

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 274**

51 Int. Cl.:

A61K 47/04 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 41/00 (2010.01)

A61K 31/194 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2015 PCT/KR2015/003385**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15152688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2015 E 15774194 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3130353**

54 Título: **Composición farmacéutica basada en nanoestructura de grafeno para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

04.04.2014 KR 20140040400

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2021

73 Titular/es:

**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB
FOUNDATION (50.0%)
(Sillim-dong) 1, Gwanak-ro Gwanak-gu
Seoul 151-015, KR y
THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HONG, BYUNG HEE;
YOO, JE MIN;
KO, HANSEOK y
KIM, DONGHOON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 814 274 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

Composición farmacéutica basada en nanoestructura de grafeno para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la composición farmacéutica puntos cuánticos de grafeno como principio activo.

10

Antecedentes

Se ha sabido que el plegamiento incorrecto de las proteínas hace que las proteínas normales pierdan su función y que las proteínas anormales se acumulen en las células y produzcan toxicidad y, de esta manera, provocan diversas enfermedades tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, enfermedad de Lou Gehrig, cáncer, fibrosis quística y diabetes tipo II. Esto es, el mal funcionamiento de la proteostasis provoca un plegamiento incorrecto de las proteínas y su acumulación anormal intracelular.

15

Aún no se han encontrado todas las causas de las enfermedades neurodegenerativas, pero es bien sabido que la agregación de proteínas neuronales es una causa principal. Las proteínas fibriladas se transmiten gradualmente a las neuronas adyacentes y finalmente necrosan todas las neuronas en una parte específica del cerebro, de tal manera que la parte específica no pueda realizar sus funciones. En cuanto a la enfermedad de Parkinson, la enfermedad progresa mientras las neuronas que producen un neurotransmisor llamado dopamina se necrosan gradualmente. Sinemet es ahora el fármaco más común recetado a pacientes con enfermedad de Parkinson, y Sinemet y otros fármacos para la enfermedad de Parkinson no funcionan para tratar o retrasar fundamentalmente la enfermedad, sino que suministran levodopa (L-DOPA) que se convierte en dopamina en las neuronas para reducir temporalmente los síntomas. Al final, a medida que la enfermedad continúa progresando, el efecto de los fármacos disminuye, lo que provoca la muerte.

20

25

30

Como uno de los compuestos anti-amiloides investigados relacionados con el plegamiento incorrecto de proteínas, el rojo Congo tiene el efecto de inhibir la formación de fibrillas causada por el plegamiento incorrecto de las proteínas, pero es altamente tóxico para el cuerpo y no puede funcionar inhibiendo la transición de proteínas plegadas incorrectamente y, por lo tanto, retrasa el progreso de una enfermedad. Además, un fármaco convencional se formula en una forma específica con un tamaño uniforme y, por lo tanto, no tiene ninguna ventaja particular en el tratamiento de una enfermedad en términos de entropía.

35

En consecuencia, se han llevado a cabo muchos estudios para tratar el plegamiento incorrecto de proteínas (publicación de patente coreana abierta n.º 10-2009-0019790), pero no ha habido grandes logros acerca de un fármaco que no sea tóxico para el cuerpo pero que tenga una excelente actividad inhibidora. Li y col. desvelan en *Advanced Materials*, 2012, 24, 1722-1728 el uso de óxido de grafeno de alta absorbancia del infrarrojo cercano para el tratamiento fototérmico de la enfermedad de Alzheimer. Mahmoudi y col. (*Nanoscale*, 2012, 4(23), 7322-5) desvela el uso de láminas de óxido de grafeno recubiertas de proteína para retrasar la fibrilación de AβF mediante la adsorción de monómeros amiloides.

40

45

Divulgación de la invención

Problemas a resolver mediante la invención

En consecuencia, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la composición farmacéutica puntos cuánticos de grafeno como principio activo.

50

Sin embargo, Los problemas a resolver por la presente divulgación no se limitan a los problemas descritos anteriormente. Aunque no se describen en el presente documento, los expertos en la materia pueden entender claramente otros problemas a resolver mediante la presente divulgación a partir de las siguientes descripciones.

55

Medios para resolver los problemas

De acuerdo con un primer aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la composición farmacéutica puntos cuánticos de grafeno como principio activo.

60

Efectos de la invención

De acuerdo con las realizaciones ejemplares de la presente divulgación, la composición farmacéutica para su uso en

65

la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la composición farmacéutica puntos cuánticos de grafeno como principio activo, es el primer intento de usar puntos cuánticos de grafeno para prevenir y tratar enfermedades neurodegenerativas. Los puntos cuánticos de grafeno no son tóxicos para el cuerpo y no se acumulan en el cuerpo, pero tienen un efecto excelente tal como inhibir la formación de fibrillas provocada por el plegamiento incorrecto de las proteínas al 80 % y es eficaz inhibiendo la transición de proteínas plegadas incorrectamente y, por lo tanto, retrasa el progreso de una enfermedad. Además, a diferencia del fármaco convencional, los puntos cuánticos de grafeno no se limitan a una forma específica y los puntos cuánticos de grafeno son diferentes entre sí en peso molecular, fórmula molecular y forma, que inhibe la formación de cristales en términos de entropía y, de esta manera, es posible tratar fundamentalmente una enfermedad. Adicionalmente, los puntos cuánticos de grafeno exhiben fluorescencia en un intervalo UV-vis, y es posible rastrear el movimiento de los puntos cuánticos de grafeno para que actúen como un fármaco en el cuerpo regulando adecuadamente la intensidad de la fluorescencia. También, es posible rastrear una proteína neuronal uniendo un material que se dirige a la proteína neuronal a grupos funcionales terminales de los puntos cuánticos de grafeno. Como tal, los puntos cuánticos de grafeno pueden inducirse a un lugar cerca de la proteína neuronal y luego puede irradiarse un láser de infrarrojo lejano menos dañino para una célula, de modo que la fibrilación y la agregación pueden inhibirse por un efecto fototérmico de los puntos cuánticos de grafeno.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 muestra imágenes TEM y AFM de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 2 es un gráfico que muestra el resultado del análisis PL en puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 3 es un gráfico que muestra el resultado del análisis FT-IR sobre puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 4 es un gráfico que muestra el resultado de la medición del potencial Zeta en puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 5 muestra un efecto inhibidor de la fibrilación de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 6A y la FIGURA 6B proporcionan (A) imágenes y (B) gráficos que muestran el resultado del análisis de la tasa de supervivencia de una neurona afectada por puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 7A y la FIGURA 7B proporcionan (A) imágenes y (B) gráficos que muestran el resultado del análisis de tinción con 8-OHG que muestra una actividad inhibidora de generación de especies de oxígeno reactivo de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 8A y la FIGURA 8B proporciona (A) diagramas esquemáticos de una prueba para confirmar la inhibición de la transición a-sin de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación y (B) imágenes que muestran el resultado de la misma.
 La FIGURA 9 muestra el resultado del análisis TEM de la inhibición de la fibrilación de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 10 muestra el resultado del análisis AFM de la inhibición de la fibrilación de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 11A y la FIGURA 11B muestran el resultado del análisis TEM de alta resolución de la inhibición de la fibrilación de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 12 muestra el resultado del análisis BN-PAGE en PFF después de la inyección de puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 13 proporciona imágenes que muestran características luminiscentes de puntos cuánticos de grafeno y Rojo Congo de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 14 es un gráfico que muestra las características fototérmicas de los puntos cuánticos de grafeno de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 15 muestra los espectros FT-IR de muestras preparadas de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.
 La FIGURA 16 muestra el resultado de la medición de fluorescencia en muestras preparadas de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación.

Modo para realizar la invención

En lo sucesivo en el presente documento, las realizaciones y ejemplos de la presente divulgación se describirán en detalle con referencia a los dibujos adjuntos, de modo que los expertos en la materia puedan implementar fácilmente la presente divulgación.

Sin embargo, cabe señalar que la presente divulgación no se limita a las realizaciones y ejemplos, sino que puede realizarse de diversas otras formas. En los dibujos, las partes irrelevantes para la descripción se omiten para simplificar la explicación, y los números de referencia similares indican partes similares en todo el documento.

A lo largo de todo el documento, el término "en" que se usa para designar una posición de un elemento con respecto

a otro elemento incluye tanto el caso de que un elemento sea adyacente al otro elemento como el caso de que exista cualquier otro elemento entre estos dos elementos.

5 Además, a lo largo de todo el documento, la frase "comprende o incluye" y/o "que comprende o que incluye" usada en el documento significa que uno o más de otros componentes, etapas, funcionamiento y/o existencia o adición de elementos no se excluyen además de los componentes, etapas, funcionamiento y/o elementos descritos a menos que el contexto indique lo contrario. A lo largo de todo el documento, la rase "aproximado o aproximadamente" o "sustancialmente" tiene la intención de tener significados cercanos a los valores numéricos o intervalos especificados con un error permisible y la intención de evitar que los valores numéricos exactos o absolutos revelados para la comprensión de la presente divulgación sean utilizados ilegal o injustamente por cualquier tercero inconsciente. A lo largo de todo el documento, la frase "etapa de" no significa "etapa para".

15 A lo largo de todo el documento, la frase "combinación de" incluida en la descripción del tipo Markush significa mezcla o combinación de uno o más componentes, etapas, funcionamientos y/o elementos seleccionados de un grupo que consiste en componentes, etapas, funcionamientos y/o elementos descritos en el tipo Markush y por lo tanto significa que la divulgación incluye uno o más componentes, etapas, funcionamientos y/o elementos seleccionados del grupo Markush.

20 A lo largo de todo el documento, la frase "puntos cuánticos de grafeno (GQD, por sus siglas en inglés)" se refiere a fragmentos nanométricos de óxidos de grafeno u óxidos de grafeno reducidos.

25 A lo largo de todo el documento, el término "grafeno" se refiere a un material que forma una molécula aromática policíclica con múltiples átomos de carbono unidos covalentemente entre sí. Los átomos de carbono unidos covalentemente forman un anillo de seis miembros como una unidad repetitiva, pero puede incluir además un anillo de cinco miembros y/o un anillo de siete miembros.

30 A lo largo de todo el documento, la frase "óxido de grafeno" puede abreviarse como "GO" y puede incluir una estructura en la que un grupo funcional que contiene oxígeno, tales como un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo o un grupo epoxi está unido al grafeno, pero puede no limitarse a ello.

35 A lo largo de todo el documento, la frase "óxido de grafeno reducido" se refiere al óxido de grafeno disminuido en un porcentaje de oxígeno a través de un proceso de reducción y puede abreviarse como "rGO", pero puede no limitarse a ello.

En lo sucesivo en el presente documento, las realizaciones ejemplares de la presente divulgación se describirán en detalle, pero la presente divulgación puede no limitarse a ellas.

40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la composición farmacéutica puntos cuánticos de grafeno como principio activo.

45 De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede incluir además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, pero puede no limitarse a ello. El vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable no está limitado siempre que pueda usarse en una composición farmacéutica y puede incluir un miembro seleccionado del grupo que consiste en, por ejemplo, vaselina, lanolina, polietilenglicol, alcohol y combinaciones de los mismos, pero puede no limitarse a ello.

50 De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, las enfermedades neurodegenerativas son relevantes para el plegamiento incorrecto de proteínas, y pueden incluir un miembro seleccionado del grupo que consiste en, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, demencia por VIH, ictus, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica secundaria, diabetes tipo II, amiloidosis amiotrófica, amiloidosis relacionada con hemodiálisis, encefalopatía espongiiforme transmisible y esclerosis múltiple, pero puede no limitarse a ello.

55 De acuerdo con la invención, la nanoestructura del grafeno incluye puntos cuánticos de grafeno.

60 Los puntos cuánticos de grafeno tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm. Por ejemplo, los puntos cuánticos de grafeno pueden tener un tamaño en el intervalo de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 20 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 20 nm, de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 20 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 15 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 5 nm.

65 De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, los puntos cuánticos de grafeno pueden inhibir la formación de fibrillas provocada por el plegamiento incorrecto de proteínas y también inhibir la transición de proteínas plegadas incorrectamente, pero puede no limitarse a ello.

De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, los puntos cuánticos de grafeno no se acumulan en el cuerpo y no son tóxicos para el cuerpo.

5 De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, los puntos cuánticos de grafeno pueden inhibir la generación de especies reactivas de oxígeno en las neuronas a través de un mecanismo que inhibe la disfunción mitocondrial provocada por proteínas fibriladas, pero puede no limitarse a ello.

10 De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, la composición farmacéutica puede incluir un material dirigido a una proteína neuronal, por ejemplo, Rojo Congo como material anti-amiloide o tioflavina T o S como colorante de detección de amiloide, que está unido a un grupo funcional terminal de los puntos cuánticos de grafeno, pero puede no limitarse a ello.

15 El grupo funcional de acuerdo con la presente divulgación puede incluir átomos de oxígeno y puede ser -OH, -COOH o -C=O, pero puede no limitarse a ello.

De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, los puntos cuánticos de grafeno pueden mostrar un efecto fototérmico tras la irradiación de un láser de infrarrojo lejano, pero puede no limitarse a ello.

20 De acuerdo con una realización ejemplar de la presente divulgación, la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene la ventaja de ser capaz de rastrear una proteína neuronal uniendo un material dirigido a la proteína neuronal a grupos funcionales terminales de los puntos cuánticos de grafeno. Como tal, los puntos cuánticos de grafeno pueden inducirse a un lugar cerca de la proteína neuronal y luego puede irradiarse un láser de infrarrojo lejano menos dañino para una célula, de modo que la fibrilación y la agregación pueden inhibirse por un efecto fototérmico de los puntos cuánticos de grafeno.

25 Modo para realizar la invención

En lo sucesivo en el presente documento, los ejemplos de la presente divulgación se describirán con más detalle, pero el alcance de la presente divulgación no se limita a los mismos.

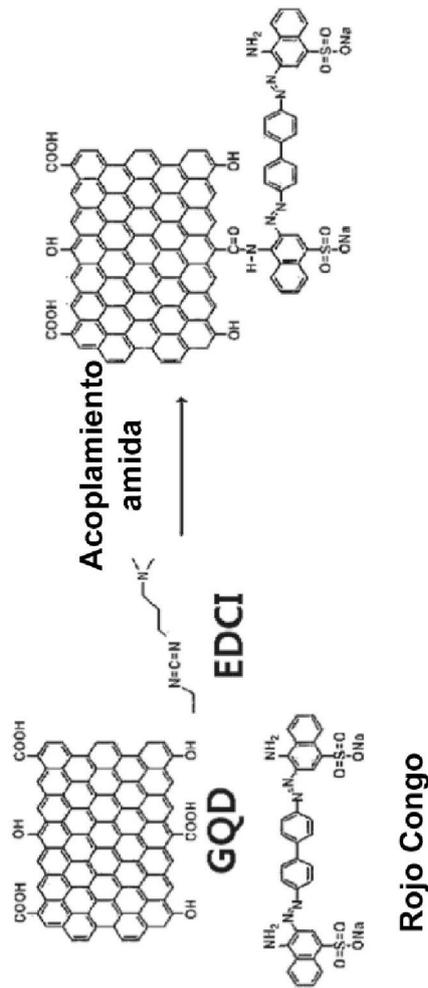
30 [Ejemplos]

Ejemplo de preparación 1

35 Los GQD se prepararon con referencia al artículo desvelado en Nano Letters 2012 [Nano Lett, 12, 844-849 (2012)]. Se puso una fibra de carbono en una solución que incluía una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico en una relación de 3:1 y después se calentó a 80 °C durante 24 horas (proceso de termooxidación). Después de completarse la reacción, el producto se purificó mediante diálisis y filtración al vacío y finalmente se obtuvieron los GQD en forma de polvo usando un Rotovap. Los GQD preparados eran partículas con tamaños estructuralmente diversos (de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 20 nm) (FIGURA 1). Los GQD preparados tenían otras características tales como exhibir fluorescencia bajo una lámpara UV (Emisión: 490 nm y 550 nm) (espectrómetro de fluorescencia JASCO FP-8300) (FIGURA 2) y que muestra un efecto fototérmico tras la irradiación de láser NIR de 808 nm. De acuerdo con el espectro FT-IR (espectrómetro Thermo Scientific Nicolet iS 10 FT-IR), se observó un grupo carboxilo (-COOH) en un terminal de GQD a 1724 cm^{-1} y se observó un pico aromático C=C a 1614 cm^{-1} (FIGURA 3). Una carga superficial analizada a partir del potencial Zeta (Malvern Zetasizer Nano ZS) se mostró como aproximadamente -20 mV (FIGURA 4).

Ejemplo de preparación 2

50 Se preparó un material en el que el Rojo Congo como material dirigido a una proteína neuronal se unió a un grupo funcional terminal de la nanoestructura de grafeno preparada (GQD) mediante una reacción como se muestra en la siguiente Fórmula de Reacción. Las muestras 1, 2 y 3 se prepararon aplicando diferentes cantidades de rojo Congo (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), respectivamente:



Ejemplo de Prueba 1

5 Se determinó un efecto de inhibición de la fibrilación de un punto cuántico de grafeno usando PFF (fibrillas preformadas) como modelo de prueba de alfa-sinucleína. Específicamente, las fibrillas se formaron aproximadamente una semana después de la inyección de los PFF en las neuronas y finalmente provocaron la necrosis de las neuronas. La fibrilación provoca la fosforilación de la alfa-sinucleína y puede reconocerse mediante tinción como se muestra en la FIGURA 5. Se observó que las p-a-sin (alfa-sinucleína fosforilada) eran densas en respuesta a la inyección de PFF (1 µg/ml) solamente, pero tras la inyección de GQD (1 µg/ml), las p-a-sin (alfa-sinucleína fosforilada) casi desaparecieron al nivel en el que no se inyectó nada (FIGURA 5). Como puede verse a partir de la FIGURA 5, las p-a-sin se redujeron a aproximadamente el 80 %, lo que prácticamente se puede considerar que la fibrilación está inhibida casi por completo. Además, la tasa de supervivencia de las neuronas aumenta en aproximadamente un 20 % (FIGURA 6B). La tasa de supervivencia de las neuronas (analizada mediante detección TUNEL) en el caso de inyectar solo GQD fue más alta que en un caso en el que solo se inyectó medio PBS y, de esta manera, se confirmó que los GQD no eran tóxicos para las neuronas (FIGURA 6A y FIGURA 6B). Las imágenes de la izquierda de la FIGURA 6A muestra la detección TUNNEL en donde una célula dañada se tiñe de rojo, las imágenes del medio muestran tinción DAPI en donde el ADN en un núcleo celular se tiñe de azul y las imágenes de la derecha muestran la cuantificación del mismo.

20 En una prueba de si los puntos cuánticos de grafeno usados en el presente documento pueden inhibir la generación de especies reactivas de oxígeno en las neuronas a través de un mecanismo que inhibe la disfunción mitocondrial provocada por proteínas fibriladas, las neuronas primariamente cultivadas se tiñeron con 8-OHG (8-oxo-2'-desoxiguanosina como producto principal de la oxidación del ADN) y después se analizaron (FIGURA 7A). Como puede verse a partir de la FIGURA 7A, se observó que la cantidad de 8-OHG generada por la influencia de especies reactivas de oxígeno disminuyó notablemente por la adición de puntos cuánticos de grafeno. Se confirmó una prueba de disfunción mitocondrial mediante una frecuencia respiratoria basal y una frecuencia respiratoria máxima de una célula y un ensayo de actividad del Complejo I mitocondrial (FIGURA 7B). Como se muestra en el gráfico de la FIGURA 7B, se observó que cuando solo se inyectaban PFF en las neuronas, una frecuencia respiratoria de las mitocondrias disminuyó notablemente y la actividad del Complejo I también disminuyó, y cuando se inyectaron GQD y PFF en las neuronas, la frecuencia respiratoria se recuperó a un nivel normal. El resultado del análisis de la disfunción mitocondrial

mediante esta prueba se considera importante ya que corresponde a la tasa de supervivencia neuronal mostrada en la FIGURA 6B.

Ejemplo de Prueba 2

5 Es importante simplemente inhibir la fibrilación y aumentar la tasa de supervivencia de las neuronas, pero es muy importante inhibir la transición a neuronas adyacentes para tratar enfermedades neurodegenerativas y ralentizar el progreso de la enfermedad neurodegenerativa. Para confirmar este hecho, se instaló un dispositivo microfluídico y se verificó en qué cámara deben colocarse los GQD para inhibir la transición. La FIGURA 8A proporciona diagramas esquemáticos de la prueba y la FIGURA 8B muestra el resultado de la prueba. En el caso de C1 (Cámara 1), los GQD se inyectaron en neuronas en una primera cámara y en el caso de C2 (Cámara 2), los GQD se inyectaron en neuronas en una segunda cámara y después, se observó la transición de la fibrilación de alfa-sinucleína a neuronas adyacentes. En un grupo de control positivo que incluye solo PFF sin GQD, se observó que una alfa-sinucleína fibrilada se transmitía a las Cámaras 1 a 3. En segundo lugar, en un dispositivo en el que se colocaron GQD en una primera neurona, la fibrilación no estaba bien desarrollada desde el principio y, de esta manera, rara vez se observó fibrilación de alfa-sinucleína en la segunda y tercera neuronas. Finalmente, en un dispositivo en el que se colocaron GQD en una neurona intermedia, la fibrilación se desarrolló hasta cierto punto en la primera cámara, y la cantidad de fibrilación disminuyó notablemente en la segunda neurona donde se incluyeron las GQD, y en la última neurona, se observó que apenas se desarrollaba fibrilación. Se considera que una diferencia en el grado de fibrilación inicial entre este dispositivo y un dispositivo que es el grupo de control positivo que incluye solo PFF sin GQD es un error inherente al dispositivo y causado por la separación incompleta de GQD de cada neurona en el dispositivo.

Ejemplo de Prueba 3

25 Se realizó un muestreo de la misma manera que en un experimento intracelular (se incubaron 1 µg/ml de GQD y 1 µg/ml de PFF a 37 °C y después se tomaron muestras en un sustrato de sílice) y se analizó la inhibición de la fibrilación de las GQD usando un MO (microscopio óptico), y como resultado de ello, cuando solo se incubaron PFF, se observó un gran bulto esperado como un agregado de fibrillas (FIGURA 9A y FIGURA 9B), mientras que cuando se incubaron PFF y GQD, se mostró que los oligómeros de GQD y alfa-sinucleína estaban enredados (FIGURA 9C y FIGURA 9D). En el presente resultado, la cantidad total de alfa-sinucleína y GQD era excesiva y las imágenes no eran lo suficientemente claras para mostrar claramente las estructuras de los mismos, pero se pudo ver que los resultados de las dos muestras eran definitivamente diferentes entre sí.

35 Se realizó un muestreo de la misma manera que el muestreo para análisis de MO y se analizó la inhibición de la fibrilación de GQD mediante un MFA (microscopio de fuerza atómica), y como resultado de ello, cuando solo se incubaron PFF, se observó un cuerpo de Lewy formado por agregación de fibrillas y PFF (FIGURA 10B), mientras que cuando se incubaron PFF y GQD, se mostró que los oligómeros de GQD y alfa-sinucleína estaban enredados (FIGURA 10D).

40 Se realizó un muestreo en una rejilla MET (microscopio electrónico de transmisión) de la misma manera que el muestreo para análisis MO y MFA, y se realizó un análisis utilizando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución. La FIGURA 11A muestra los datos obtenidos al muestrear los PFF solo en la rejilla MET y al realizar un análisis. Como puede verse a partir de las imágenes, se observó un haz de fibrillas muy grueso y largo. Por otra parte, en una muestra en la que también se incluyeron GQD, como se muestra en la imagen MFA, se mostró que los oligómeros de GQD y alfa-sinucleína estaban enredados (FIGURA 11B).

Las imágenes mostradas en la FIGURA 9 a la FIGURA 11 mostraron una marcada diferencia entre la inyección o la no inyección de GQD con PFF, pero estas imágenes se obtuvieron en un estado seco y, por lo tanto, no pudieron mostrar el estado exacto de los PFF después de la inyección de GQD. Para un análisis más detallado, se realizó BN-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida nativa azul), y el resultado de la misma fue sorprendente (FIGURA 12). En la FIGURA 12, La Columna 1 trata sobre un grupo de control negativo en el que solo se incluyen GQD, las Columnas 2 y 4 se refieren a muestras en las que solo se incluyen PFF y las Columnas 3 y 5 se refieren a muestras en las que se incluyen tanto PFF como GQD, y como resultado de la inserción del gel, pudo verse que cuando se inyectaron GQD, se detectó una banda fuerte en un área correspondiente a los monómeros de alfa-sinucleína (14,46 kDa). Estos son datos muy importantes que muestran que cuando se añaden GQD a PFF, la fibrilación de PFF puede inhibirse y los PFF se devuelven a los monómeros.

Ejemplo de Prueba 4

60 Los GQD preparados en el Ejemplo de Preparación 1 y una solución de Rojo Congo (grupo control) se irradiaron con rayos infrarrojos y se fotografió la fluorescencia en la oscuridad, y el resultado de la misma fue como se muestra en la FIGURA 13.

65 Además, la FIGURA 14 muestra que cuando se irradió un láser NIR, los GQD mostraron un efecto fototérmico más alto que el Rojo Congo o el agua destilada y su temperatura aumentó dependiendo de la concentración de GQD (500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml) a medida que aumentaba la concentración de los GQD.

Ejemplo de Prueba 5

5 Se realizó un análisis FT-IR y una medición de fluorescencia usando diversas muestras (GQD, Muestra 1, Muestra 2 y Muestra 3 preparadas en los Ejemplos de Preparación 1 y 2 y una solución de Rojo Congo como ejemplo comparativo).

10 Refiriéndose a la FIGURA 15 que muestra espectros FT-IR, en un pico -NH_2 3419 cm^{-1} de Rojo Congo, el pico disminuyó a medida que aumentaba la concentración de rojo Congo, e incluso en un pico del grupo carboxilo (-COOH) 1710 cm^{-1} de una terminal de GQD, el pico disminuyó a medida que aumentaba la concentración de Rojo Congo, y un pico de enlace peptídico (-CONH) 1660 cm^{-1} se formó gradualmente por conjugación de GQD y Rojo Congo, y un pico aromático C=C de 1614 cm^{-1} se mantuvo en todas las muestras como se esperaba.

15 Por otra parte, Se midieron las fluorescencias de las muestras dependiendo de la longitud de onda como se muestra en la FIGURA 16. En el presente documento, se usó Rojo Congo como grupo control y la Muestra 1 mostró el pico de fluorescencia más alto.

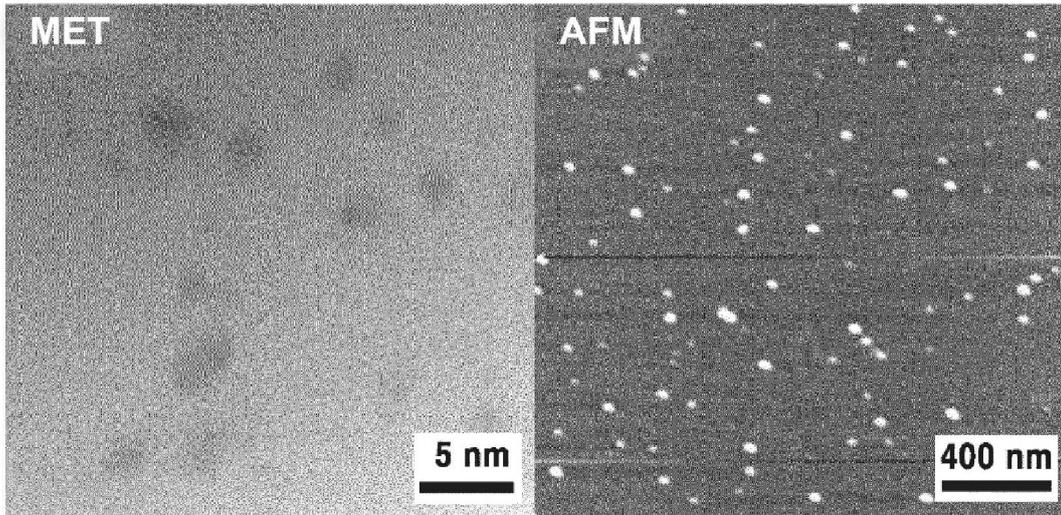
20 La descripción anterior de la presente divulgación se proporciona con el propósito de ilustración, y los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones sin cambiar la concepción técnica y las características esenciales de la presente divulgación. De esta manera, está claro que los ejemplos descritos anteriormente son ilustrativos en todos los aspectos y no limitan la presente divulgación. Por ejemplo, cada componente descrito como de un solo tipo puede implementarse de manera distribuida. Igualmente, los componentes descritos para distribuirse pueden implementarse de manera combinada.

25 El alcance de la presente divulgación se define mediante las siguientes reivindicaciones en lugar de la descripción detallada de la realización. Deberá entenderse que todas las modificaciones y realizaciones concebidas a partir del significado y alcance de las reivindicaciones están incluidas en el alcance de la presente divulgación.

REIVINDICACIONES

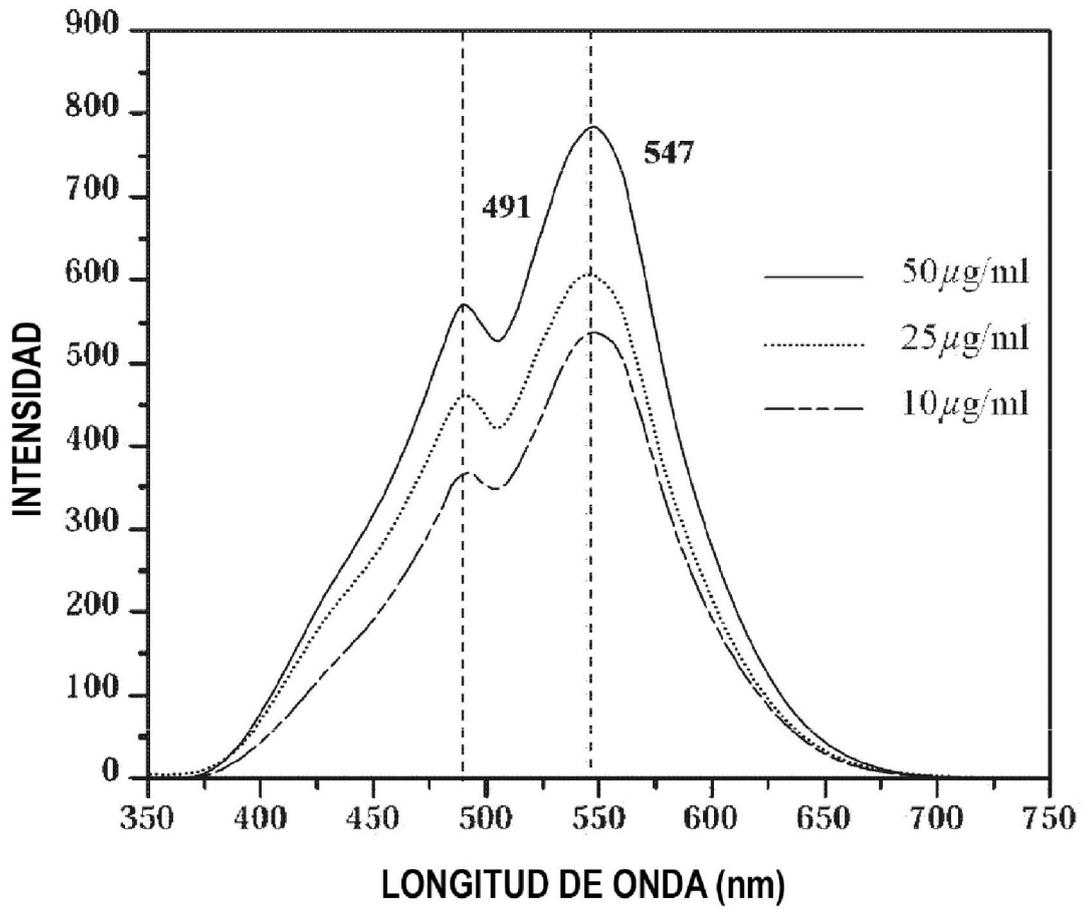
- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, que comprende puntos cuánticos de grafeno como principio activo, en donde los puntos cuánticos de grafeno tienen un tamaño en el intervalo de 1 nm a 20 nm.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 1, que comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 1, en donde las enfermedades neurodegenerativas incluyen un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington, demencia por VIH, ictus, amiloidosis sistémica senil, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica secundaria, diabetes tipo II, amiloidosis amiotrófica, amiloidosis relacionada con hemodiálisis, encefalopatía espongiforme transmisible y esclerosis múltiple.
- 20 4. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 2, en donde el vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable incluye un miembro seleccionado del grupo que consiste en vaselina, lanolina, polietilenglicol, alcohol y combinaciones de los mismos.
- 25 5. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 1, en donde los puntos cuánticos de grafeno inhiben la formación de fibrillas provocada por el plegamiento incorrecto de las proteínas.
- 30 6. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 1, en donde los puntos cuánticos de grafeno inhiben la transición de proteínas mal plegadas.
- 35 7. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 1, en donde los puntos cuánticos de grafeno no se acumulan en el cuerpo.
- 40 8. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 1, en donde un grupo funcional terminal de los puntos cuánticos de grafeno está unido a un material que se dirige a una proteína neuronal.
9. La composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la reivindicación 1, en donde los puntos cuánticos de grafeno muestran un efecto fototérmico tras la irradiación de un láser de infrarrojo lejano.

FIG. 1



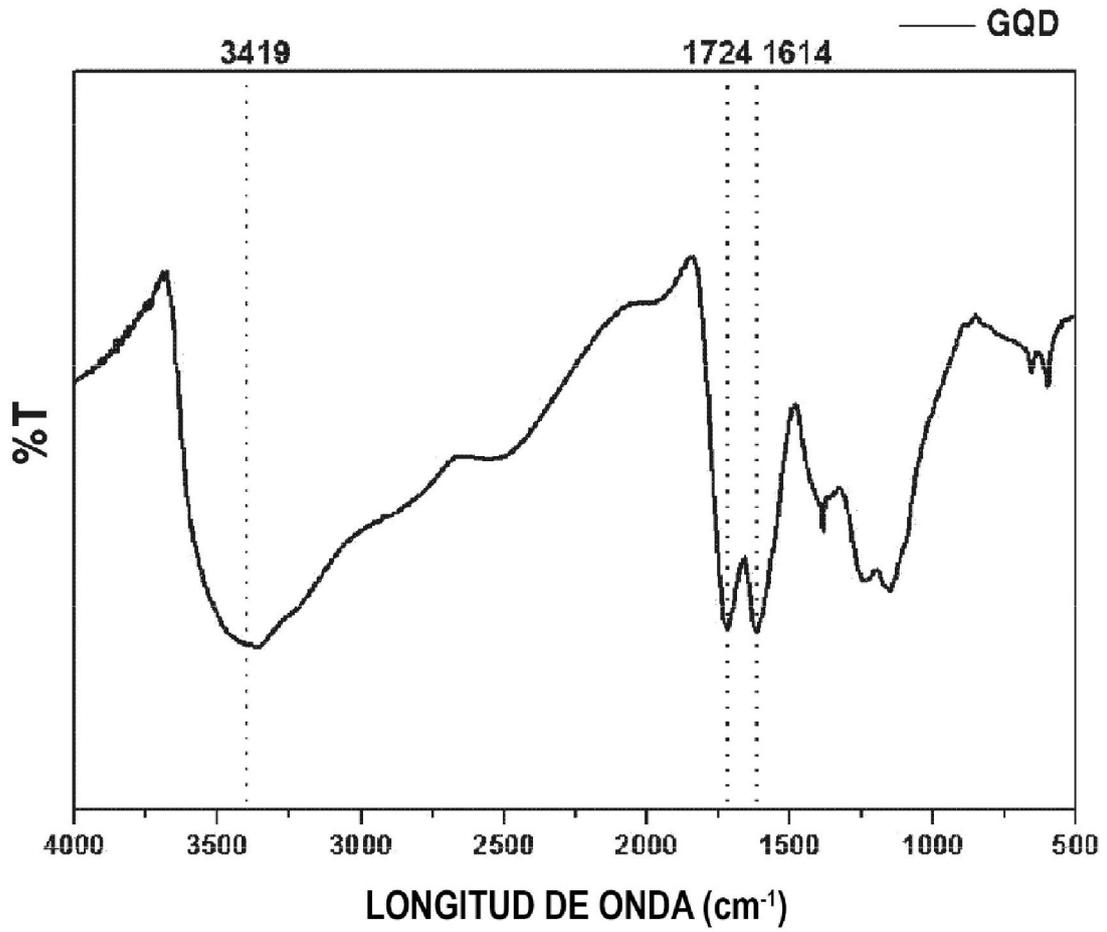
TAMAÑO LATERAL PROMEDIO \cong 3~5 nm , ALTURA PROMEDIO \cong 5~15 nm

FIG. 2



PL: FOTOLUMINISCENCIA DÉBIL (INTERMEDIA) A 491 Y 547 NM

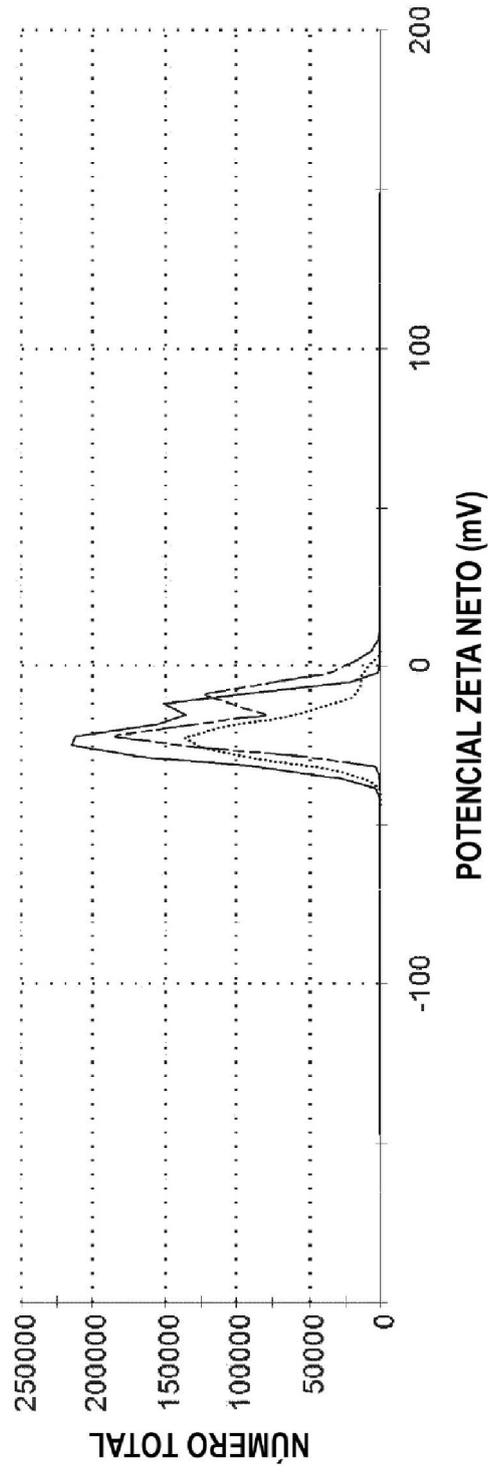
FIG. 3



FT-IR: 1724 cm⁻¹: GRUPO CARBOXILATO
1614 cm⁻¹: PICO AROMÁTICO C=C

FIG. 4

DISTRIBUCIÓN DE POTENCIAL ZETA



----- Registro 50: Grafeno 1 Registro 51: Grafeno 2 — Registro 52: Grafeno 3

POTENCIAL- ζ : PROMEDIO ORIGINADO DEL GRUPO FUNCIONAL CARBOXÍLICO -20 mV

FIG. 5

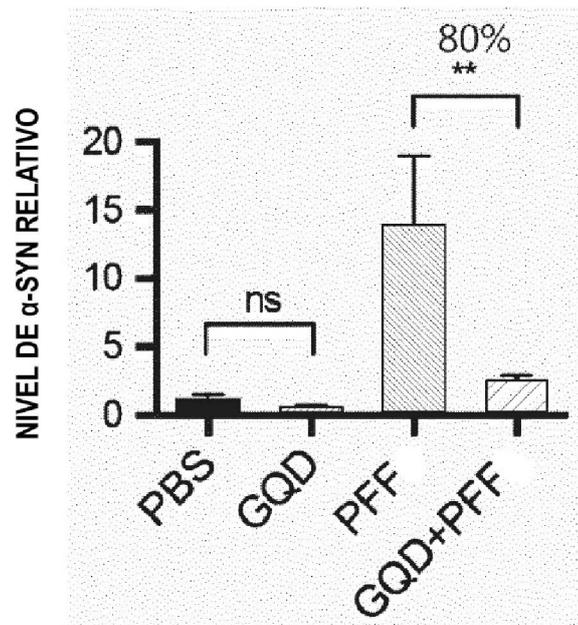
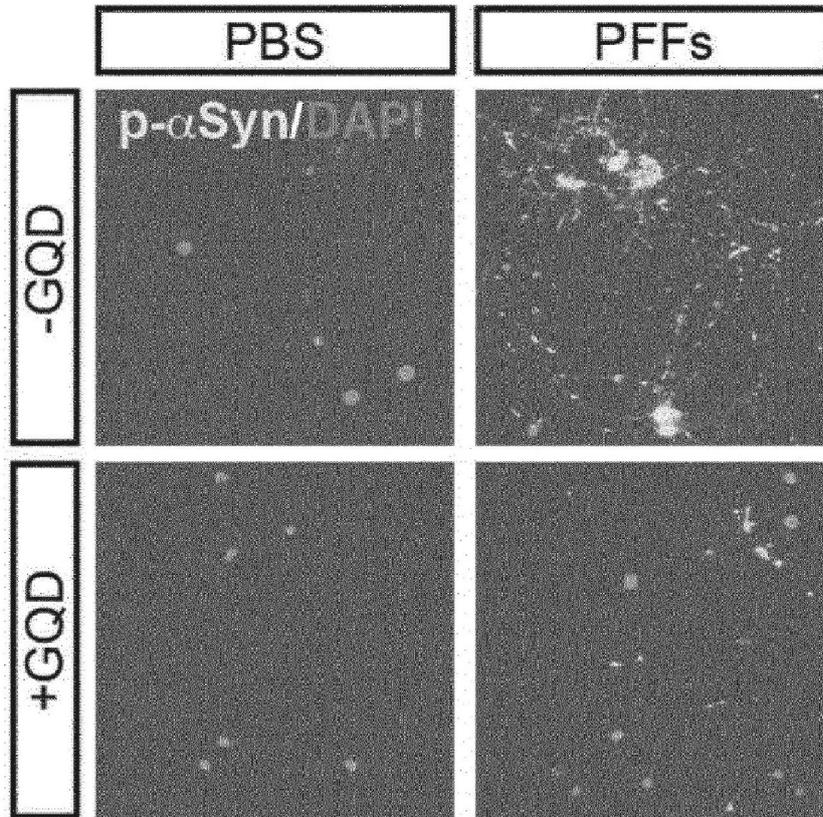


FIG. 6A

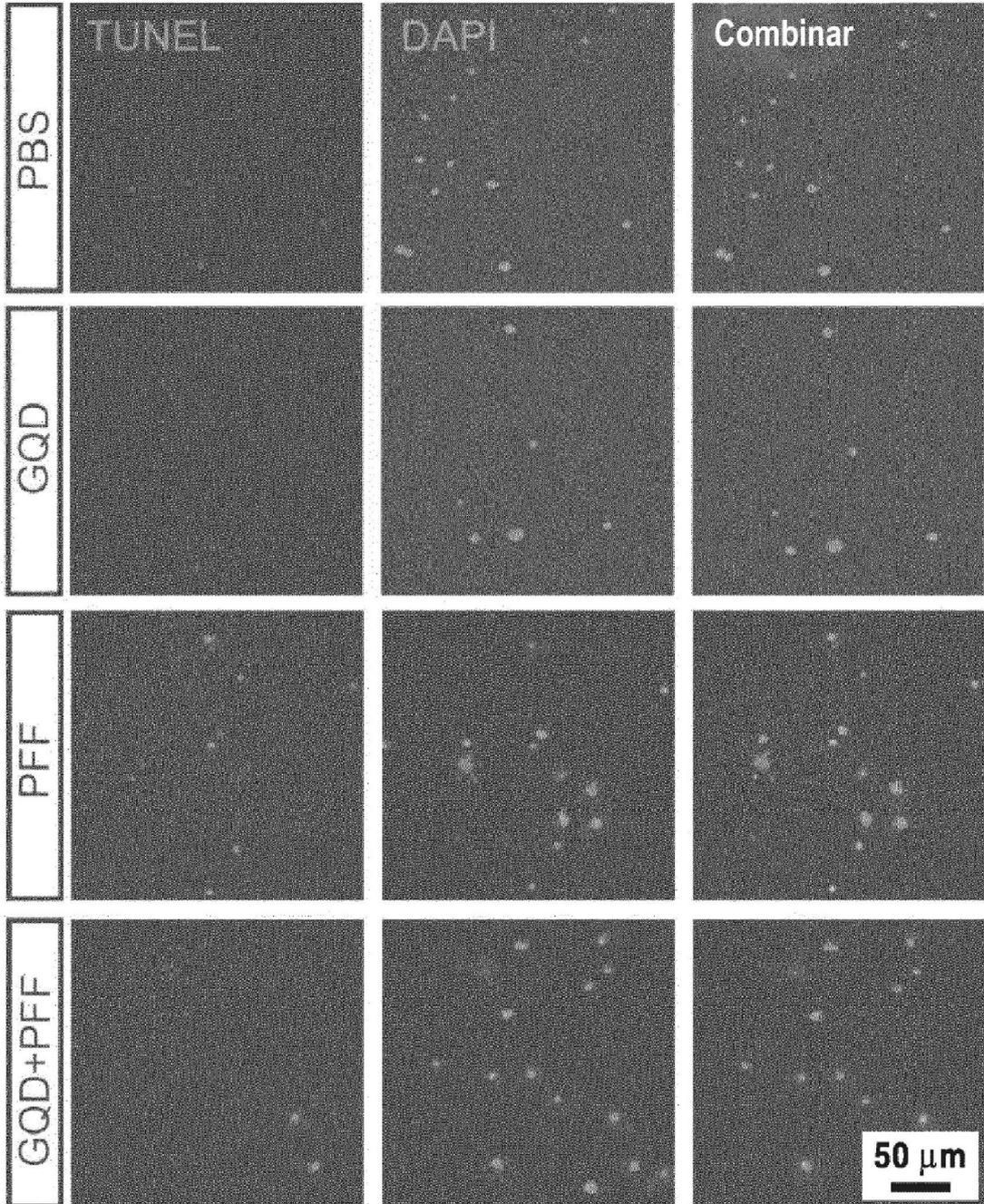


FIG. 6B

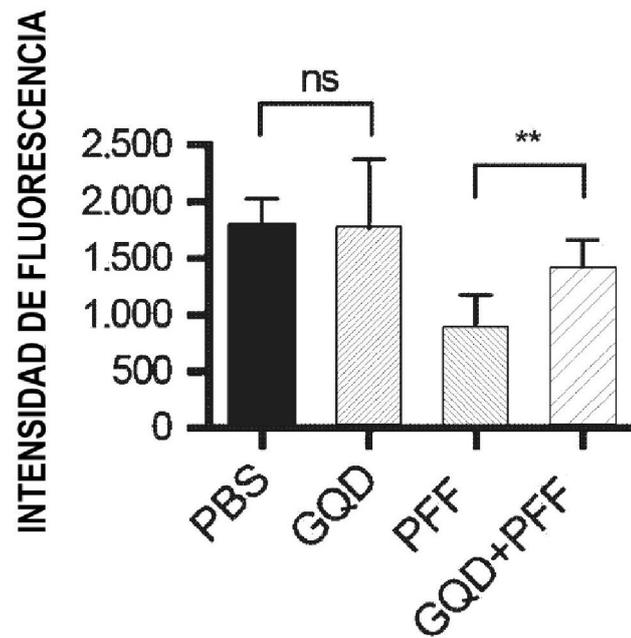
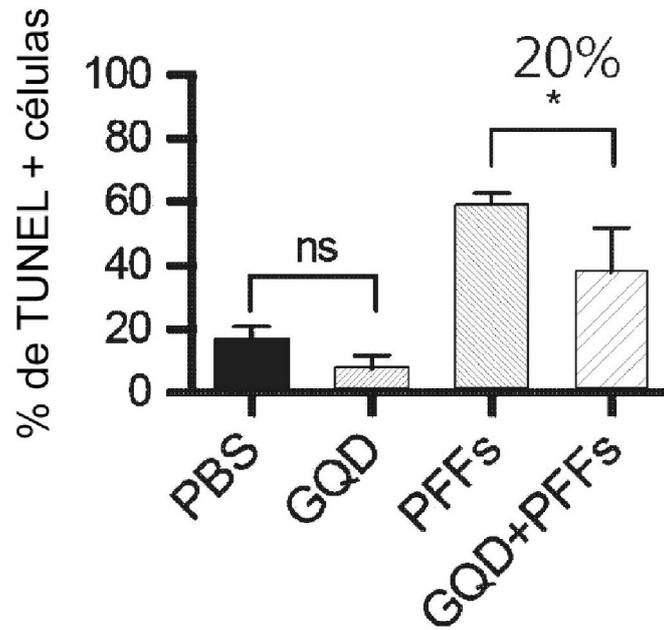


FIG. 7A

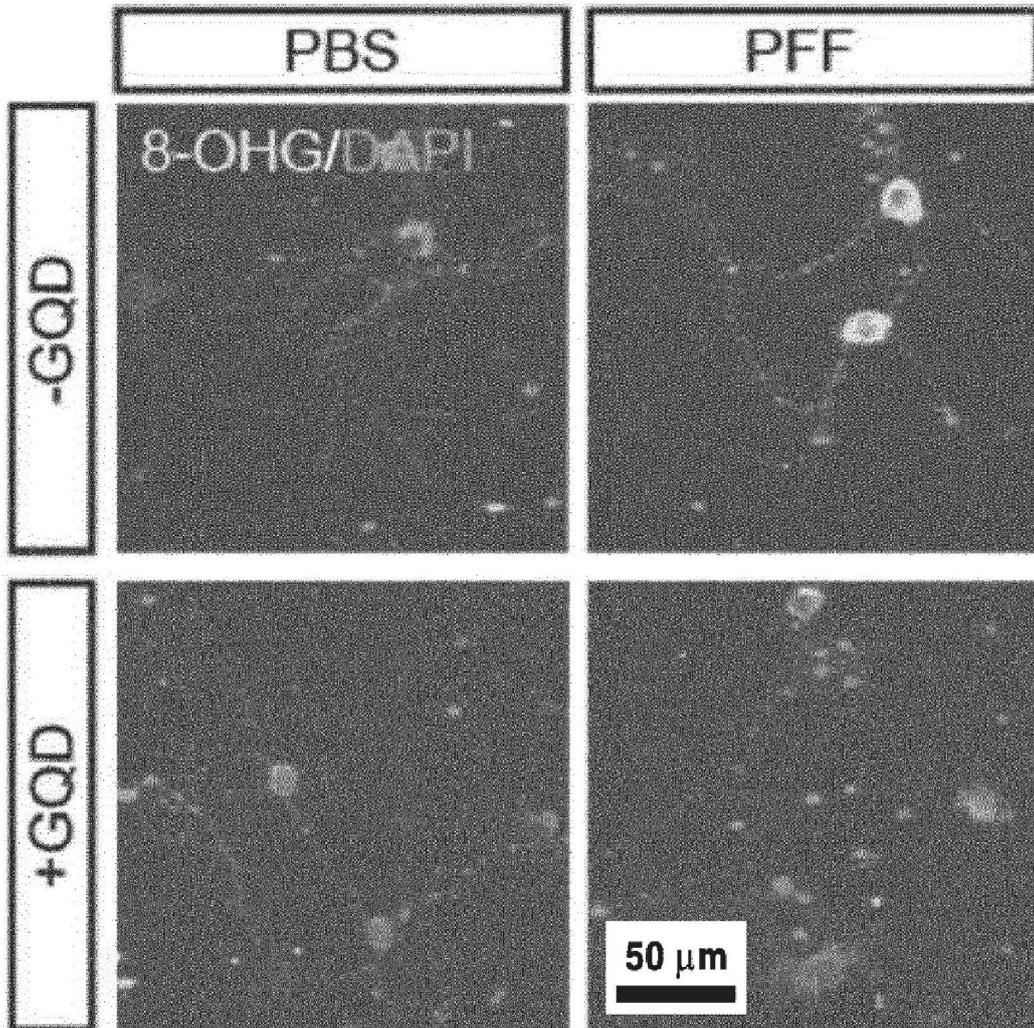
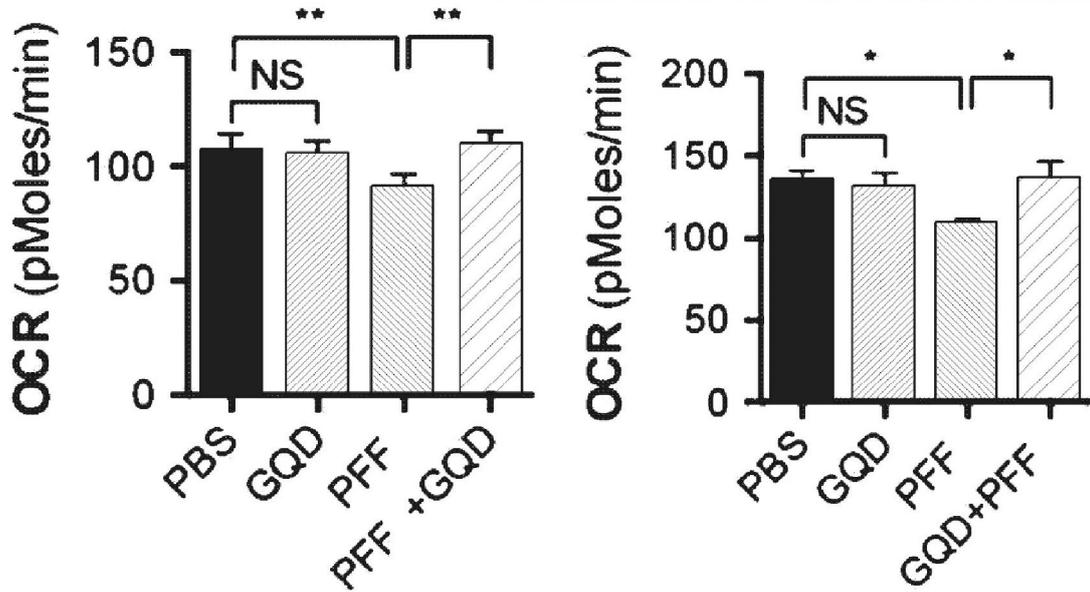


FIG. 7B

FRECUENCIA RESPIRATORIA BASAL
FRECUENCIA RESPIRATORIA MÁXIMA



ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I

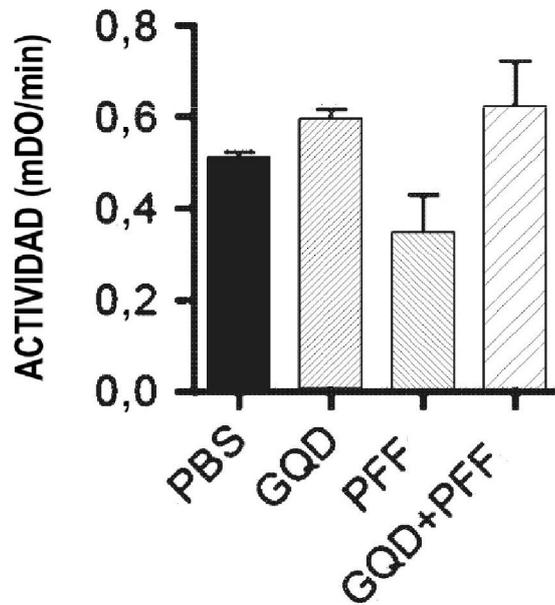


FIG. 8A

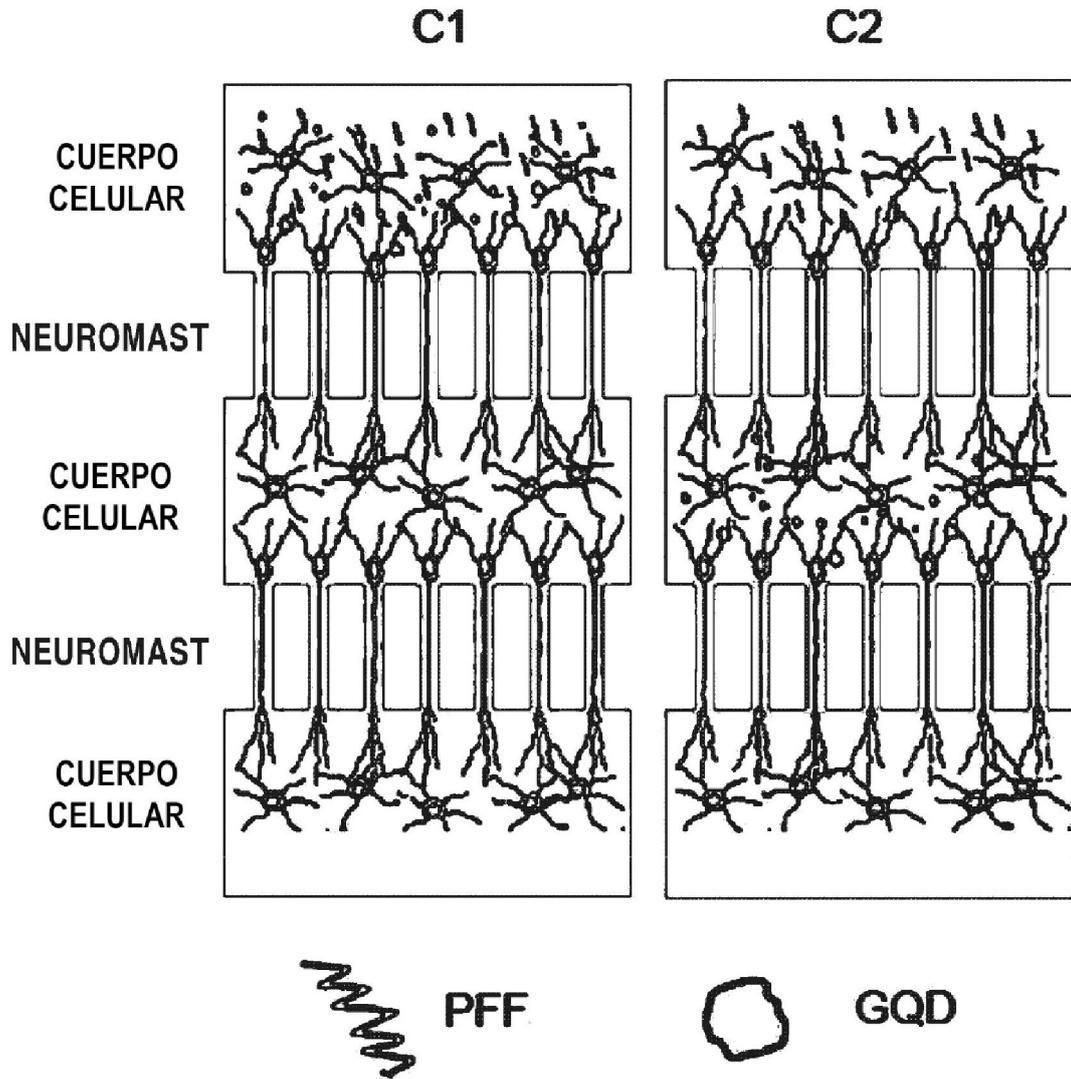


FIG. 8B

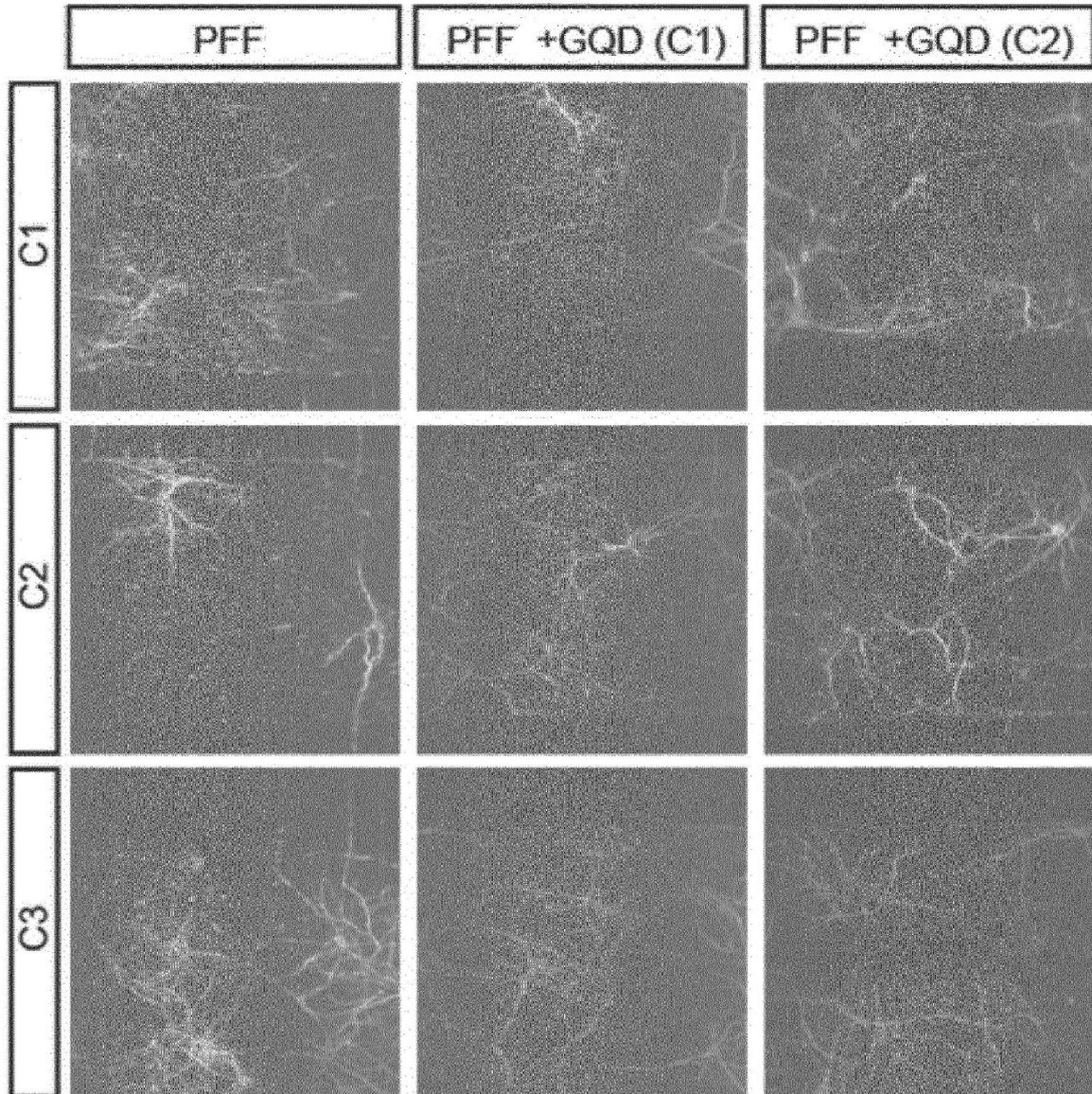
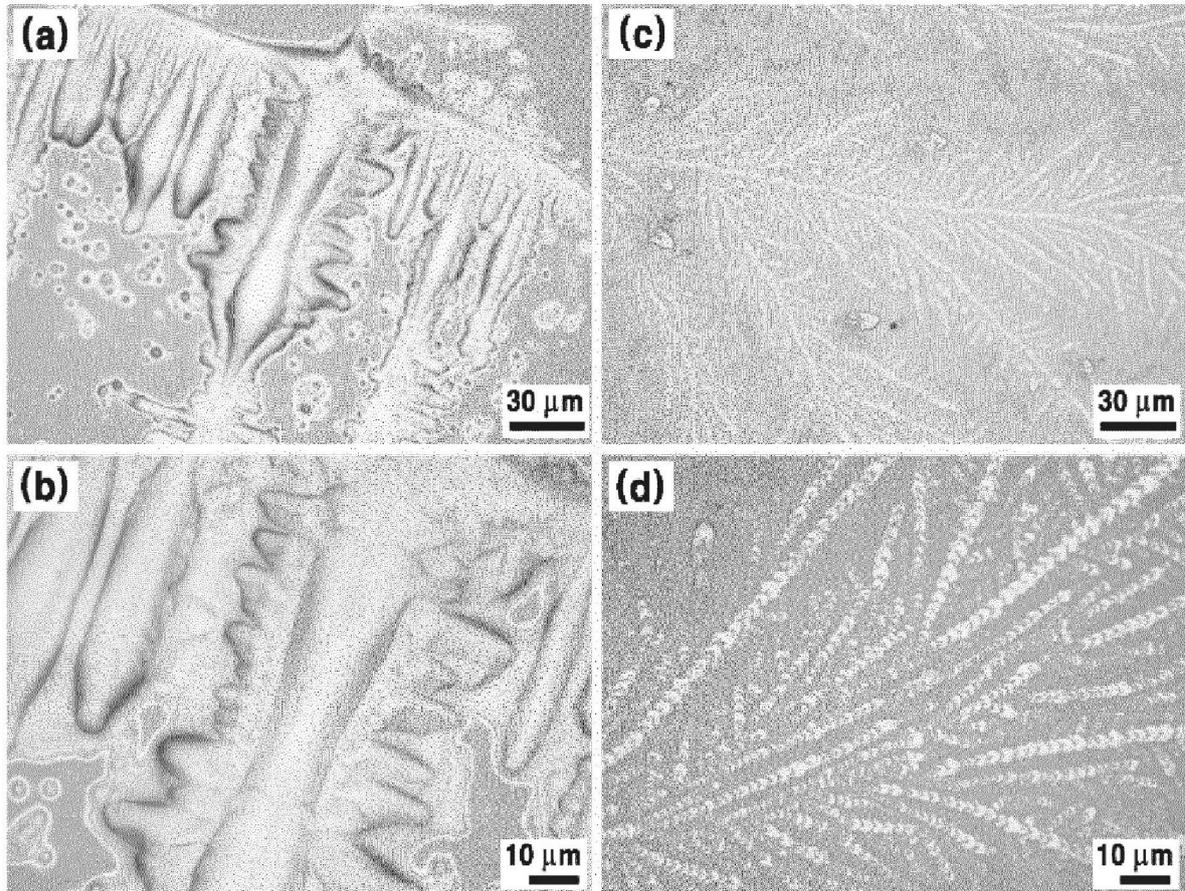


FIG. 9



(a)-(b): PFF DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN A 37 °C DURANTE 3 HORAS

(c)-(d): PFF + GQD DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN A 37 °C DURANTE 3 HORAS

FIG. 10

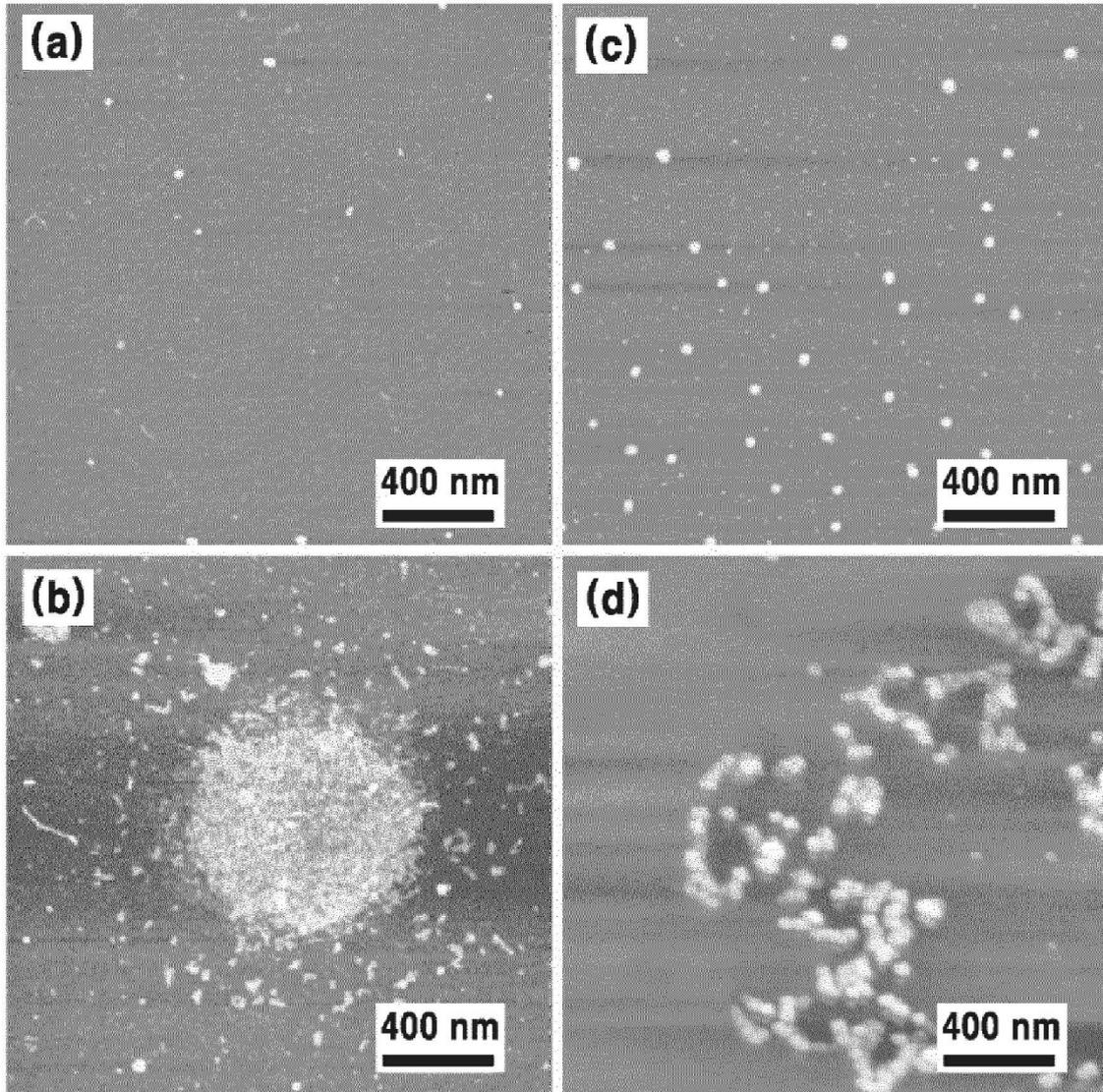
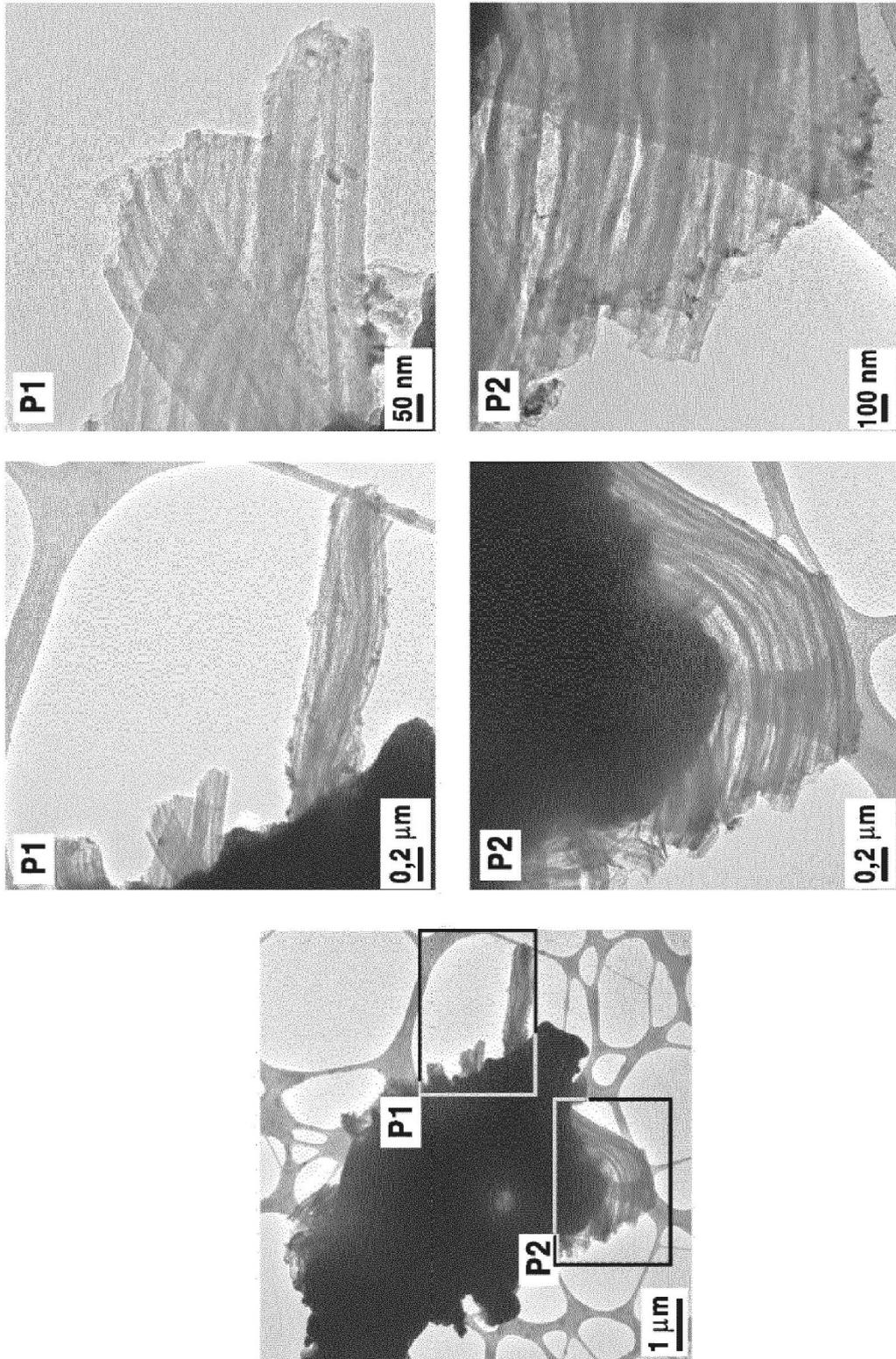
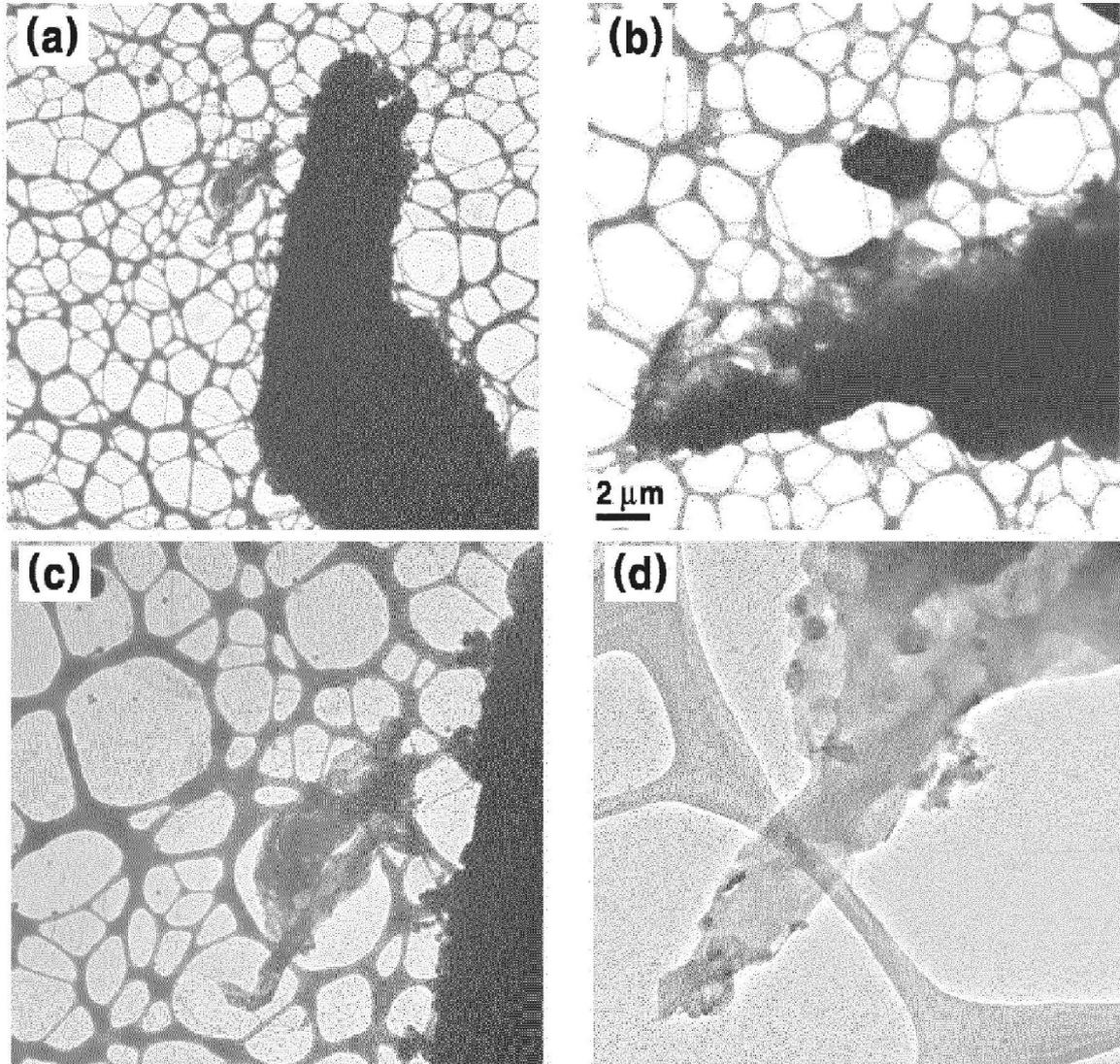


FIG. 11A



PFF DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN A 37 °C DURANTE 3 HORAS

FIG. 11B



(a) - (d): PFF + GQD DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN A 37 °C DURANTE 3 HORAS

FIG. 12

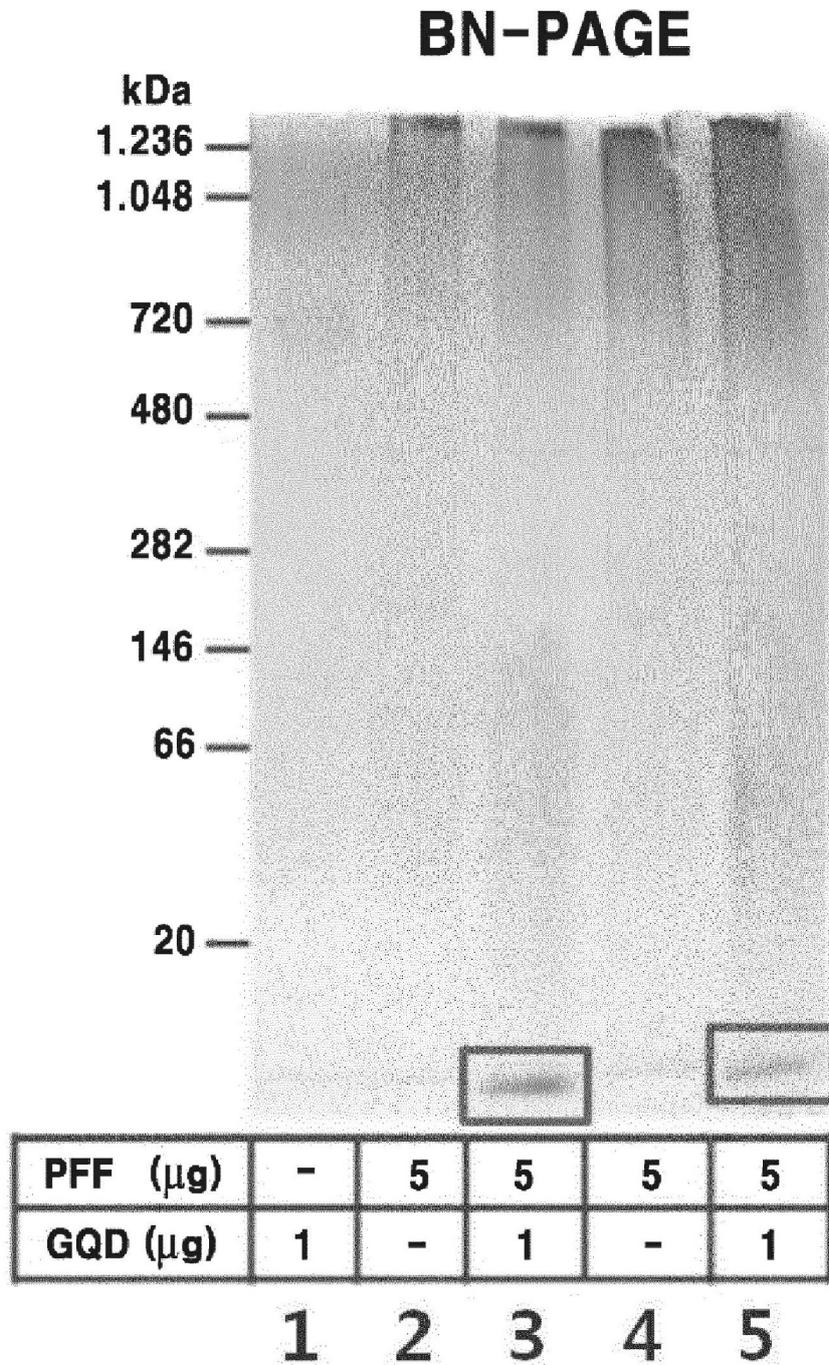
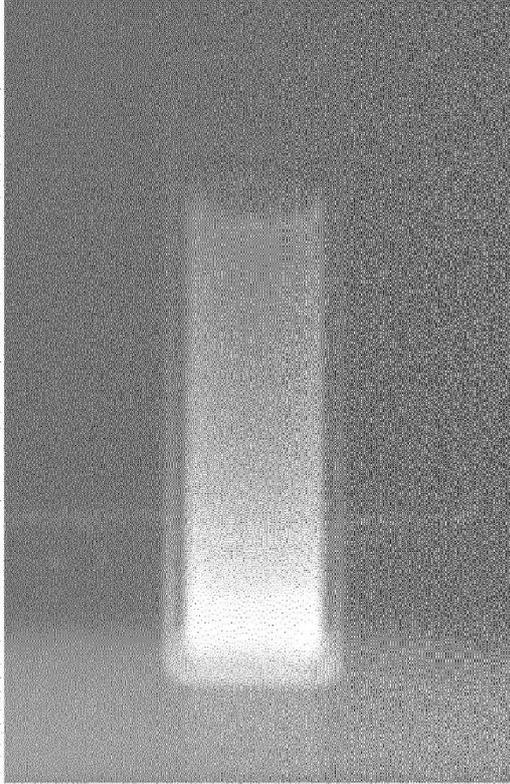
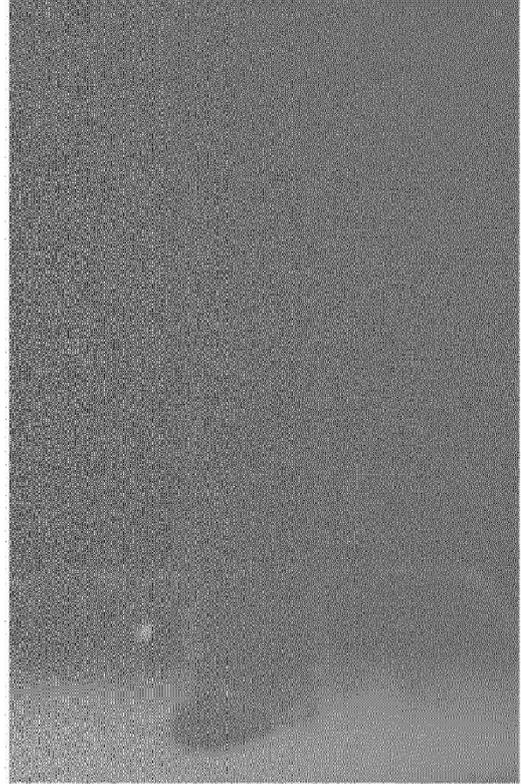


FIG. 13



GQD



ROJO CONGO

FIG. 14

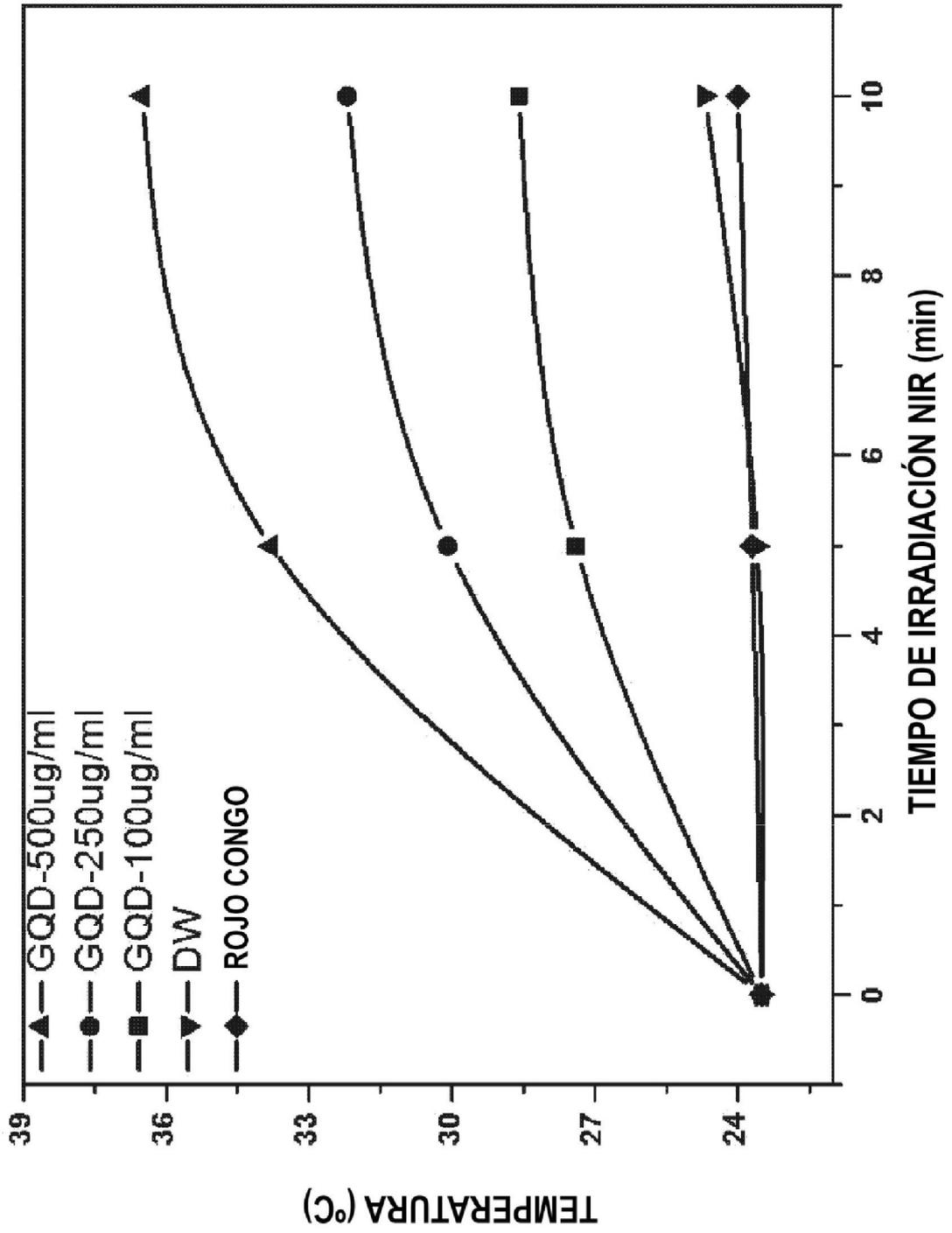


FIG. 15

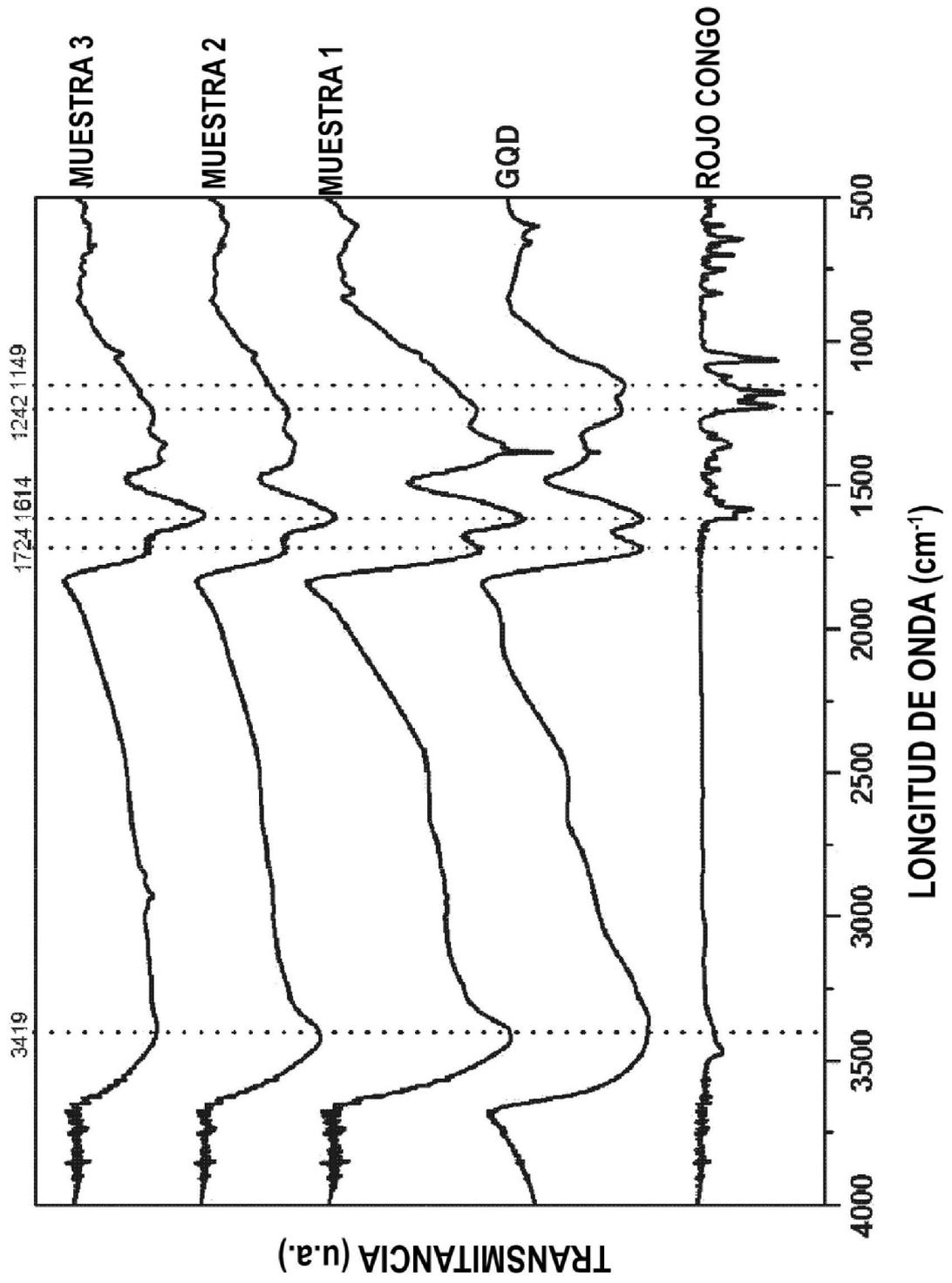


FIG. 16

