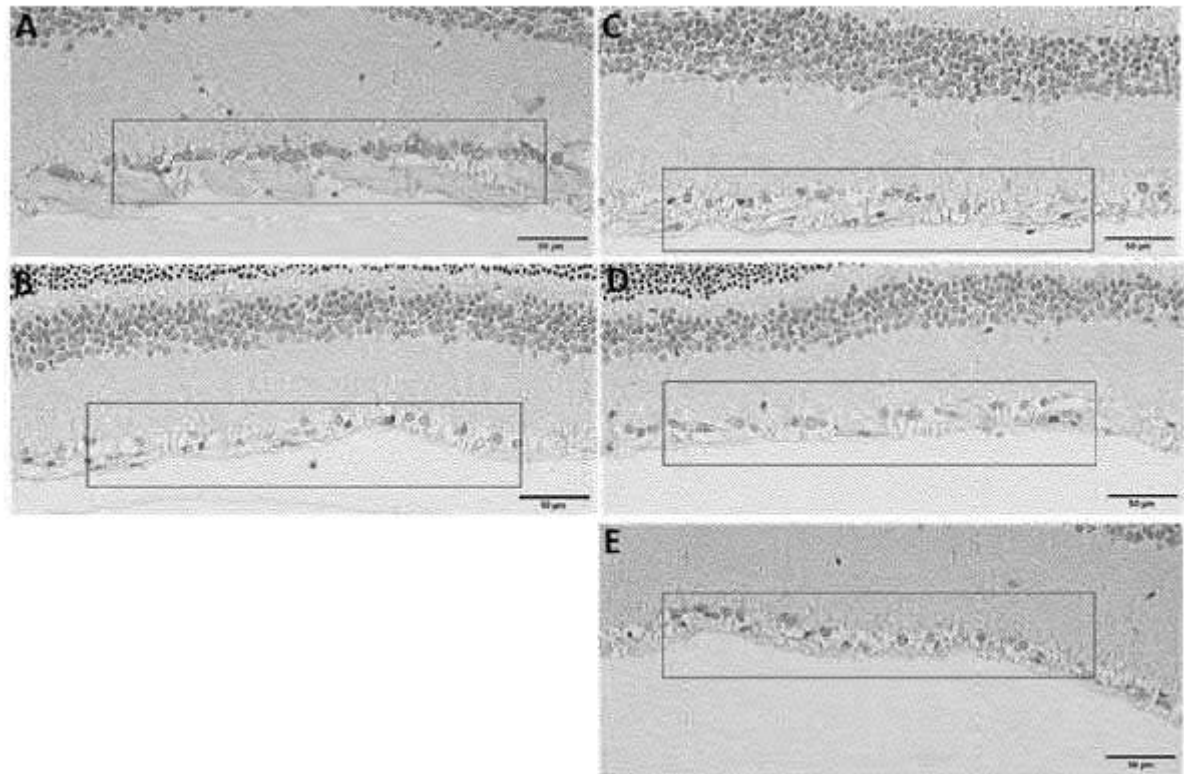


Fig. 19

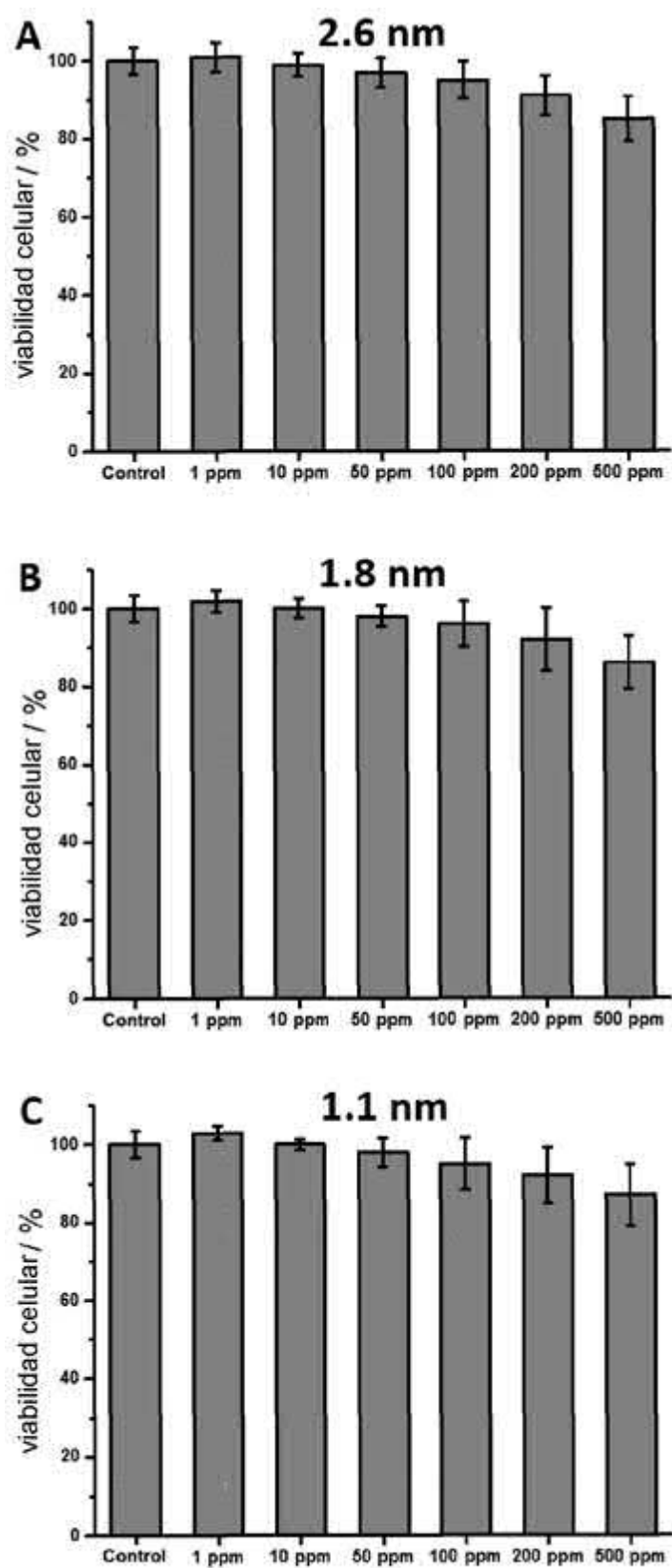


Fig. 20