

NANOCLÚSTERES DE COBRE, MÉTODOS PARA SU OBTENCIÓN Y APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE MENKES

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente divulgación proviene del campo de la química, y más concretamente de la química farmacéutica. La invención se refiere a nanoclústeres de cobre, procesos para su obtención y aplicación en el tratamiento de enfermedades por déficit de cobre, y más concretamente en el tratamiento del síndrome de Menkes.

Descripción de la Técnica Relacionada

10 [0002] El síndrome de Menkes es una enfermedad genética rara cuya transmisión está relacionada con el cromosoma X (X 21.1), que afecta principalmente a los niños varones y que tiene una incidencia correspondiente a un nacimiento por 300.000 en Europa, o dos nacimientos cada año en Francia. El síndrome de Menkes sigue a un déficit de cobre en el paciente. El cobre es un oligoelemento clave que forma parte de la composición de muchas enzimas clave del metabolismo y, por lo tanto, es indispensable para la supervivencia del

15 cuerpo humano. En el caso del síndrome de Menkes la proteína ATPasa 7A, un transportador de cobre, no es funcional. En consecuencia, el cobre aportado por los alimentos no puede ser absorbido, lo que provoca un profundo déficit de cobre en el organismo. Además, este transportador permite el paso del cobre al cerebro, lo que tiene como consecuencia que la administración de cobre en la sangre no puede curar a estos

20 pacientes porque no trata la afectación neurológica del síndrome. Más allá del profundo retraso en el desarrollo psicomotor, los niños y niñas con síndrome de Menkes presentan una importante hipotonía, epilepsia incontrolable con tratamiento anticonvulsivo, y episodios de hipotermia, hipotensión, etc. También existen anomalías cutáneo-tegumentarias con falta de pigmentación, piel pálida y seca, y cabello frágil, seco y anormal

25 (cabello ensortijado). También pueden existir anomalías vasculares que provoquen hematomas subdurales y también problemas de mineralización ósea. Actualmente, el síndrome de Menkes sigue siendo incurable y la muerte, en general, se produce en las primeras etapas de la infancia (expectativa de vida inferior a cinco años).

30 [0003] La única opción terapéutica disponible se refiere al uso de un complejo de histidina-cobre (histidinato de cobre) proporcionado por la Agence Générale des Equipements et Produits de Santé (AGEPS) de París, parte de Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP). Este producto se administra por vía parenteral (subcutánea). Este tratamiento hace que el cobre esté disponible en el compartimento sanguíneo, pero como se explicó anteriormente, no permite su paso al cerebro y, por lo tanto, no cura la afectación

35 neurológica de este síndrome. El documento "Sr Sheela et al, Clinical Genetics, Wiley-

Blackwell Munksgaard, Dk, vol. 68, No. 3, 11 de agosto de 2005, páginas 278—283” es un estudio de la India realizado en un niño indio de 15 meses que tenía síndrome de Menkes y que fue tratado con inyecciones subcutáneas diarias de histidina de cobre durante dos años y medio. Con el tratamiento se eliminaron las crisis de epilepsia y se consiguió una
5 mejor pigmentación de la piel y el cabello. Sin embargo, el niño siguió manifestando graves retrasos en el desarrollo.

[0004] Actualmente no existe ninguna solución satisfactoria para mejorar la esperanza de vida de los niños con síndrome de Menkes y/o para mejorar su calidad de vida. La presente divulgación pretende mejorar la situación porque propone una solución destinada en
10 particular a remediar los inconvenientes mencionados anteriormente.

[0005] Los inventores tuvieron la idea original de proponer el uso de nanoclústeres de cobre en el tratamiento del síndrome de Menkes. De hecho, hasta donde sabían los inventores, a nadie se le había ocurrido todavía utilizar nanoclústeres de cobre en el tratamiento de este síndrome. En este sentido, los inventores han desarrollado un método original para la
15 síntesis de nanoclústeres de cobre. En la literatura se han descrito varios métodos de síntesis para obtener nanoclústeres, y en particular nanoclústeres de cobre. Así, en el documento de Hu Yanling et al. (“Microchimica Acta, Springer Vienna, Vol. 186, no. 1, 7 de diciembre de 2018, p. 1—8”) se sintetizaron nanoclústeres de cobre a partir de histidina, cloruro de cobre y ácido ascórbico. Estos nanoclústeres de cobre, que se describen como
20 con muy buenas propiedades de fluorescencia, tienen una forma esférica y un diámetro de aproximadamente 3 a 4 nm, donde dicho diámetro se evalúa mediante un microscopio electrónico de transmisión. En el documento CN 105.965.028 se describen platino, plata, oro y cobre para su uso en la detección de iones de hierro mediante fluorescencia/luminiscencia. En dicho documento se describe en particular la síntesis de
25 clústeres de cobre a partir de histidina, acetato de cobre y ácido ascórbico; los clústeres tienen un tamaño promedio de 1,9 nm donde dicho tamaño se mide mediante microscopía electrónica de transmisión. Dicho documento no dice nada sobre la estabilidad de los clústeres resultantes.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

30 **[0006]** La presente divulgación propone nanoclústeres de cobre para su uso en el tratamiento del síndrome de Menkes. De hecho, los nanoclústeres de cobre objeto de la presente invención pueden atravesar la barrera hematoencefálica y, por tanto, proporcionar cobre al cerebro de los pacientes. Además, en las dosis utilizadas actualmente en modelos de ratón, no se acumulan en órganos como el hígado, el bazo, los riñones o los pulmones.

Los nanoclústeres de cobre de la invención tienen más propiedades ventajosas que se describirán con más detalle a continuación.

[0007] Los nanoclústeres según la invención, debido a sus propiedades ventajosas, son candidatos prometedores para mejorar la calidad de vida y la esperanza de vida de los
5 pacientes con síndrome de Menkes.

[0008] Otro objetivo de la invención es proponer un método sencillo y rápido para la síntesis de los nanoclústeres de la invención.

[0009] El objeto de la presente invención son los nanoclústeres de cobre caracterizados en que:

- 10 - están recubiertos en su superficie por una capa mixta que comprende histidina (His), iones acetato (Ac) y posiblemente iones ascorbato (Asc);
 - tienen forma esférica;
 - tienen un diámetro hidrodinámico que oscila entre 0,6 y 2,0 nm, preferiblemente 1,3 nm;
 - tienen un núcleo metálico con un diámetro que oscila entre 0,5 y 1,5 nm, preferiblemente
15 1,0 nm;
 - tienen una estabilidad temporal que oscila entre 5 y 12 semanas, cuando los nanoclústeres están en forma líquida;
 - tienen una estabilidad temporal de al menos 12 meses, y preferiblemente de 12 a 18 meses, cuando los nanoclústeres están en forma seca;
 - 20 - tienen propiedades espectrofotométricas, con un hombro en el espectro UV-Visible a 325 ± 10 nm y un espectro de fluorescencia con longitudes de onda de excitación que varían de 365 a 395 nm y longitudes de onda de emisión que varían de 445 a 475 nm;
- dichos nanoclústeres de cobre se designan mediante la fórmula "CuNC@HisAc" o mediante la fórmula "CuNC@HisAcAsc".

25 Los nanoclústeres de cobre objeto de la invención son nanoclústeres metálicos. Un nanoclúster metálico consiste en la asociación de decenas de átomos de elementos metálicos (cobre en el caso de la invención) con un diámetro de núcleo metálico menor o igual a 2,0 nm (nanómetro).

Los nanoclústeres CuNC@HisAc de la invención están formados por un núcleo de cobre
30 cubierto/recubierto/envuelto por una capa/corona mixta de histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato. En la solicitud se pueden utilizar indistintamente los términos "corona" o "capa", que comprenden histidina, iones acetato y eventualmente iones ascorbato. El término "mixta" se utiliza para indicar que la corona o la capa que envuelve el núcleo de cobre comprende juntos histidina, iones acetato y posiblemente iones
35 ascorbato. De manera similar, los verbos "cubrir/recubrir/envolver" pueden usarse indistintamente para indicar que el núcleo de cobre comprende en toda su superficie una

capa/corona de histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato. En su conjunto, el nanoclúster de cobre CuNC@HisAc tiene forma esférica.

En el sentido de la invención, la fórmula "CuNC@HisAc" designa un nanoclúster formado por un núcleo metálico de cobre recubierto por una capa mixta que comprende histidina, iones acetato y eventualmente iones ascorbato. Asimismo, la fórmula "CuNC@HisAc" sin otras indicaciones en la presente solicitud también engloba la fórmula "CuNC@HisAcAsc", que es una realización específica de un nanoclúster de cobre de la invención, específicamente un nanoclúster constituido por un núcleo metálico de cobre recubierto por una capa mixta que comprende histidina, iones acetato e iones ascorbato.

- 10 La corona mixta que comprende histidina, iones acetato y eventualmente iones ascorbato confiere a los nanoclústeres según la invención en particular una gran estabilidad y una baja reactividad.

Una "baja reactividad" significa una baja degradación, en particular relacionada con el oxígeno (por ejemplo, oxígeno molecular en el aire).

- 15 Según una realización especialmente ventajosa de la invención, la capa/corona mixta que envuelve el núcleo de metal de cobre comprende histidina, iones acetato e iones ascorbato. Por tanto, los nanoclústeres de cobre según la invención contienen ventajosamente tres ligandos en la superficie del núcleo de cobre, concretamente histidina, acetato y ascorbato. Estos ligandos de histidina, iones acetato y iones ascorbato están unidos al núcleo metálico de cobre mediante enlaces coordinados. La estabilidad de los nanoclústeres de la invención indica que se mantendrá la estructura y propiedades de los nanoclústeres en el tiempo a una temperatura de almacenamiento de 4°C. Que se mantenga la estructura significa en particular que la composición del nanoclúster (núcleo metálico envuelto por la capa/corona mixta como se define anteriormente), su forma y su diámetro (tanto el núcleo metálico como el hidrodinámico) se conservan en el tiempo.

La "forma líquida" de los nanoclústeres de cobre designa una solución o una mezcla líquida con nanoclústeres de cobre. La estabilidad de 5 a 12 semanas mencionada anteriormente se refiere a nanoclústeres de cobre en forma líquida.

Por "forma seca" se entiende una forma sólida que puede reducirse a polvo si es necesario.

- 30 La estabilidad de 12 a 18 meses mencionada anteriormente se refiere a nanoclústeres de cobre en forma seca.

Por tanto, dependiendo de su forma (líquida o sólida), su estabilidad en el tiempo será diferente.

- 35 Los nanoclústeres de la invención presentan propiedades espectrofotométricas que son características de esta escala, en particular fluorescencia, y específicamente un diámetro de núcleo metálico inferior o igual a 2 nm, que es intermedio entre la molécula y la nanopartícula.

El diámetro del núcleo metálico o diámetro del metal designa, como su nombre indica, el diámetro formado por el metal de cobre.

El diámetro hidrodinámico considera el diámetro del núcleo de cobre y las capas/corona del mismo que comprenden histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato. Por

5 tanto, el diámetro hidrodinámico designa el diámetro del nanoclúster de cobre CuNC@HisAc según la invención.

Se puede observar que los nanoclústeres de la invención tienen un núcleo metálico y diámetros hidrodinámicos casi equivalentes (respectivamente 1,0 y 1,3 nm).

En la presente solicitud, los nanoclústeres de la invención se denominan indistintamente
10 "nanoclústeres", "nanoclústeres de cobre" y "nanoclústeres CuNC@HisAc", entendiéndose que "nanoclústeres CuNC@HisAc" engloba la realización específica "nanoclústeres CuNC@HisAcAsc".

[0010] Según una realización de la invención, los nanoclústeres de cobre vienen en forma líquida o seca.

15 La forma seca de los nanoclústeres es ventajosa en particular porque permite un fácil almacenamiento, conservación y transporte de los nanoclústeres según la invención.

[0011] Según una realización ventajosa, los nanoclústeres de cobre de la invención se caracterizan además en que tienen al menos una de las siguientes características:

- son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica;
- 20 - tienen una buena biodisponibilidad;
- son biocompatibles;
- son biodegradables;
- pueden ser liofilizados;
- no son tóxicos para el cuerpo humano;
- 25 - no se acumulan en órganos como el hígado, el bazo, los riñones o los pulmones.

Según una realización ventajosa, los nanoclústeres de cobre de la presente invención tienen todas las características descritas anteriormente.

El hecho de que los nanoclústeres de la invención no se acumulen en dichos órganos se debe en particular a su pequeño tamaño (diámetro hidrodinámico inferior o igual a 2,0 nm).

30 El tamaño del nanoclúster de la invención permite una circulación más prolongada en la sangre, en comparación con compuestos de mayor tamaño.

Los nanoclústeres de la invención tienen propiedades superficiales que los hacen capaces de atravesar la barrera hematoencefálica utilizando los sistemas de transporte de los capilares sanguíneos cerebrales. Además, la histidina sirve en particular para ayudar a
35 dirigir el nanoclúster al cerebro porque allí la histidina se transforma en histamina.

"Buena biodisponibilidad" significa que cuando los nanoclústeres de cobre se administran

por vía subcutánea, llegan a la circulación general y se distribuyen bien en los órganos objetivo.

Se entiende por "biocompatibilidad" el hecho de que los nanoclústeres de cobre son aceptados por los distintos órganos del cuerpo y permiten restablecer las funciones biológicas relacionadas con las cuproproteínas sin ser tóxicos para estos órganos.

El hecho de que los nanoclústeres sean biodegradables significa que su descomposición libera sustancias que se metabolizan o eliminan del organismo sin dificultad (cobre, histidina, acetato y posiblemente ascorbato).

La posibilidad de liofilizar los nanoclústeres permite, en particular, almacenarlos, conservarlos y transportarlos fácilmente. El hecho de que los nanoclústeres puedan liofilizarse se debe a que son perfectamente estables. La estabilidad de los nanoclústeres es tal como se define anteriormente.

Las propiedades ventajosas de los nanoclústeres según la invención se deben en particular a la combinación original de sus componentes, en particular cobre, histidina, iones acetato y, en su caso, iones ascorbato. Según el conocimiento de los inventores, hasta la fecha nunca se han descrito nanoclústeres de cobre que comprendan una corona/capa mixta de histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato que envuelve un núcleo de metal de cobre, y que tengan las propiedades ventajosas descritas anteriormente.

[0012] El objeto de la presente invención es también un método para la preparación de nanoclústeres de cobre como los descritos anteriormente, caracterizado en que comprende los siguientes pasos:

- reacción entre acetato de cobre (II) e histidina para obtener una mezcla de acetato de cobre e histidina, donde la relación molar de histidina a acetato de cobre (II) es mayor o igual a 50, y preferiblemente es de 50 a 200;
- reacción entre la mezcla de acetato de cobre e histidina con ácido ascórbico para obtener una mezcla de acetato de cobre, histidina y ácido ascórbico, donde la relación molar ácido ascórbico/acetato de cobre (II) es mayor o igual a 130, y preferiblemente es de 130 a 700;
- recuperación de nanoclústeres de cobre recubiertos en su superficie por una capa mixta que comprende histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato.

Según una realización ventajosa de la invención, los nanoclústeres de cobre obtenidos como resultado del método están recubiertos en su superficie por una capa mixta que comprende histidina, iones acetato e iones ascorbato.

Las relaciones molares definidas anteriormente, respectivamente entre histidina y acetato de cobre, y entre ácido ascórbico y acetato de cobre, son importantes en este sentido porque permiten que los ligandos de histidina, acetato y ascorbato se unan al núcleo de metal de cobre. De esta manera se obtienen nanoclústeres que comprenden tres ligandos

en la superficie del núcleo de cobre, estando unidos estos ligandos a la superficie del núcleo de cobre mediante enlaces de coordinación.

El ácido ascórbico es un reductor. La reacción entre la mezcla de acetato de cobre e histidina con ácido ascórbico es más específicamente una reacción de reducción de la mezcla de acetato de cobre e histidina con ácido ascórbico. El ácido ascórbico sirve especialmente para obtener nanoclústeres de cobre sin ninguna toxicidad.

[0013] La presente invención resulta en particular del descubrimiento inesperado por parte de los inventores de que la combinación original de reactivos utilizados, específicamente acetato de cobre, histidina y ácido ascórbico, y en la proporción tal como se define anteriormente, sirve para obtener nanoclústeres de cobre con propiedades particularmente ventajosas.

Un ejemplo de ello es la excelente estabilidad de los nanoclústeres de la invención.

[0014] Según una realización de la invención, los nanoclústeres de cobre pueden prepararse más específicamente según el protocolo de "solución" o según el protocolo de "fase sólida". Cada una de estas dos vías sintéticas se ajusta a los métodos descritos anteriormente.

[0015] Protocolo de Solución

[0016] Según una realización ventajosa de la invención, el método de preparación tal como se define anteriormente se caracteriza más específicamente en que se realiza bajo gas inerte y en que:

- el acetato de cobre está en forma de solución y la histidina está en forma de polvo;
- se prepara una solución de acetato de cobre e histidina agregando histidina a la solución de acetato de cobre;
- la solución de acetato de cobre e histidina se ajusta a un valor de pH que oscila entre 11 y 13, y es preferiblemente 12;
- el ácido ascórbico está en forma de polvo;
- se prepara una solución de acetato de cobre, histidina y ácido ascórbico mediante la adición de ácido ascórbico a la solución de acetato de cobre e histidina cuyo pH se ajustó a los valores antes mencionados;
- la solución de acetato de cobre, histidina y ácido ascórbico se agita durante 2 horas a 6 horas, y preferiblemente 4 horas, a una temperatura que oscila entre 35°C y 45°C, y preferiblemente 40°C;
- se obtiene una solución que comprende nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc como resultado del paso de agitación anterior;
- la solución que comprende los nanoclústeres de cobre podría dializarse para obtener una

solución de nanoclústeres de cobre purificada;

- la solución que comprende los nanoclústeres de cobre, posiblemente dializada, podría liofilizarse para obtener nanoclústeres de cobre en forma seca.

La solución que comprende los nanoclústeres de cobre, posiblemente dializada, tiene una
5 estabilidad en el tiempo que oscila entre 5 y 12 semanas a una temperatura de almacenamiento de 4°C.

La diálisis sirve especialmente para eliminar todo lo que no esté unido al núcleo metálico de cobre, como por ejemplo un posible exceso de histidina o de ácido ascórbico, o incluso cobre residual que podría estar presente en la solución de nanoclústeres. La capa que
10 comprende histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato está unida al núcleo metálico de cobre mediante enlaces coordinados.

La forma seca de los nanoclústeres de cobre, obtenida como resultado de la liofilización, tiene una estabilidad en el tiempo de al menos 12 meses, preferiblemente de 12 a 18 meses, a una temperatura de almacenamiento de 4°C bajo nitrógeno.

15 La forma seca de los nanoclústeres de cobre se puede reconstituir en cualquier momento, mediante mezcla en un disolvente de reconstitución, por ejemplo agua purificada. Se entiende por "reconstituir/reconstitución" la simple operación de mezcla de la forma seca o liofilizada con un disolvente.

El análisis de la solución de nanoclústeres de cobre, obtenida como resultado de la
20 reconstitución de la forma seca, muestra que los nanoclústeres de cobre tienen todas las propiedades definidas anteriormente y, por lo tanto, son exactamente las mismas que las obtenidas directamente como resultado del método para su preparación.

La solución de nanoclústeres de cobre, obtenida como resultado de la reconstitución de la forma seca, tiene una estabilidad en el tiempo que oscila entre 5 y 12 semanas a una
25 temperatura de almacenamiento de 4°C.

[0017] El método de preparación como se define anteriormente también se caracteriza en que comprende además al menos una característica seleccionada de:

- el gas inerte es nitrógeno;
- la solución de acetato de cobre se prepara añadiendo acetato de cobre a agua filtrada
30 ultrapura;
- la concentración de la solución de acetato de cobre varía de 0,5 a 5,0 mm;
- la concentración de histidina es mayor que la concentración de la solución de acetato de cobre;
- el pH de la solución de acetato de cobre e histidina se ajusta usando hidróxido de sodio;
- 35 - la solución que comprende los nanoclústeres de cobre, posiblemente dializada, tiene una concentración de cobre que oscila entre 16 y 160 µg/ml;

- la solución que comprende los nanoclústeres de cobre, posiblemente dializada, se liofiliza para obtener nanoclústeres de cobre en forma seca.

Según una realización ventajosa, el método de la presente invención tiene todas las características descritas anteriormente.

5 [0018] Protocolo de Fase Sólida

[0019] Según otra realización ventajosa de la invención, el método de preparación tal como se define anteriormente se caracteriza más específicamente en que:

- el acetato de cobre está en forma de polvo y la histidina está en forma de polvo;
 - se obtiene una mezcla en polvo de acetato de cobre e histidina mezclando cada uno de
 - 10 los polvos de acetato de cobre e histidina;
 - la mezcla de acetato de cobre e histidina en polvo se muele hasta obtener una mezcla en polvo de color homogéneo;
 - la mezcla homogénea de acetato de cobre e histidina en polvo se coloca en un recipiente de reacción;
 - 15 - el ácido ascórbico está en forma de polvo;
 - se añade ácido ascórbico al recipiente de reacción que comprende la mezcla homogénea de acetato de cobre e histidina en polvo;
 - la mezcla resultante de acetato de cobre, histidina y ácido ascórbico en polvo se agita, luego se agrega agua gota a gota al recipiente de reacción, donde dicha agua es agua
 - 20 ultrapura filtrada;
 - el recipiente de reacción se coloca bajo un gas inerte y se protege de la luz;
 - la mezcla de acetato de cobre, histidina, ácido ascórbico y agua se mantiene en agitación en el recipiente de reacción durante 16 a 36 horas, preferiblemente durante 24 horas;
 - se obtiene una mezcla líquida que comprende nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc
 - 25 como resultado del paso de agitación anterior;
 - la mezcla líquida que comprende los nanoclústeres de cobre podría dializarse para obtener una mezcla de nanoclústeres de cobre líquida purificada;
 - la mezcla líquida que comprende los nanoclústeres de cobre, posiblemente dializada, podría liofilizarse para obtener nanoclústeres de cobre en forma seca.
 - 30 Los datos sobre estabilidad descritos anteriormente para los nanoclústeres de cobre, en forma líquida o seca, obtenidos como resultado del protocolo de solución son válidos para los nanoclústeres de cobre en forma líquida o seca obtenidos como resultado del protocolo de fase sólida.
- El polvo de acetato de cobre usado anteriormente es azul y el polvo de histidina es blanco.
- 35 Cuando se mezclan estos dos polvos, el resultado deseado es un color azul claro lo más homogéneo posible.

[0020] El método de preparación como se define anteriormente también se caracteriza en que comprende además al menos una característica seleccionada de:

- la concentración de histidina es mayor que la concentración de acetato de cobre;
- el agua añadida al recipiente de reacción es agua ultrapura filtrada;

5 - el gas inerte es nitrógeno;

- la mezcla líquida que comprende los nanoclústeres de cobre, posiblemente dializada, tiene una concentración de cobre que oscila entre 1600 y 4000 µg/ml;

- la mezcla líquida que comprende los nanoclústeres de cobre, posiblemente dializada, se liofiliza para obtener nanoclústeres de cobre en forma seca.

10 La forma liofilizada se almacena bajo nitrógeno.

Según una realización ventajosa, el método de la presente invención tiene todas las características descritas anteriormente.

[0021] Según otra realización de la invención, los nanoclústeres de cobre en forma seca obtenidos como resultado de la liofilización (según el protocolo de "solución" o de "fase sólida") se almacenan bajo nitrógeno, preferiblemente en viales, y preferiblemente a 4°C. En tales condiciones, el polvo de nanoclústeres de cobre podría almacenarse durante al menos 12 meses, y preferiblemente durante 12 a 18 meses, sin alteración de la estabilidad de los nanoclústeres de cobre.

La reconstitución del polvo de nanoclústeres al final de este tiempo muestra que los
20 nanoclústeres son exactamente iguales a los obtenidos directamente al final de su preparación (según el protocolo de "solución" o de "fase sólida"). De hecho, los nanoclústeres de cobre tienen todas las propiedades definidas anteriormente.

[0022] Según otro aspecto, el objeto de la presente invención son también nanoclústeres de cobre tales como los definidos anteriormente u obtenidos según los métodos definidos
25 anteriormente para su uso como medicamento.

[0023] El objeto de la presente invención es más específicamente nanoclústeres de cobre como se definen anteriormente u obtenidos según los métodos como se definen anteriormente para su uso en el tratamiento de patologías relacionadas con un déficit de cobre.

30 **[0024]** Como ejemplo(s) de patologías relacionadas con un déficit de cobre, se puede citar más específicamente el síndrome de Menkes.

[0025] Los nanoclústeres de cobre de la invención están destinados más específicamente a pacientes con un déficit de ATPasa7A.

Entre los pacientes con deficiencia de ATPasa7A se pueden citar los pacientes con
35 síndrome de Menkes, concretamente niños y niñas. Por lo tanto, según una realización de

la invención, los nanoclústeres de cobre están destinados más específicamente a un uso pediátrico.

Sin embargo, entre los pacientes con déficit de ATPasa7A, también se pueden mencionar pacientes adultos con la forma atenuada del síndrome de Menkes, específicamente
5 pacientes adultos con síndrome del asta occipital. Según otra realización de la invención, los nanoclústeres de cobre también son adecuados para su uso en el tratamiento del síndrome del asta occipital.

[0026] De nuevo, un objeto de la invención es una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de nanoclústeres de cobre tales como los definidos
10 anteriormente u obtenidos según los métodos definidos anteriormente.

La cantidad de nanoclústeres de cobre podría variar según el modo de administración considerado y la edad y peso del paciente.

[0027] Los nanoclústeres de cobre o la composición farmacéutica de la invención podrían tener una forma apropiada para ser administrados por vía subcutánea o intravenosa. Según
15 una realización preferida de la invención, los nanoclústeres de cobre tienen una forma adecuada para la administración subcutánea, preferiblemente una vez al día.

[0028] Según una realización ventajosa, los nanoclústeres de cobre o la composición farmacéutica de la invención tienen una forma adecuada para la administración mediante una bomba subcutánea.

20 Como ejemplo, la bomba subcutánea se ha utilizado durante muchos años en el tratamiento de la diabetes infantil. La medicación se administra así de forma continua, a través de una bomba que el paciente lleva sobre su cuerpo y que administra el medicamento de forma continua a través de un catéter subcutáneo.

[0029] La invención también se refiere a un método de tratamiento terapéutico para el
25 síndrome de Menkes que comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de nanoclústeres de cobre o de una composición farmacéutica tal como se define anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0030] Otras características, detalles y ventajas se develarán tras la lectura de la
30 descripción detallada que sigue a continuación, y el análisis de los dibujos adjuntos, en los que:

Fig. 1

[0031] La [Fig. 1] es una representación esquemática de un nanoclúster de cobre CuNC@HisAc de la invención, formado por un núcleo de metal de cobre envuelto por una corona mixta que comprende histidina y acetato.

Fig. 2

- 5 **[0032]** La [Fig. 2] es una representación esquemática de un nanoclúster de cobre CuNC@HisAcAsc de la invención, formado por un núcleo de metal de cobre envuelto por una corona mixta que comprende histidina, acetato y ascorbato.

Fig. 3

- 10 **[0033]** La [Fig. 3] es un análisis de cromatografía iónica de nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc, que muestra la presencia de iones acetato en la superficie del núcleo metálico de cobre.

Fig. 4

[0034] La [Fig. 4] es un análisis de espectrofotometría infrarroja que muestra la presencia de iones ascorbato en la superficie del núcleo de metal de cobre.

- 15 **Fig. 5**

[0035] La [Fig. 5] muestra el diámetro hidrodinámico (en nanómetros) de nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc evaluados por difusión dinámica de luz.

Fig. 6

- 20 **[0036]** La [Fig. 6] muestra el diámetro del metal (en nanómetros) de nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc evaluados mediante microscopio electrónico de transmisión.

Fig. 7

[0037] La [Fig. 7] muestra el diámetro hidrodinámico (en nanómetros) de nanoclústeres de cobre CuNC @ HisAc evaluados por dispersión de Taylor.

Fig. 8

- 25 **[0038]** La [Fig. 8] es un espectro de UV-Visible de nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc.

Fig. 9

[0039] La [Fig. 9] es un espectro de fluorescencia de nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc.

Fig. 10

- 30 **[0040]** La [Fig. 10] muestra la concentración de cobre cerebral (en µg/g) en ratones en función del tratamiento (tratado o no tratado) y de la dosis de nanoclústeres de cobre recibidos: TS ("Tipo Silvestre"), NT (ratones hemicigotos no tratados), 4X 3x/semana

(ratones hemicigotos tratados con la dosis de nanoclúster de cobre 4X, inyectada tres días por semana) y 4X 5x/semana (ratones hemicigotos tratados con la dosis de nanoclúster de cobre 4X, inyectada cinco días por semana). Para cada grupo de ratones, la letra n indica el número de ratones tratados.

5 **Fig. 11**

[0041] La [Fig. 11] muestra la supervivencia de los animales en una curva de Kaplan-Maier en función del tratamiento (tratado o no tratado) y de la dosis de nanoclústeres de cobre recibidos: TS ("Tipo Silvestre"), NT (ratones hemicigotos no tratados), 1X (ratones hemicigotos tratados con la dosis de nanoclúster de cobre 1X, inyectada tres días por semana), 2X (ratones hemicigotos tratados con la dosis de nanoclúster de cobre 2X, inyectada tres días por semana), 4X 3x/semana (ratones hemicigotos tratados con la dosis de nanoclúster de cobre 4X, inyectada tres días por semana) y 4X 5x/semana (ratones hemicigóticos tratados con la dosis de nanoclúster de cobre 4X, inyectada cinco días por semana). Para cada grupo de ratones, la letra n indica el número de ratones tratados.

15 **Fig. 12**

[0042] La [Fig. 12] muestra un marcador histológico de cobre mediante tinción con rodanina de una sección de tejido renal procedente de ratones hemicigotos no tratados y de ratones hemicigotos tratados con una solución de cobre y nanoclústeres en dosis 2x (HE 2X).

Fig. 13

20 [0043] La [Fig. 13] muestra un marcador histológico de cobre mediante tinción con rodamina de una sección de tejido hepático procedente de ratones hemicigotos no tratados (HE NT) y de ratones hemicigotos tratados con una solución de cobre y nanoclústeres en dosis 2x (HE 2X).

Fig. 14

25 [0044] La [Fig. 14] muestra la cadena respiratoria en el cerebro de ratones hemicigotos no tratados (HE NT) y ratones hemicigotos tratados con una solución de cobre y nanoclústeres en una dosis 2x (HE 2X).

Fig. 15

30 [0045] La [Fig. 15] muestra el diámetro hidrodinámico (en nanómetros), evaluado por difusión dinámica de luz, de clústeres de cobre obtenidos según el protocolo de síntesis descrito en el documento CN 105.965.028. El diámetro hidrodinámico se evaluó inmediatamente después de la síntesis de los clústeres de cobre.

Fig. 16

[0046] La [Fig. 16] muestra el diámetro hidrodinámico (en nanómetros), evaluado por difusión dinámica de luz, de clústeres de cobre obtenidos según el protocolo de síntesis descrito en el documento CN 105.965.028. El diámetro hidrodinámico se evaluó 24 horas después de la síntesis de los clústeres de cobre (almacenamiento a 4°C en la oscuridad).

Fig. 17

[0047] La [Fig. 17] es una fotografía de tres lotes de clústeres de cobre obtenidos según el protocolo de síntesis descrito en el documento CN 105.965.028 después de 24 horas de almacenamiento a 4°C en la oscuridad.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0048] Los dibujos de la siguiente descripción contienen, en su mayor parte, elementos de naturaleza definida. Por tanto, no sólo servirán para una mejor comprensión de la presente divulgación, sino que también contribuirán a su definición, según corresponda.

Ejemplos

15 [0049] Ejemplo 1:

[0050] Preparación de nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc

Este ejemplo describe respectivamente las dos posibles rutas sintéticas para preparar nanoclústeres de cobre de la invención, específicamente el "protocolo de solución" y el "protocolo de fase sólida".

20 [0051] 1) Protocolo de Solución

[0052] Reactivos Usados

- Acetato de cobre (II) [Cu(CH₃COO)₂], M = 181,63 g/mol (CAS 142-71-2);
- L(-)-Histidina, M=155,15 g/mol (CAS 71-00-1);
- Ácido ascórbico, M= 176,12 g/mol (CAS 50-81-7);
- 25 - Solución 1 M de hidróxido de sodio, M= 40,00 g/mol (CAS 1310-73-2)

[0053] Precauciones a Tomar

La síntesis se realiza bajo un gas inerte (nitrógeno). El material de vidrio se lava con agua regia (un volumen de ácido nítrico al 65%, por dos volúmenes de ácido clorhídrico al 37%). Dado que los nanoclústeres de cobre están destinados a ser estudiados *in vivo*, es necesario trabajar bajo una campana limpia y limpiar todo el equipo utilizado con etanol al 70% en volumen. El agua ultrapura utilizada se filtra con un filtro con poros de 0,2 µm de diámetro.

[0054] Preparación de una Solución Madre de Acetato de Cobre

Se coloca una cantidad de 45 mg de acetato de cobre en un matraz aforado de 100 mL. Se añade agua ultrapura filtrada hasta la línea del matraz aforado. El resultado es una solución de acetato de cobre con una concentración de 2,5 mM.

- 5 Después de disolverse completamente, la solución de acetato de cobre se transfiere a un recipiente adecuado. Esta solución puede conservarse durante un mes a 4°C.

[0055] Síntesis de Nanoclústeres de Cobre Estabilizados con Histidina

- 10 Se añade una cantidad de 500 µl de solución madre de acetato de cobre, como la preparada en el paso anterior, a un matraz de cuello y fondo redondo que puede contener hasta 50 ml de solución. Luego se añade al matraz de fondo redondo una cantidad de 4500 µL de agua filtrada ultrapura. La solución de acetato de cobre resultante se llama 1X.

También se preparan soluciones de acetato de cobre 2X y 4X colocando una cantidad respectiva de 1000 µL y 2000 µL de solución madre de acetato de cobre en un matraz de fondo redondo y llevándolo hasta 5000 µL con agua filtrada ultrapura.

- 15 La solución de acetato de cobre 1X se agita a 130 RPM con el agitador de placas múltiples. A la solución de acetato de cobre se le añade una cantidad de 39 mg de histidina. La solución de acetato de cobre e histidina se agita durante 15 minutos. La solución adquiere un tinte azulado. Después de 15 minutos de agitación, el pH de la solución de acetato de cobre e histidina se ajusta a 12 con 10 gotas de solución 1M NaOH.

- 20 A la mezcla de reacción se le añade una cantidad de 139 mg de ácido ascórbico. El matraz de fondo redondo (recipiente de reacción) se coloca en un baño de vapor a 40°C con agitación (velocidad ajustada a 6) durante cuatro horas. La solución adquiere un tinte naranja.

La solución de nanoclústeres de cobre resultante se mantiene fría, a 4°C.

- 25 Las operaciones descritas anteriormente se repiten respectivamente con las soluciones de acetato de cobre 2X y 4X.

Las concentraciones de cobre obtenidas con soluciones de acetato de cobre de 1X a 10X para las soluciones de nanoclústeres de cobre van de 16 a 160 µg/mL.

- 30 El rendimiento sintético es del 100%: no hay cobre Cu²⁺ residual en la solución de nanoclústeres.

Las tres soluciones de nanoclústeres de cobre, obtenidas respectivamente a partir de una solución de acetato de cobre 1X, 2X y 4X, se denominan a continuación: soluciones de nanoclústeres de cobre 1X, 2X y 4X. Las soluciones pueden liofilizarse.

[0056] Diálisis de los Nanoclústeres de Cobre

- 35 Los nanoclústeres de cobre resultantes del paso anterior se purifican mediante diálisis. Se prepara una celda de diálisis (X12 Float A-Lyzer G2 CE MWCO 100–500 D, número de

catálogo 1511160) y se llena un vaso de precipitados de 150 ml con 100 ml de agua ultrapura filtrada. La celda de diálisis se llena con agua ultrapura filtrada utilizando una pipeta Pasteur. La celda de diálisis se coloca en el vaso de precipitados con agitación (130 RPM). La célula se deja hidratar y lavar durante 1 hora.

- 5 Luego, el agua se reemplaza por un nuevo volumen de 100 ml de agua ultrapura filtrada. La celda de diálisis se vacía usando una pipeta Pasteur y luego se llena con la solución de nanoclústeres de cobre 1X, que se deja en agitación toda la noche (aproximadamente 12 horas) a una temperatura entre 2 y 6°C.

La solución de nanoclúster de cobre 1X dializada se transfiere a un vial adecuado.

- 10 Las mismas operaciones se repiten respectivamente con las soluciones de nanoclústeres de cobre 2X y 4X.

Las concentraciones de cobre de las soluciones de nanoclústeres de cobre dializadas son idénticas a las de las soluciones no dializadas y oscilan entre 16 y 160 µg/ml (con soluciones de acetato de cobre de 1X a 10X).

- 15 Las soluciones pueden liofilizarse.

[0057] 2) Protocolo de Fase Sólida

[0058] Reactivos Usados

El acetato de cobre (II), L(-)-histidina y ácido ascórbico son los mismos que se utilizan en el protocolo de solución. En el protocolo de fase sólida, no se necesita hidróxido de sodio.

- 20 **[0059] Precauciones a Tomar**

La síntesis se realiza bajo gas inerte (nitrógeno) y protegida de la luz. El material de vidrio se lava con agua regia (un volumen de ácido nítrico al 65%, por dos volúmenes de ácido clorhídrico al 37%). El agua utilizada es agua ultrapura filtrada con un filtro de poros de 0,2 µm de diámetro.

- 25 **[0060] Síntesis de Nanoclústeres de Cobre Estabilizados con Histidina**

Se pesa una cantidad de 23 mg de acetato de cobre y luego se coloca dentro de un mortero de ágata. A continuación, se pesa una cantidad de 1,7 g de histidina. Se añade un volumen de histidina en polvo por un volumen de acetato de cobre en polvo teniendo cuidado de moler completamente los polvos con el mortero hasta obtener una mezcla de color y

- 30 apariencia homogénea. Esta operación se repite mientras haya histidina. La mezcla final de los dos polvos debe tener un color azul claro y el polvo debe ser homogéneo. Luego se transfiere la mezcla de los dos polvos a un matraz de fondo redondo de una sola boca de 50 ml (cuello esmerilado NS 19/26) usando una espátula. Se pesa una cantidad de 3 g de ácido ascórbico y se transfiere al matraz de fondo redondo. Se coloca un agitador
35 magnético en forma de aceituna en el fondo del matraz. Se filtra una cantidad de 5 ml de

agua ultrapura utilizando una jeringa de plástico de 5 ml y se añade gota a gota al recipiente de reacción. Resulta una mezcla líquida.

El recipiente de reacción se cierra con un tapón con faldón plegable (19,4 mm de diámetro) y se coloca bajo nitrógeno sin crear sobrepresión mediante un globo. El recipiente de reacción se envuelve con papel de aluminio y luego se coloca bajo agitación (200 RPM) durante la duración de la reacción. Se necesitan 24 horas antes del final de la reacción. Al final de la reacción, el producto resultante, que se encuentra en forma líquida, presenta un color amarillo. El líquido resultante, que comprende nanoclústeres de cobre, tiene una concentración de cobre de 1600 µg/ml.

- 10 Luego, este líquido se transfiere a un vial de plástico adecuado (el volumen final es un poco más de 5 ml). Luego, el líquido que comprende los nanoclústeres de cobre se almacena frío o se transfiere al liofilizador. La liofilización se realiza en fracciones de 1 ml. Después de la liofilización, el contenido del vial (que comprende los nanoclústeres de cobre en forma seca) se coloca bajo nitrógeno y se almacena a 4°C. La forma seca de los nanoclústeres de cobre se puede reconstituir en cualquier momento en 1 ml de agua purificada. La solución de nanoclústeres de cobre resultante se almacena bajo nitrógeno.

[0061] Ejemplo 2:

[0062] Caracterización de Nanoclústeres de Cobre (en solución o en forma seca y restituidos a solución)

- 20 **[0063]** Los nanoclústeres de cobre obtenidos en el ejemplo 1 se caracterizan por su estructura, tamaño, propiedades espectrofotométricas y estabilidad.

[0064] Estructura de los Nanoclústeres de Cobre

- Los nanoclústeres de cobre según la invención tienen forma esférica. Más concretamente, están formados por un núcleo metálico de cobre recubierto por una corona mixta que comprende histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato. La Figura 1 es una representación esquemática de un nanoclúster de cobre CuNC@HisAc de la invención, específicamente un nanoclúster que comprende en la superficie del núcleo de cobre una corona mixta que comprende iones histidina y acetato. La Figura 2 es una representación esquemática de una realización específica, en particular un nanoclúster de cobre CuNC@HisAcAsc que comprende en la superficie del núcleo de cobre una corona mixta que comprende histidina, iones acetato y posiblemente iones ascorbato.

La presencia de iones acetato en la superficie de los nanoclústeres de cobre se demostró mediante purificación mediante cromatografía de exclusión estérica y luego cuantificación cromatográfica iónica.

- 35 Los nanoclústeres de cobre de la solución dializada 1X obtenida en el ejemplo 1 sección 1

("Protocolo de Solución") se destruyen (disolución total y retorno a los diversos elementos que componen la estructura de los nanoclústeres) mediante un método químico (disolución en un ácido concentrado (HCl) y luego una base concentrada (NaOH)) y luego se analizan mediante cromatografía iónica en comparación con un control de acetato de sodio (retención de los iones que componen el nanoclúster sobre una resina de intercambio catiónico, separación, identificación y cuantificación (calibración externa) de los iones acetato mediante medición de conductividad con el uso de un supresor).

Los resultados obtenidos con el análisis cromatográfico iónico se muestran en la Figura 3. El pico a los 4,45 minutos asociado con los iones acetato (control, ver trazo superior) se encuentra en los nanoclústeres de cobre (ver trazo inferior).

La presencia de iones ascorbato en la superficie de los nanoclústeres se demostró mediante análisis espectrofotométrico de infrarrojos después de la purificación de los nanoclústeres en solución mediante cromatografía de exclusión esteárica.

Los resultados obtenidos con el análisis espectrofotométrico de infrarrojos se muestran en la Figura 4. Las longitudes de onda características de los iones acetato de 1400 a 1500 cm^{-1} se encuentran durante el análisis de los nanoclústeres.

[0065] Tamaño de los Nanoclústeres de Cobre

El diámetro hidrodinámico (Dh) y/o diámetro metálico de los nanoclústeres de cobre se evaluó mediante difusión dinámica de luz (Figura 5) (ángulo de 173° , láser de 530 nm, temperatura de 25°C en un Malvern Nanosizer), mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 6) (depósito sobre rejillas de níquel, observación bajo haces operando a 200 kV (cátodo LaB6) Philips CM 200) y analizado por dispersión de Taylor (Figura 7). El método de análisis por dispersión consiste en inyectar una banda de soluto en un tubo capilar abierto (50 μm) y moverlo bajo la influencia del flujo hidrodinámico (1 psi de presión positiva, perfil de velocidad parabólico). El principio para la determinación del radio hidrodinámico se basa en la relación de Taylor-Aris que establece el vínculo entre la dispersión del pico del soluto (modelo de dispersión gaussiano) y el coeficiente de difusión molecular.

Los resultados obtenidos para la evaluación del diámetro hidrodinámico (Dh) de los nanoclústeres de cobre mediante difusión dinámica de luz se ilustran en la Figura 5.

Los resultados obtenidos para la evaluación del diámetro metálico de los nanoclústeres de cobre mediante microscopía electrónica de transmisión se ilustran en la Figura 6. Se observa una población mayoritaria con un diámetro promedio menor a 1,0 nm.

Los resultados obtenidos para la evaluación del diámetro hidrodinámico (Dh) de los nanoclústeres de cobre mediante dispersión de Taylor se ilustran en la Figura 7.

De estas imágenes se deduce que el diámetro hidrodinámico promedio, al igual que el

diámetro del metal, de los nanoclústeres de cobre CuNC@HisAc es inferior a 1,0 nm. Las características enumeradas anteriormente relativas a los nanoclústeres de cobre se refieren más concretamente a nanoclústeres de cobre recubiertos en su superficie por histidina, iones acetato y iones ascorbato.

5 **[0066] Propiedades Espectrofotométricas**

Las propiedades espectrofotométricas de los nanoclústeres de cobre se evaluaron mediante espectroscopia UV-Visible y espectroscopia de fluorescencia.

Los resultados obtenidos con espectroscopía UV-Visible se muestran en la Figura 8. Se observa que existe un hombro en el espectro UV-visible a 325 ± 10 nm lo que confirma la existencia de los nanoclústeres.

Los resultados obtenidos con espectroscopía de fluorescencia se muestran en la Figura 9. La fluorescencia de los nanoclústeres de cobre existe con una longitud de onda de excitación y emisión de 380 ± 15 nm y 460 ± 15 nm respectivamente, lo que confirma la existencia de los nanoclústeres.

15 Los nanoclústeres de cobre de la invención tienen propiedades ópticas, en particular fluorescencia, que son características de esta escala intermedia entre molécula y nanopartícula.

[0067] Estabilidad de los Nanoclústeres de Cobre

La estabilidad de los nanoclústeres de cobre se evaluó mediante difusión dinámica de luz (ángulo de 173° , láser de 530 nm, temperatura de 25°C en un Malvern Nanosizer).

Los análisis se realizaron en las muestras obtenidas como resultado del protocolo de solución y como resultado del protocolo de fase sólida.

Más específicamente, en relación con el protocolo de solución, los análisis se realizaron en las soluciones de nanoclústeres de cobre 1X, 2X y 4X.

25 En cuanto al protocolo de fase sólida, los análisis se realizaron sobre las muestras liofilizadas y sobre las soluciones reconstituidas después de la liofilización, almacenadas o no bajo nitrógeno. La estabilidad de los nanoclústeres se conserva en un entorno libre de oxígeno molecular.

Los resultados no son los mismos dependiendo de si los nanoclústeres de cobre se almacenan en forma líquida o sólida.

Para el protocolo sintético en solución, se observa que la estabilidad de los nanoclústeres de cobre en solución varía hasta:

- 140 días para nanoclústeres de cobre preparados a partir de una solución de acetato de cobre 1X y 2X;

35 - 40 días para nanoclústeres de cobre preparados a partir de una solución de acetato de cobre 4X.

Para el protocolo sintético de fase sólida, la estabilidad de los nanoclústeres de cobre liofilizados se observa durante al menos 12 meses para su almacenamiento bajo nitrógeno a 4°C. La medida del diámetro hidrodinámico de los nanoclústeres de cobre a los 12 meses de almacenamiento es 1,6 nm.

5 [0068] Ejemplo 3:

[0069] Pruebas *in vivo* en Ratones

[0070] Descripción General

- Las pruebas se realizaron *in vivo* en el modelo de ratón ATP7A-Mo^{blo}, que tiene una mutación espontánea del gen del síndrome de Menkes, el gen ATP7A que codifica la ATPasa 7A. El gen del síndrome de Menkes se encuentra en el cromosoma X. Las hembras heterocigotas son viables y fértiles. En cuanto a los machos, son sanos (alelo X silvestre normal) o hemicigotos (portadores de la mutación en el cromosoma X) y, por tanto, padecen el síndrome de Menkes. La mayoría de los animales hemicigotos tienen un nivel defectuoso de reticulación de elastina y también un déficit de colágeno, lo que explica las roturas tempranas de aneurismas aórticos y enfisema pulmonar y que supone una mortalidad en torno a las cinco semanas de vida. La absorción de cobre en el intestino se reduce en un 64% y la concentración de cobre en el hígado se reduce en un 56%. Los machos también tienen un déficit cerebral de noradrenalina, causado por el déficit cerebral de dopamina-beta hidroxilasa, que es una enzima dependiente del cobre.
- Las hembras heterocigotas tienen un fenotipo moderado con manchas hipopigmentadas irregulares en un pelaje con zonas oscuras y zonas claras alternas. Tienen un metabolismo y comportamiento normal, por lo que son capaces de reproducirse.
- Los machos sanos tienen un pelaje negro mientras que los machos hemicigotos tienen un pelaje claro, sin marcas. Además, los machos hemicigotos tienen poco peso, generalmente son pequeños y en ocasiones tienen las extremidades posteriores deformadas.

[0071] Pruebas Realizadas

- Las soluciones de nanoclústeres de cobre 1X, 2X y 4X, como las resultantes del Ejemplo 1 (protocolo de solución), se inyectaron respectivamente en ratones macho mediante inyección subcutánea en la parte posterior del cuello. Se estudiaron cinco grupos de animales de cinco semanas de edad (definidos a continuación).
- 1) Grupo **TS**: ratones silvestres ("Tipo Silvestre") (machos sanos), que no tienen una mutación en el gen ATP7A en el cromosoma X, fueron tratados al inicio del protocolo para evaluar una posible toxicidad del excipiente utilizado para administrar el nanoclúster de cobre.
- 2) Grupo **HE NT**: los ratones hemicigotos (HE), que tienen una mutación del gen ATP7A

presente en el cromosoma X, no reciben tratamiento y sirven como control.

3) Grupo **HE 1X**: los ratones hemicigotos se tratan con una solución de nanoclúster de cobre (dosis inicial: 1X), que se administró tres días por semana.

4) Grupo **HE 2X**: los ratones hemicigotos se tratan con una solución de nanoclúster de cobre 2X (dosis 1X duplicada), que se administró tres días por semana.

5) Grupo **HE 4X**: los ratones hemicigotos se tratan con una solución de nanoclúster de cobre 4X (dosis 1X cuádruplicada), que se administró tres días o cinco días por semana.

[0072] Análisis de cobre cerebral y ratones hemicigotos

Los resultados obtenidos para la concentración de cobre cerebral se muestran en la Figura 10. Se entiende por “cobre cerebral” el cobre analizado en un homogeneizado de cerebro completo. El cobre se mide mediante espectrometría de absorción atómica (Espectrómetro de Absorción Atómica PinAAcle 900T, Perkin Elmer). En esta figura se puede ver que la concentración de cobre cerebral se correlaciona con la dosis de nanoclústeres administrada a los animales. La concentración cerebral de cobre aumenta con el aumento de la dosis. Los ratones tratados con la dosis 4X, cinco días a la semana, tienen una concentración de cobre cerebral mucho mayor que los tratados con la dosis 4X, pero tres días a la semana.

[0073] Esperanza de Vida de Ratones Hemicigotos

Los resultados obtenidos para la supervivencia de ratones hemicigotos se muestran en la Figura 11. Los animales que no fueron tratados o tratados con dosis bajas (1X y 2X) tienen una expectativa vida que no supera los 45 días mientras que los animales con la dosis 4X por tres días o cinco días a la semana tienen una expectativa vida mucho mejor, porque la mayoría de estos animales siguen vivos a más de 100 días de vida. Además, no se observaron reacciones adversas en los ratones, ni siquiera en el grupo tratado con la dosis 4X. No se observó ninguna anomalía tisular en los tejidos estudiados después del sacrificio de los animales.

[0074] Análisis de la Motricidad de Ratones Hemicigotos

Se observó una diferencia en la actividad motora de los animales entre los ratones silvestres y los hemicigotos. Con el envejecimiento, los ratones hemicigotos no tratados tuvieron una reducción notable de su actividad global (reducción de la actividad motora, atonía, imposibilidad de mantenerse erguidos, etc.). De hecho, los ratones experimentaron algunas dificultades para moverse y alimentarse. Esto se ve como una dificultad para llegar al comedero con la imposibilidad de mantenerse erguidos como lo hacen los ratones silvestres.

Cuando los ratones hemicigotos fueron tratados con la solución de nanoclústeres de cobre en la dosis 1X, se observó una disminución progresiva de la actividad, lo que condujo a

una dominancia de los animales de tipo silvestre. En este caso, los ratones hemicigotos estaban postrados en un rincón y no se movían.

Por el contrario, en el grupo de ratones hemicigotos tratados con la solución de nanoclústeres de cobre en la dosis 4X, se observó una gran mejora en la actividad general.

- 5 Los ratones tratados con la dosis 4X se mantuvieron erguidos y saltaban más fácilmente. Esto muestra una mejora de la forma física de los ratones tratados con la solución de nanoclústeres de cobre en la dosis 4X.

[0075] Análisis de la Pigmentación del Pelaje mediante Microscopio Óptico.

- El pelaje es un buen indicador del estado metabólico de los ratones. A continuación, se
- 10 analiza la pigmentación del pelaje, que es un aspecto muy observable en ratones hemicigotos. En ratones hemicigotos tratados con una solución de nanoclústeres de cobre en la dosis 4X, se observa al microscopio óptico una alternancia de zonas oscuras y claras en el pelaje; esto podría corresponder a la periodicidad de las inyecciones administradas anteriormente. De hecho, la administración de cobre mediante la solución de nanoclústeres
- 15 de cobre restablece la producción de melanina, porque depende de la actividad de la tirosinasa que es una cuproproteína. Es la mejora de esta función enzimática la que está en el origen de la mejora de la coloración del pelaje de los ratones.

[0076] Tinción del Cobre con Rodanina: Resultados Preliminares

- El estudio anatomopatológico del contenido de cobre de los distintos tejidos, mediante
- 20 tinción con rodanina, sirvió para demostrar la ausencia de acumulación patológica de cobre en los distintos tejidos estudiados (hígado, riñón, cerebro). Con el objetivo de detectar la presencia o ausencia de cobre en los órganos de almacenamiento como el hígado y el riñón o en los órganos donde es necesario observar afecciones notables como el cerebro, se marcó el cobre mediante una tinción de rodanina, con la que se pueden detectar
- 25 depósitos de cobre dentro de los tejidos objetivo. Este estudio también sirvió para identificar una posible toxicidad (en hígado y riñones) al mostrar lesiones histológicas de estos órganos relacionadas con la presencia de cobre en las células hepáticas y/o renales. Estos estudios se realizaron en ratones hemicigotos que no fueron tratados y tratados con la dosis de nanoclúster de cobre 2X. Los resultados observados se muestran en las Figuras
- 30 12 (riñón) y 13 (hígado).

El análisis de patología anatómica del riñón (Figura 12) muestra la presencia de pequeños depósitos de cobre alrededor del riñón de los animales tratados con las dosis 2X (figura superior derecha) sin que exista toxicidad tisular aparente cerca del tejido renal (figura inferior derecha).

- 35 El análisis de patología anatómica del hígado (Figura 13) muestra la presencia de pequeños depósitos de cobre alrededor del hígado de los animales tratados con la dosis

2X (figura superior derecha) sin que se aprecie toxicidad tisular cercana al tejido hepático (figura inferior derecha).

Estos datos muestran que, de hecho, se produce una captura de cobre por los tejidos, sin provocar toxicidad celular en el riñón y el hígado con la dosis de tratamiento 2X.

5 **[0077]** Análisis de la Cadena Respiratoria Cerebral

[0078] La respiración celular es una de las funciones alteradas cuando hay deficiencia de cobre. Se ha demostrado que un fallo en la inserción del cobre en la cadena respiratoria conduce a un defecto de funcionalidad del complejo I y del complejo IV y también a un defecto de la fosforilación oxidativa. En el síndrome de Menkes, las zonas cerebrales afectadas son principalmente los ganglios basales. Debido a esto, se midió la respiración mitocondrial en el estrato de los ratones incluidos en el estudio (ratones silvestres, ratones hemicigotos no tratados, ratones hemicigotos tratados con la dosis 2X) mediante oxígeno de alta resolución (Oroboros, O2k, Laboratoire NGERE). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. En esta figura, se puede observar una clara mejora de la actividad de la cadena respiratoria en los ratones tratados (curva superior) en comparación con los ratones no tratados (curva inferior). Esta mejora es particularmente visible en torno al complejo IV (C IV), que comprende las proteínas relacionadas con el cobre.

El análisis de la actividad de la cadena respiratoria cerebral es un índice del restablecimiento de actividades relacionadas con las cuproproteínas cerebrales. De hecho, la actividad del complejo IV en la cadena respiratoria depende de la presencia de cuproproteínas funcionales. Por lo tanto, la restauración de esta actividad del complejo IV (Figura 14) muestra que los nanoclústeres de cobre permiten la penetración del cobre en el cerebro y que, por lo tanto, atraviesan la barrera hematoencefálica. El cobre así disponible puede utilizarse en las neuronas para restablecer una actividad enzimática dependiente del cobre.

[0079] Conclusión

Las pruebas *in vivo* realizadas en ratones muestran que:

- El tratamiento con nanoclústeres de cobre permite mejorar la concentración de cobre cerebral en los animales tratados.
- El aumento de la concentración cerebral de cobre permite mejorar la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria que depende de la presencia de cobre.

Estos datos muestran que los nanoclústeres de cobre atraviesan la barrera hematoencefálica y que el cobre está biodisponible para restaurar la actividad enzimática cerebral que depende de la presencia de cobre. Además, la administración de nanoclústeres de cobre contribuye a la supervivencia de los animales tratados.

[0080] Ejemplo 4: Ejemplo Comparativo

[0081] Preparación de Nanoclústeres de Cobre a partir de Cloruro de Cobre o Sulfato de Cobre

5

Los inventores prepararon nanoclústeres de cobre sustituyendo el acetato de cobre por cloruro de cobre o sulfato de cobre. El protocolo utilizado es el protocolo de solución descrito en el Ejemplo 1, la única diferencia radica en el uso de cloruro de cobre o sulfato de cobre en lugar de acetato de cobre.

10 Se preparan respectivamente soluciones de cloruro de cobre 1X o sulfato de cobre 1X para obtener respectivamente soluciones de nanoclústeres de cobre 1X.

La concentración de cobre de cada una de las soluciones de nanoclústeres de cobre resultantes, posiblemente dializadas, es de 16 µg/mL.

15 Se comparan en términos de estabilidad las tres soluciones de nanoclústeres de cobre 1X obtenidas respectivamente a partir de acetato de cobre, cloruro de cobre o sulfato de cobre.

La estabilidad se evaluó mediante difusión dinámica de luz como se indica en el Ejemplo 2 anterior. Los resultados obtenidos mostraron una estabilidad mucho mayor, al monitorear los cambios en el diámetro hidrodinámico en función del tiempo, cuando se usa acetato de cobre en comparación con cloruro de cobre o sulfato de cobre. Como se indica en el

20 Ejemplo 2, los nanoclústeres de cobre en solución de la invención tienen una estabilidad que varía hasta 140 días mientras que la estabilidad de los nanoclústeres de cobre en solución resultantes del cloruro de cobre es de sólo dos días y la de los nanoclústeres de cobre en solución resultantes del sulfato de cobre es solo cuatro días. De hecho, midiendo el diámetro hidrodinámico en función del tiempo, éste aumentó mucho (más de 100 nm
25 después de dos días o después de cuatro días cuando los nanoclústeres de cobre se preparan respectivamente a base de cloruro de cobre o de sulfato de cobre), mostrando así la desestabilización de nanoclústeres de cobre.

[0082] Comparación de Nanoclústeres de Cobre de la Invención con los Nanoclústeres de Cobre Descritos en el Documento CN 105.965.028

30 El ejemplo 9 del documento chino describe la preparación de clústeres de cobre a partir de 0,01 mol/l de acetato de cobre, 0,1 mol/l de histidina y 0,1 mol/l de ácido ascórbico. Los inventores reprodujeron de forma idéntica el protocolo descrito en este ejemplo. Las síntesis se realizaron tres veces en total. Las mezclas líquidas de clústeres de cobre obtenidas como resultado de cada una de las tres síntesis se almacenaron
35 respectivamente en tres tubos de ensayo graduados con tapones atornillados y se

denominan Lote 1, Lote 2 y Lote 3.

El diámetro hidrodinámico (Dh) de los clústeres de cobre de cada uno de los lotes se evaluó inmediatamente después de su síntesis, mediante difusión dinámica de luz (ángulo 173°, láser 530 nm, temperatura 25°C en un Malvern Nanosizer). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15 donde se puede observar que el diámetro hidrodinámico de cada uno de los tres lotes varía de 70 a 120 nm. Por lo tanto, estos diámetros hidrodinámicos no permiten describir los clústeres del documento chino como “nanoclústeres”.

Luego se almacenaron los Lotes 1 a 3 durante 24 horas a 4°C en la oscuridad. El análisis del diámetro hidrodinámico (DH) se reinició al cabo de 24 horas después de su síntesis. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. En esta figura solo se pueden ver dos curvas porque el Lote 1 está superpuesto al Lote 2. Se puede ver en la Figura 16 que el diámetro hidrodinámico ha aumentado mucho, lo que muestra una mala estabilización de los clústeres y una alta tendencia a la agregación. Este hallazgo de la mala estabilidad y la agregación se ve desde un punto de vista macroscópico en la Figura 17 en los tubos en los que se almacenaron los clústeres.

En conclusión, las partículas resultantes según el protocolo del documento chino no son nanoclústeres (tamaño superior a 2 nm) y no son estables.

[0083] La presente divulgación no se limita a los ejemplos descritos, a modo de ejemplo, anteriormente, sino que engloban todas las variantes que podrían ser concebidas por el experto en la técnica en el contexto de la protección buscada.