

Description

Titre : Nanoclusters de cuivre, leurs procédés d'obtention et leur application dans le traitement de la maladie de Menkes

Domaine technique

- 5 [0001] La présente divulgation relève du domaine de la chimie, et plus particulièrement de la chimie pharmaceutique. L'invention concerne des nanoclusters de cuivre, leurs procédés d'obtention et leurs applications dans le traitement de maladies impliquant un déficit en cuivre, et plus particulièrement dans le traitement de la maladie de Menkes.

Technique antérieure

- 10 [0002] La maladie de Menkes est une maladie génétique rare de transmission liée à l'X (X 21.1), qui touche essentiellement les garçons et qui a une occurrence correspondant à une naissance sur 300 000 en Europe, soit deux naissances chaque année en France. La maladie de Menkes est consécutive à un déficit en cuivre chez le patient. Le cuivre est un oligo-élément clé rentrant dans la composition de nombreuses enzymes clés du
- 15 métabolisme et est donc indispensable à la survie de l'organisme. Dans le cas de la maladie de Menkes, un transporteur du cuivre, la protéine ATPase 7A, n'est pas fonctionnelle. De ce fait, le cuivre apporté par l'alimentation ne peut être absorbé, ce qui entraîne un déficit profond en cuivre de l'organisme. De plus, ce transporteur permet le passage du cuivre dans le cerveau, ce qui fait que l'administration de cuivre au niveau sanguin ne peut guérir
- 20 ces patients car cela ne traite pas l'atteinte neurologique de la maladie. Outre le retard profond du développement psychomoteur, les enfants atteints de la maladie de Menkes présentent une hypotonie majeure, une épilepsie rebelle aux traitements anticonvulsivants, des épisodes d'hypothermie, d'hypotension etc. Il existe aussi des anomalies cutanéophanériennes avec un défaut de pigmentation, une peau pâle et sèche, des cheveux
- 25 fragiles, secs et anormaux (Kinky hairs). Il peut également y avoir des anomalies vasculaires causant des hématomes sous-duraux ainsi que des problèmes de minéralisation osseuse. A ce jour la maladie de Menkes reste incurable et le décès survient en général précocement dans l'enfance (durée de vie inférieure à 5 ans).

- [0003] La seule option thérapeutique disponible concerne l'utilisation d'un complexe cuivre-histidine (l'histidinate de cuivre) fourni par l'Agence Générale des Equipements et Produits de Santé (AGEPS) de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP). Ce produit est administré par voie parentérale (sous-cutanée). Ce traitement rend le cuivre disponible dans le compartiment sanguin, mais, comme cela est expliqué ci-dessus, ne permet pas son passage au niveau du cerveau et ne guérit donc pas l'atteinte neurologique de cette
- 30 maladie. Le document « Sr Sheela et al, Clinical Genetics, Wiley-Blackwell Munksgaard,
- 35

Dk, vol. 68, No. 3, 11 août 2005, pages 278-283 » est une étude indienne effectuée sur un enfant indien âgé de 15 mois, qui souffre de la maladie de Menkes, et qui est traité par des injections quotidiennes sous-cutanées de cuivre histidine pendant deux ans et demi. Le traitement permet d'éliminer les crises d'épilepsie et conduit à une pigmentation améliorée de la peau et des cheveux. Cependant l'enfant continue à manifester des retards graves de développement.

[0004] Il n'existe donc pas à ce jour de solution satisfaisante pour améliorer l'espérance de vie des enfants atteints de la maladie de Menkes et/ou pour améliorer leur qualité de vie. La présente divulgation vient améliorer la situation puisqu'elle propose une solution visant notamment à remédier aux inconvénients susmentionnés.

[0005] Les Inventeurs ont eu l'idée originale de proposer l'utilisation de nanoclusters de cuivre dans le traitement de la maladie de Menkes. En effet, à la connaissance des Inventeurs, personne à ce jour n'a pensé à utiliser des nanoclusters de cuivre pour le traitement de cette maladie. A cet égard les Inventeurs ont mis au point un procédé de synthèse original de nanoclusters de cuivre. Divers procédés de synthèse ont été décrits dans la littérature pour obtenir des nanoclusters, et en particulier des nanoclusters de cuivre. Ainsi dans le document de Hu Yanling et al. (« Microchimica Acta, Springer Vienna, Vol. 186, no. 1, 7 décembre 2018, p. 1-8 ») des nanoclusters de cuivre ont été synthétisés à partir d'histidine, de chlorure de cuivre et d'acide ascorbique. Ces nanoclusters de cuivre, décrits comme ayant de très bonnes propriétés de fluorescence, présentent une forme sphérique et un diamètre d'environ 3 à 4 nm, ledit diamètre étant évalué par microscopie électronique à transmission. Dans le document CN 105 965 028 des clusters de platine, d'argent, d'or et de cuivre sont décrits pour leur utilisation dans la détection d'ions de fer par fluorescence/luminescence. Il est notamment décrit dans ce document que des clusters de cuivre, synthétisés à partir d'histidine, d'acétate de cuivre et d'acide ascorbique, présentent une taille moyenne de particules de 1,9 nm, ladite taille étant mesurée par microscopie électronique à transmission. Ce document est silencieux quant à la stabilité des clusters obtenus.

Résumé

[0006] La présente divulgation propose des nanoclusters de cuivre pour leur utilisation dans le traitement de la maladie de Menkes. En effet, les nanoclusters de cuivre objets de la présente invention sont aptes à passer la barrière hémato-encéphalique, et donc à apporter du cuivre au cerveau des patients. De plus, ils ne s'accumulent pas, aux doses actuellement utilisées sur modèle murin, dans les organes tels que le foie, la rate, les reins ou les

poumons. Les nanoclusters de cuivre de l'invention présentent encore plusieurs autres propriétés avantageuses qui seront décrites plus en détails ci-après.

[0007] Les nanoclusters de l'invention, de par leurs propriétés avantageuses, sont donc des candidats prometteurs pour améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients souffrant de la maladie de Menkes.

[0008] Un autre but de l'invention est de proposer un procédé simple et rapide de synthèse des nanoclusters de l'invention.

[0009] La présente invention a pour objet des nanoclusters de cuivre caractérisés en ce qu'ils :

- 10 - sont recouverts à leur surface d'une couche mixte comprenant de l'histidine (His), des ions acétate (Ac) et éventuellement des ions ascorbate (Asc),
 - présentent une forme sphérique,
 - présentent un diamètre hydrodynamique allant de 0,6 à 2,0 nm, et de préférence de 1,3 nm,
- 15 - présentent un diamètre de cœur métallique allant de 0,5 à 1,5 nm, et de préférence de 1,0 nm,
 - présentent une stabilité dans le temps allant de 5 à 12 semaines, lorsque les nanoclusters sont sous forme liquide,
 - présentent une stabilité dans le temps d'au moins 12 mois, et de préférence de 12 à 18
- 20 mois lorsque les nanoclusters sont sous forme sèche,
 - présentent des propriétés spectrophotométriques, avec un épaulement sur le spectre UV-Visible à 325 ± 10 nm et un spectre de fluorescence avec des longueurs d'onde d'excitation allant de 365 à 395 nm et des longueurs d'onde d'émission allant de 445 à 475 nm, lesdits nanoclusters de cuivre étant désignés par la formule « CuNC@HisAc » ou par la
- 25 formule « CuNC@HisAcAsc ».

Les nanoclusters de cuivre objets de l'invention sont des nanoclusters métalliques. Un nanocluster métallique consiste en l'association de dizaines d'atome d'élément métallique (en l'occurrence le cuivre dans l'invention) avec un diamètre de cœur métallique inférieur ou égal à 2,0 nanomètres (nm).

- 30 Les nanoclusters CuNC@HisAc de l'invention sont constitués d'un cœur métallique de cuivre couvert/recouvert/entouré d'une couche/couronne mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et éventuellement des ions ascorbate. On peut employer indifféremment dans la demande les termes « couronne » ou « couche » comprenant de l'histidine, des ions acétate et éventuellement des ions ascorbate. Le terme « mixte » est employé pour
- 35 indiquer que la couronne ou la couche qui entoure le cœur de cuivre comprend à la fois de l'histidine, des ions acétate et éventuellement des ions ascorbate. De même, on peut

employer indifféremment les verbes « couvrir/recouvrir/entourer » pour indiquer que le cœur de cuivre comprend sur l'ensemble de sa surface une couche/couronne d'histidine, d'ions acétate et éventuellement d'ions ascorbate. L'ensemble du nanocluster de cuivre CuNC@HisAc présente une forme sphérique.

- 5 La formule « CuNC@HisAc » au sens de l'invention désigne un nanocluster constitué d'un cœur métallique de cuivre recouvert d'une couche mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et éventuellement des ions ascorbate. Ainsi la formule « CuNC@HisAc » sans autre précision dans la présente demande englobe également la formule « CuNC@HisAcAsc » qui est un mode de réalisation particulier d'un nanocluster de cuivre
- 10 de l'invention, à savoir un nanocluster constitué d'un cœur métallique de cuivre recouvert d'une couche mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et des ions ascorbate. La couronne mixte comprenant l'histidine, les ions acétate et éventuellement les ions ascorbate confère notamment aux nanoclusters de l'invention une très grande stabilité et une faible réactivité.
- 15 Une « faible réactivité » signifie une faible dégradation en particulier liée à l'oxydation (par exemple due au dioxygène de l'air). Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, la couche/couronne mixte entourant le cœur métallique de cuivre comprend de l'histidine, des ions acétate et des ions ascorbate. Les nanoclusters de cuivre de l'invention comprennent
- 20 ainsi avantageusement trois ligands à la surface du cœur cuivre, à savoir l'histidine, l'acétate et l'ascorbate. Ces ligands histidine, ions acétate et ions ascorbate sont liés au cœur métallique de cuivre par des liaisons de coordination. La stabilité des nanoclusters de l'invention signifie un maintien de la structure et des propriétés des nanoclusters dans le temps à une température de conservation de 4°C. Le maintien de la structure signifie
- 25 notamment que la composition du nanocluster (cœur métallique entouré de la couche/couronne mixte telle que ci-dessus définie), sa forme et son diamètre (de cœur métallique et hydrodynamique) sont conservés au cours du temps. La « forme liquide » des nanoclusters de cuivre désigne une solution ou un mélange liquide de nanoclusters de cuivre. La stabilité de 5 à 12 semaines mentionnée ci-dessus concerne
- 30 les nanoclusters de cuivre sous forme liquide. On entend par « forme sèche » une forme solide qui peut être réduite en poudre si nécessaire. La stabilité de 12 à 18 mois mentionnée ci-dessus concerne les nanoclusters de cuivre sous forme sèche. En fonction de leur forme (liquide ou solide), leur stabilité dans le temps sera donc différente.
- 35 Les nanoclusters de l'invention présentent des propriétés spectrophotométriques, en particulier de fluorescence, qui sont caractéristiques de cette échelle, à savoir un diamètre de cœur métallique inférieur ou égal à 2 nm, qui est intermédiaire entre la molécule et la

nanoparticule.

Le diamètre de cœur métallique ou diamètre métallique désigne, comme son nom l'indique, le diamètre formé par le métal cuivre.

Le diamètre hydrodynamique prend en compte le diamètre du cœur cuivre et de sa
5 couche/couronne comprenant l'histidine, les ions acétate et éventuellement les ions ascorbate. Le diamètre hydrodynamique désigne donc le diamètre du nanocluster de cuivre CuNC@HisAc de l'invention.

On peut constater que les nanoclusters de l'invention présentent un diamètre de cœur
10 métallique et un diamètre hydrodynamique quasi équivalents (respectivement de 1,0 et 1,3 nm).

Les nanoclusters de l'invention sont désignés indifféremment dans la présente demande par « nanoclusters », « nanoclusters de cuivre », « nanoclusters CuNC@HisAc », étant entendu que « nanoclusters CuNC@HisAc » englobe le mode de réalisation particulier « nanoclusters CuNC@HisAcAsc ».

15 **[0010]** Selon un mode de réalisation de l'invention, les nanoclusters de cuivre se présentent sous forme liquide ou sous forme sèche.

La forme sèche des nanoclusters est avantageuse notamment en ce qu'elle permet un stockage, une conservation et un transport facile des nanoclusters de l'invention.

20 **[0011]** Selon un mode de réalisation avantageux, les nanoclusters de cuivre de l'invention sont encore caractérisés en qu'ils présentent au moins une des caractéristiques suivantes :

- ils sont aptes à passer la barrière hémato-encéphalique,
- ils présentent une bonne biodisponibilité,
- ils sont biocompatibles,
- ils sont biodégradables,
- 25 - ils sont lyophilisables,
- ils ne sont pas toxiques pour l'organisme humain,
- ils ne s'accumulent pas dans les organes tels que le foie, la rate, les reins ou les poumons.

Selon un mode de réalisation avantageux, les nanoclusters de cuivre de l'invention présentent l'ensemble des caractéristiques ci-dessus décrites.

30 Le fait que les nanoclusters de l'invention ne soient pas séquestrés dans les dits organes est notamment dû à leur faible taille (diamètre hydrodynamique inférieur ou égal à 2,0 nm. La taille des nanoclusters de l'invention permet une circulation dans le sang plus longue, comparée à des composés de taille plus importante.

Les nanoclusters de l'invention possèdent des propriétés de surface les rendant capable
35 de traverser la barrière hémato-encéphalique en utilisant les systèmes de transport de capillaires sanguins cérébraux. En outre, l'histidine permet notamment d'aider à l'adressage

du nanocluster au cerveau car l'histidine y est transformée en histamine.

La « bonne biodisponibilité » signifie que lorsque les nanoclusters de cuivre sont administrés par voie sous-cutanée, ils atteignent bien la circulation générale et sont bien distribués aux organes cibles.

- 5 On entend par « biocompatibilité » le fait que les nanoclusters de cuivre sont bien acceptés par les différents organes de l'organisme et permettent une restauration des fonctions biologiques liées au cuproprotéines sans être toxiques pour ces organes.

Le fait que les nanoclusters soient biodégradables signifie que leur dégradation libère des substances qui sont métabolisées ou éliminées sans problème par l'organisme (cuivre, histidine, acétate et éventuellement ascorbate).

Le fait que les nanoclusters soient lyophilisables permet notamment de les stocker, conserver et transporter facilement. Le fait que les nanoclusters soient lyophilisables est imputable au fait que les nanoclusters sont parfaitement stables. La stabilité des nanoclusters est telle que définie ci-dessus.

- 15 Les propriétés avantageuses des nanoclusters de l'invention sont notamment dues à la combinaison originale de ses constituants, à savoir le cuivre, l'histidine, les ions acétate et éventuellement les ions ascorbate. A la connaissance des Inventeurs il n'a en effet jamais été décrit à ce jour des nanoclusters de cuivre comprenant une couronne/couche mixte d'histidine, d'ions acétate et éventuellement d'ions ascorbate entourant un noyau métallique de cuivre, et qui présentent les propriétés avantageuses ci-dessus décrites.

[0012] La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation de nanoclusters de cuivre tels que ci-dessus définis, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- réaction entre de l'acétate de cuivre (II) et de l'histidine afin d'obtenir un mélange d'acétate de cuivre et d'histidine, le ratio molaire histidine/acétate de cuivre (II) étant supérieur ou égal à 50, et de préférence va de 50 à 200,
- réaction entre le mélange d'acétate de cuivre et d'histidine avec de l'acide ascorbique afin d'obtenir un mélange d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique, le ratio molaire acide ascorbique/acétate de cuivre (II) étant supérieur ou égal à 130, et de préférence va de 130 à 700,
- récupération des nanoclusters de cuivre recouverts à leur surface d'une couche mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et éventuellement des ions ascorbate.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les nanoclusters de cuivre obtenus à l'issue du procédé sont recouverts à leur surface d'une couche mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et des ions ascorbate.

Les ratios molaires tels que définis ci-dessus, respectivement entre l'histidine et l'acétate

de cuivre, et entre l'acide ascorbique et l'acétate de cuivre, sont importants en ce sens qu'ils permettent aux ligands histidine, acétate et ascorbate de se lier au cœur métallique de cuivre. On obtient de cette manière des nanoclusters comprenant trois ligands à la surface du cœur cuivre, ces trois ligands étant liés à la surface du cœur de cuivre par des liaisons

5 de coordination.

L'acide ascorbique est un réducteur. La réaction entre le mélange d'acétate de cuivre et d'histidine avec l'acide ascorbique est plus particulièrement une réaction de réduction du mélange d'acétate de cuivre et d'histidine avec de l'acide ascorbique. L'acide ascorbique permet notamment d'obtenir des nanoclusters de cuivre dépourvus de toute toxicité.

10 **[0013]** La présente invention résulte notamment de la découverte inattendue des Inventeurs que la combinaison originale des réactifs utilisés, à savoir l'acétate de cuivre, l'histidine et l'acide ascorbique, et dans les proportions telles que ci-dessus définies, permet d'obtenir des nanoclusters de cuivre aux propriétés particulièrement avantageuses.

L'excellente stabilité des nanoclusters de l'invention en est un exemple.

15 **[0014]** Selon un mode de réalisation de l'invention, les nanoclusters de cuivre peuvent être plus particulièrement préparés selon le protocole « en solution » ou selon le protocole « en phase solide ». Chacune de ces deux voies de synthèse est conforme au procédé ci-dessus décrit.

[0015] Protocole en solution

20 **[0016]** Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé de préparation tel que ci-dessus défini est plus particulièrement caractérisé en ce qu'il est effectué sous gaz inerte et en ce que :

- l'acétate de cuivre est sous forme de solution et l'histidine est sous forme de poudre,
- une solution d'acétate de cuivre et d'histidine est préparée par ajout d'histidine dans la
25 solution d'acétate de cuivre,

- la solution d'acétate de cuivre et d'histidine est ajustée à une valeur de pH allant de 11 à 13, et de préférence est de 12,

- l'acide ascorbique est sous forme de poudre,

- une solution d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique est préparée par ajout
30 d'acide ascorbique à la solution d'acétate de cuivre et d'histidine dont le pH a été ajusté aux valeurs susmentionnées,

- la solution d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique est agitée pendant 2h à 6h, et de préférence 4h, à une température allant de 35°C à 45°C, et de préférence 40°C,

- une solution comprenant des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc est obtenue à l'issue

35 de l'étape précédente d'agitation,

- la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre est éventuellement dialysée afin d'obtenir une solution purifiée de nanoclusters de cuivre,
 - la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysée, est éventuellement lyophilisée afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.
- 5 La solution comprenant les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysée, présente une stabilité dans le temps allant de 5 à 12 semaines à une température de conservation de 4°C.
- La dialyse permet notamment de supprimer tout ce qui n'est pas lié au cœur métallique de cuivre, comme par exemple éventuellement un excès d'histidine ou d'acide ascorbique ou
- 10 encore du cuivre résiduel éventuellement présent dans la solution de nanoclusters. La couche comprenant l'histidine, les ions acétate et éventuellement les ions ascorbate, est liée au cœur métallique de cuivre par des liaisons de coordination.
- La forme sèche des nanoclusters de cuivre, obtenue à l'issue de la lyophilisation, présente une stabilité dans le temps d'au moins 12 mois, et de préférence de 12 à 18 mois, à une
- 15 température de conservation de 4°C sous azote.
- La forme sèche des nanoclusters de cuivre peut être reconstituée à tout moment, par mélange dans un solvant de reconstitution, comme par exemple de l'eau purifiée. On entend par « reconstituer/reconstitution » l'opération de mélange simple de la forme sèche ou du lyophilisat avec un solvant.
- 20 L'analyse de la solution de nanoclusters de cuivre, obtenue à l'issue de la reconstitution de la forme sèche, montre que les nanoclusters de cuivre présentent l'ensemble des propriétés définies ci-dessus et sont donc exactement les mêmes que ceux directement obtenus à l'issue de leur procédé de préparation.
- La solution de nanoclusters de cuivre, obtenue à l'issue de la reconstitution de la forme
- 25 sèche, présente une stabilité dans le temps allant de 5 à 12 semaines à une température de conservation de 4°C.
- [0017]** Le procédé de préparation tel que ci-dessus défini est encore caractérisé en qu'il comprend en outre au moins une caractéristique choisie parmi :
- le gaz inerte est de l'azote,
- 30 - la solution d'acétate de cuivre est préparée par ajout d'acétate de cuivre dans de l'eau ultra pure filtrée,- la solution d'acétate de cuivre présente une concentration allant de 0,5 à 5,0 mM,
- la concentration d'histidine est supérieure à la concentration de la solution d'acétate de cuivre,

35 - le pH de la solution d'acétate de cuivre et d'histidine est ajusté à l'aide d'hydroxyde de sodium,

- la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc, éventuellement dialysée, présente une concentration en cuivre allant de 16 à 160 µg/mL,
 - la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre , éventuellement dialysée, est lyophilisée afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.
- 5 Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention présente l'ensemble des caractéristiques ci-dessus décrites.

[0018] Protocole en phase solide

- [0019]** Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé de préparation tel que ci-dessus défini est plus particulièrement caractérisé en ce que :
- 10 - l'acétate de cuivre est sous forme de poudre et l'histidine est sous forme de poudre,
- un mélange pulvérulent d'acétate de cuivre et d'histidine est obtenu par mélange de chacune des poudres d'acétate de cuivre et d'histidine,
 - le mélange pulvérulent d'acétate de cuivre et d'histidine est broyé jusqu'à obtention d'un mélange pulvérulent homogène en couleur,
- 15 - le mélange pulvérulent homogène d'acétate de cuivre et d'histidine est placé dans un réacteur,
- l'acide ascorbique est sous forme de poudre,
 - l'acide ascorbique est ajouté dans le réacteur comprenant le mélange pulvérulent homogène d'acétate de cuivre et d'histidine,
- 20 - le mélange pulvérulent d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique ainsi obtenu est mis sous agitation, puis de l'eau est ajoutée goutte à goutte dans le réacteur, ladite eau étant de l'eau ultra pure filtrée,
- le réacteur est mis sous gaz inerte et à l'abri de la lumière,
 - le mélange d'acétate de cuivre, d'histidine, d'acide ascorbique et d'eau est maintenu sous
- 25 agitation dans le réacteur pendant 16h à 36h, et de préférence 24h,
- un mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc est obtenu à l'issue de l'étape précédente d'agitation,
 - le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre est éventuellement dialysé afin d'obtenir un mélange liquide purifié de nanoclusters de cuivre,
- 30 - le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysé, est éventuellement lyophilisé afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.
- Les données de stabilité décrites ci-dessus pour les nanoclusters de cuivre, sous forme liquide ou sous forme sèche, obtenus à l'issue du protocole solution sont valables pour les nanoclusters de cuivre sous forme liquide ou sous forme sèche obtenus à l'issue du
- 35 protocole en phase solide.
- La poudre d'acétate de cuivre ci-dessus utilisée est de couleur bleue et la poudre d'histidine

est de couleur blanche. Lorsque ces deux poudres sont mélangées on cherche à obtenir une poudre de couleur bleu clair la plus homogène possible.

[0020] Le procédé de préparation tel que ci-dessus défini est encore caractérisé en qu'il comprend en outre au moins une caractéristique choisie parmi :

- 5 - la concentration d'histidine est supérieure à la concentration d'acétate de cuivre,
- l'eau ajoutée dans le réacteur est de l'eau ultra pure filtrée,
- le gaz inerte est de l'azote,
- le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysé, présente une concentration en cuivre allant de 1600 à 4000 µg/mL,
- 10 - le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysé, est lyophilisé afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.

Le lyophilisat est conservé sous azote.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention présente l'ensemble des caractéristiques ci-dessus décrites.

- 15 **[0021]** Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la forme sèche de nanoclusters de cuivre obtenue à l'issue de la lyophilisation (selon le protocole « solution » ou le protocole « en phase solide ») est conservée sous azote, de préférence dans des flacons, et de préférence à 4°C. Dans de telles conditions, la poudre de nanoclusters de cuivre pourra être conservée pendant une durée d'au moins 12 mois, et de préférence de 12 à 18
- 20 mois, sans altération de la stabilité des nanoclusters de cuivre.

La reconstitution de la poudre de nanoclusters à l'issue de cette période montre que les nanoclusters sont exactement les mêmes que ceux directement obtenus à l'issue de leur préparation (selon le protocole « solution » ou le protocole « en phase solide »). En effet les nanoclusters de cuivre présentent l'ensemble des propriétés définies ci-dessus.

- 25 **[0022]** Selon un autre aspect, la présente invention a également pour objet des nanoclusters de cuivre tels que ci-dessus définis ou obtenus selon les procédés tels que ci-dessus définis, pour une utilisation comme médicament.

- [0023]** La présente invention a plus particulièrement pour objet des nanoclusters de cuivre tels que ci-dessus définis ou obtenus selon les procédés tels que ci-dessus définis pour
- 30 une utilisation dans le traitement des pathologies liées à un déficit en cuivre.

[0024] A titre d'exemple(s) de pathologies liées à un déficit en cuivre, on pourra plus particulièrement citer la maladie de Menkes.

[0025] Les nanoclusters de cuivre de l'invention sont plus particulièrement destinés aux patients atteints d'un déficit en ATPase7A.

- 35 Parmi les patients atteints d'un déficit en ATPase7A, on pourra citer les patients atteints de

la maladie de Menkes, à savoir les enfants. Selon un mode de réalisation de l'invention, les nanoclusters de cuivre sont donc plus particulièrement destinés à une utilisation pédiatrique. Cependant, parmi les patients atteints d'un déficit en ATPase7A, on pourra également citer des patients adultes atteints de la forme atténuée de la maladie de Menkes, à savoir des patients adultes souffrant d'un syndrome de la corne occipitale (SCO). Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les nanoclusters de cuivre sont également adaptés pour une utilisation dans le traitement du syndrome de la corne occipitale.

[0026] L'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique renfermant une quantité thérapeutiquement efficace des nanoclusters de cuivre tels que ci-dessus définis ou obtenus selon les procédés tels que ci-dessus définis.

La quantité de nanoclusters de cuivre pourra varier selon le mode d'administration envisagé, l'âge et le poids du patient.

[0027] Les nanoclusters de cuivre ou la composition pharmaceutique de l'invention pourront se présenter sous une forme appropriée pour être administrés par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les nanoclusters de cuivre sont sous une forme adaptée à une administration par voie sous-cutanée, de préférence une fois par jour.

[0028] Selon un mode de réalisation avantageux, les nanoclusters de cuivre ou la composition pharmaceutique de l'invention sont sous une forme adaptée à une administration continue via une pompe sous-cutanée.

A titre d'exemple, la pompe sous-cutanée est utilisée depuis de nombreuses années dans le traitement du diabète de l'enfant. Le médicament est ainsi administré en continu, via une pompe, que le patient porte sur lui, et qui administre, via un cathéter sous-cutané, le médicament de façon continue.

[0029] L'invention concerne également une méthode de traitement thérapeutique de la maladie de Menkes comprenant l'administration chez un sujet d'une quantité thérapeutiquement efficace de nanoclusters de cuivre ou d'une composition pharmaceutique telle que ci-dessus définie.

Brève description des dessins

[0030] D'autres caractéristiques, détails et avantages apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après, et à l'analyse des dessins annexés, sur lesquels :

Fig. 1

[0031] [Fig. 1] est une représentation schématique d'un nanocluster de cuivre CuNC@HisAc de l'invention, constitué d'un cœur métallique de cuivre entouré d'une couronne mixte comprenant de l'histidine et de l'acétate.

Fig. 2

- 5 [0032] [Fig. 2] est une représentation schématique d'un nanocluster de cuivre CuNC@HisAcAsc de l'invention, constitué d'un cœur métallique de cuivre entouré d'une couronne mixte comprenant de l'histidine, de l'acétate et de l'ascorbate.

Fig. 3

- 10 [0033] [Fig. 3] est une analyse par chromatographie ionique des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc, montrant la présence d'ions d'acétate à la surface du cœur métallique de cuivre.

Fig. 4

[0034] [Fig. 4] est une analyse en spectrophotométrie infrarouge montrant la présence d'ions ascorbate à la surface du cœur métallique de cuivre.

- 15 **Fig. 5**

[0035] [Fig. 5] illustre le diamètre hydrodynamique (en nanomètre) des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc évalué par diffusion dynamique de la lumière.

Fig. 6

- 20 [0036] [Fig. 6] illustre le diamètre métallique (en nanomètre) des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc évalué par microscopie électronique à transmission.

Fig. 7

[0037] [Fig. 7] illustre le diamètre hydrodynamique (en nanomètre) des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc évalué par dispersion de Taylor.

Fig. 8

- 25 [0038] [Fig. 8] est un spectre UV-Visible des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc.

Fig. 9

[0039] [Fig. 9] est un spectre de fluorescence des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc.

Fig. 10

- 30 [0040] [Fig. 10] représente la concentration cérébrale de cuivre (en µg/g) chez des souris en fonction du traitement (traité ou non traité) et de la dose de nanoclusters de cuivre reçue : WT (« Wild-type »), NT (souris hémizygotiques non traitées), 4X 3x/semaine (souris

hémizygotes traitées à la dose de nanoclusters de cuivre 4x, injectée 3 jours par semaine) et 4X 5x/semaine (souris hémizygotes traitées à la dose de nanoclusters de cuivre 4x, injectée 5 jours par semaine). Le nombre de souris traitées est indiqué pour chaque groupe de souris par la lettre n.

5 **Fig. 11**

[0041] [Fig. 11] représente la survie des animaux sur une courbe de Kaplan-Meier en fonction du traitement (traité ou non traité) et de la dose de nanoclusters de cuivre reçue : WT (« Wild-type »), NT (souris hémizygotes non traitées), 1X (souris hémizygotes traitées à la dose de nanoclusters de cuivre 1x, injectée 3 jours par semaine), 2X (souris hémizygotes traitées à la dose de nanoclusters de cuivre 2x, injectée 3 jours par semaine), 4X 3x/semaine (souris hémizygotes traitées à la dose de nanoclusters de cuivre 4x, injectée 3 jours par semaine) et 4X 5x/semaine (souris hémizygotes traitées à la dose de nanoclusters de cuivre 4x, injectée 5 jours par semaine). Le nombre de souris traitées est indiqué pour chaque groupe de souris par la lettre n.

15 **Fig. 12**

[0042] [Fig. 12] montre un marquage histologique du cuivre par coloration à la rhodanine sur une coupe de tissus de reins issus de souris hémizygotes non traitées (HE NT) et de souris hémizygotes traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre à la dose 2x (HE X2).

20 **Fig. 13**

[0043] [Fig. 13] montre un marquage histologique du cuivre par coloration à la rhodanine sur une coupe de tissus de foie issus de souris hémizygotes non traitées (HE NT), de souris hémizygotes traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre à la dose 2x (HE X2).

Fig. 14

25 **[0044]** [Fig. 14] montre l'analyse de la chaîne respiratoire dans le cerveau de souris hémizygotes non traitées (HE NT) et de souris hémizygotes traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre à la dose 2x (HE 2x).

Fig. 15

30 **[0045]** [Fig. 15] illustre le diamètre hydrodynamique (en nanomètre), évalué par diffusion dynamique de la lumière, de clusters de cuivre obtenus selon le protocole de synthèse décrit dans le document CN 105 965 028. Le diamètre hydrodynamique a été évalué immédiatement après la synthèse des clusters de cuivre.

Fig. 16

[0046] [Fig. 16] illustre le diamètre hydrodynamique (en nanomètre), évalué par diffusion dynamique de la lumière, de clusters de cuivre obtenus selon le protocole de synthèse décrit dans le document CN 105 965 028. Le diamètre hydrodynamique a été évalué 24 heures après la synthèse des clusters de cuivre (stockage à 4°C dans le noir).

5 **Fig. 17**

[0047] [Fig. 17] est une photo des trois lots de clusters de cuivre obtenus selon le protocole de synthèse décrit dans le document CN 105 965 028 après 24 heures de stockage à 4°C dans le noir.

Description des modes de réalisation

- 10 [0048] Les dessins et la description ci-après contiennent, pour l'essentiel, des éléments de caractère certain. Ils pourront donc non seulement servir à mieux faire comprendre la présente divulgation, mais aussi contribuer à sa définition, le cas échéant.

Exemples

[0049] Exemple 1

15 **[0050] Préparation des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc**

Cet exemple décrit respectivement les deux voies de synthèse possibles pour préparer les nanoclusters de cuivre de l'invention, à savoir le « protocole en solution » et le « protocole en phase solide ».

[0051] 1/ Protocole en solution

20 **[0052] Réactifs utilisés**

- Acétate de cuivre (II) $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$, M = 181,63 g/mol (Cas 142-71-2) ;
- L(-)-Histidine, M=155,15 g/mol (Cas 71-00-1) ;
- Acide ascorbique, M= 176,12 g/mol (Cas 50-81-7);
- Solution de NaOH 1M, M= 40,00 g/mol (Cas 1310-73-2).

25 **[0053] Précautions à prendre**

La synthèse est réalisée sous gaz inerte (azote). La verrerie est lavée à l'eau régale (1 volume d'acide nitrique 65% pour 2 volumes d'acide chlorhydrique 37%).

- Les nanoclusters de cuivre étant destinés à être étudiés *in vivo*, il est nécessaire de travailler sous une hotte propre et de nettoyer tous les équipements utilisés avec de l'éthanol 70% v/v. L'eau ultra pure utilisée est filtrée sur un filtre de diamètre de pores 0,2 µm.
- 30

[0054] Préparation d'une solution mère d'acétate de cuivre

Une quantité de 45 mg d'acétate de cuivre est disposée dans une fiole jaugée de 100 mL.

De l'eau ultra pure filtrée est ajoutée jusqu'au trait de jauge de la fiole. Une solution d'acétate de cuivre d'une concentration de 2,5 mM est obtenue.

Après complète solubilisation, la solution d'acétate de cuivre est transvasée dans un flaconnage adapté. Cette solution peut être conservée pendant un mois à 4 °C.

5 **[0055] Synthèse des nanoclusters de cuivre stabilisés avec de l'histidine**

Une quantité de 500 µL de la solution mère d'acétate de cuivre telle que préparée à l'étape précédente est ajoutée dans un ballon à col rond pouvant contenir jusqu'à 50 mL de solution. Puis, une quantité de 4500 µL d'eau ultra pure filtrée est ajoutée dans le ballon. La solution d'acétate de cuivre obtenue est appelée 1x.

- 10 Des solutions d'acétate de cuivre 2x et 4x sont également préparées en disposant une quantité respective de 1000 µL et 2000 µL de solution mère d'acétate de cuivre dans le ballon et en complétant à 5000 µL avec de l'eau ultra pure filtrée.

La solution d'acétate de cuivre 1x est agitée à 130 rpm avec l'agitateur multi plaques. Une quantité de 39 mg d'histidine est ajoutée à la solution d'acétate de cuivre. La solution

- 15 d'acétate de cuivre et d'histidine est agitée pendant 15 minutes. La solution prend une teinte bleutée. Après 15 minutes d'agitation le pH de la solution d'acétate de cuivre et d'histidine est ajusté à 12 avec 10 gouttes de NaOH 1M.

Une quantité de 139 mg d'acide ascorbique est ajoutée au mélange réactionnel.

Le ballon (réacteur) est placé dans un bain marie à 40°C sous agitation (vitesse réglée à 6)

- 20 pendant 4 heures. La solution prend une teinte orangée.

La solution de nanoclusters de cuivre ainsi obtenue est conservée au frais, à 4°C.

Les opérations ci-dessus décrites sont répétées respectivement avec les solutions d'acétate de cuivre 2x et 4x.

Les concentrations de cuivre obtenues avec des solutions d'acétate de cuivre 1x à 10x pour

- 25 les solutions de nanoclusters de cuivre vont de 16 à 160 µg/mL.

Le rendement de synthèse est de 100% : il n'y a pas de cuivre résiduel Cu^{2+} dans la solution de nanoclusters.

Les 3 solutions de nanoclusters de cuivre, obtenues respectivement à partir d'une solution d'acétate de cuivre 1x, 2x et 4x, sont dénommées dans ce qui suit : solution de nanocluster

- 30 de cuivre 1x, 2x et 4x. Les solutions peuvent être lyophilisées.

[0056] Dialyse des nanoclusters de cuivre

Les nanoclusters de cuivre obtenus à l'étape précédente sont purifiés par dialyse. Une cellule de dialyse est préparée (X12 Float a lyzer G2 CE MWCO 100-500 D, Référence 1511160), et un bécher de 150 mL est rempli avec 100 mL d'eau ultra pure filtrée. La cellule

- 35 de dialyse est remplie avec de l'eau ultrapure filtrée à l'aide d'une pipette pasteur. La cellule de dialyse est placée dans le bécher sous agitation (130 rpm). On laisse la cellule s'hydrater

et se laver pendant 1h.

L'eau est ensuite remplacée par un nouveau volume de 100 mL d'eau ultra pure filtrée. La cellule de dialyse est vidée à l'aide d'une pipette pasteur puis est remplie avec la solution de nanoclusters de cuivre 1x, qui est laissée sous agitation toute la nuit (pendant 12h) à

5 une température entre 2 et 6 °C

La solution dialysée de nanoclusters de cuivre 1x ainsi obtenue est transférée dans un flaconnage adapté.

Les mêmes opérations sont répétées respectivement avec les solutions de nanoclusters de cuivre 2x et 4x.

10 Les concentrations en cuivre des solutions de nanoclusters de cuivre dialysées sont identiques à celles des solutions non dialysées, et vont de 16 à 160 µg/mL (avec des solutions d'acétate de cuivre 1x à 10x).

Les solutions peuvent être lyophilisées.

[0057] 2/ Protocole en phase solide

15 **[0058] Réactifs utilisés**

L'acétate de cuivre (II), la L(-)-Histidine et l'acide ascorbique sont les mêmes que ceux utilisés dans le protocole solution. Dans le protocole en phase solide l'hydroxyde de sodium n'est pas nécessaire.

[0059] Précautions à prendre

20 La synthèse est réalisée sous gaz inerte (azote) et à l'abri de la lumière. La verrerie est lavée à l'eau régale (1 volume d'acide nitrique 65% pour 2 volumes d'acide chlorhydrique 37%). L'eau utilisée est de l'eau ultra pure filtrée sur un filtre de diamètre de pores 0,2 µm.

[0060] Synthèse des nanoclusters de cuivre stabilisés avec de l'histidine

25 Une quantité de 23 mg d'acétate de cuivre est pesée puis est placée à l'intérieur d'un mortier en agate. Une quantité de 1,7 g d'histidine est ensuite pesée. Un volume de poudre d'histidine pour un volume de poudre d'acétate de cuivre est ajouté en prenant soin de bien broyer les poudres à l'aide du pilon jusqu'à obtenir un mélange de couleur et d'aspect homogène. Cette opération est répétée tant qu'il y a de l'histidine. Le mélange final des deux poudres doit avoir une couleur bleu clair et la poudre doit être homogène. Le mélange

30 des deux poudres est ensuite transféré dans un ballon monocol de 50 mL (col rodé NS 19/26) à l'aide d'une spatule. Une quantité de 3 g d'acide ascorbique est pesée et transférée dans le ballon. Un agitateur magnétique en forme d'olive est placé au fond du ballon. Une quantité de 5 mL d'eau ultra pure est filtrée à l'aide d'une seringue en plastique de 5 mL et est ajoutée goutte à goutte dans le réacteur. Un mélange liquide est obtenu.

35 Le réacteur est fermé à l'aide d'un bouchon à jupe rabattable (diamètre 19,4 mm) et est mis

sous azote sans créer de surpression à l'aide d'un ballon de baudruche. Le réacteur est entouré d'un papier aluminium puis est placé sous agitation (200 rpm) le temps de la réaction. Il faut attendre 24h avant la fin de la réaction. A la fin de la réaction, le produit obtenu, qui se trouve sous la forme d'un liquide, a une couleur jaune. Le liquide obtenu, 5 comprenant les nanoclusters de cuivre, présente une concentration en cuivre de 1600 µg/mL.

Ce liquide est ensuite transféré dans un flaconnage en plastique adapté (le volume final est d'un peu plus de 5 mL). Le liquide comprenant les nanoclusters de cuivre est soit stocké au frais, soit transféré au lyophilisateur. La lyophilisation est effectuée par fractions de 1 mL. 10 Après la lyophilisation, le contenu du flacon (qui comprend les nanoclusters de cuivre sous forme sèche) est placé sous azote et est stocké à 4°C. La forme sèche des nanoclusters de cuivre peut être reconstituée à tout moment dans 1 mL d'eau purifiée. La solution de nanoclusters de cuivre ainsi obtenue est conservée sous azote.

[0061] Exemple 2

15 **[0062] Caractérisation des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc (en solution ou sous forme sèche et remis en solution)**

[0063] Les nanoclusters de cuivre tels qu'obtenus à l'exemple 1 sont caractérisés quant à leur structure, leurs tailles, leurs propriétés spectrophotométriques et leur stabilité.

[0064] Structure des nanoclusters de cuivre

20 Les nanoclusters de cuivre de l'invention présentent une forme sphérique. Ils sont plus particulièrement constitués d'un cœur métallique de cuivre couvert d'une couronne mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et éventuellement des ions ascorbate. La figure 1 est une représentation schématique d'un nanocluster de cuivre CuNC@HisAc de l'invention, à savoir un nanocluster qui comprend à la surface du cœur de cuivre une 25 couronne mixte comprenant de l'histidine et des ions acétate. La figure 2 est une représentation schématique d'un mode de réalisation particulier, à savoir un nanocluster de cuivre CuNC@HisAcAsc qui comprend à la surface du cœur de cuivre une couronne mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et des ions ascorbate.

La présence d'ions acétate à la surface des nanoclusters de cuivre a été démontrée par 30 purification par chromatographie d'exclusion stérique puis quantification en chromatographie ionique.

Les nanoclusters de cuivre de la solution dialysée 1x telle qu'obtenue à l'exemple 1, point 1/ (« Protocole en solution ») sont détruits (dissolution totale et retour aux différents éléments composant la structure des nanoclusters) par un procédé chimique (mise en 35 solution dans un acide concentré (HCl) puis une base concentrée (NaOH)) puis sont

analysés par chromatographie ionique en comparaison à un témoin acétate de sodium (rétention des anions composant le nanocluster sur une résine échangeuse cationique, séparation, identification et quantification (étalonnage externe) des ions acétate par conductimétrie avec l'aide un suppresseur)).

- 5 Les résultats obtenus avec l'analyse par chromatographie ionique sont illustrés à la figure 3 . Le pic à 4,45 min associé aux ions acétate (témoin, voir tracé du haut) est retrouvé dans les nanoclusters de cuivre (voir tracé du bas).

La présence d'ions ascorbate à la surface des nanoclusters de cuivre a été démontrée par analyse en spectrophotométrie infrarouge après purification des nanoclusters en solution

- 10 par chromatographie d'exclusion stérique.

Les résultats obtenus avec l'analyse par spectrophotométrie infra-rouge sont illustrés à la figure 4. Les longueurs d'onde caractéristiques des ions acétate à 1400 et 1500 cm^{-1} sont retrouvés lors de l'analyse des nanoclusters.

[0065] Taille des nanoclusters de cuivre

- 15 Le diamètre hydrodynamique (Dh) et/ou métallique des nanoclusters de cuivre a été évalué par diffusion dynamique de la lumière (figure 5) (angle 173°, laser 530 nm, température 25°C sur Nanosizer Malvern), par microscopie électronique à transmission (figure 6) (dépôt sur grilles en nickel, observations sous faisceaux opérant à 200 kV (LaB6 cathode) Philips CM 200) et par analyse par dispersion de Taylor (figure 7). La méthode d'analyse par
- 20 dispersion consiste à injecter une bande de soluté dans un tube capillaire ouvert (50 μm) et à la mobiliser sous l'influence d'un flux hydrodynamique (pression positive 1 psi, profil de vitesse parabolique). Le principe de la détermination du rayon hydrodynamique repose sur la relation de Taylor-Aris qui établit le lien entre l'étalement du pic de soluté (modélisation d'une gaussienne) et le coefficient de diffusion moléculaire.

- 25 Les résultats obtenus pour l'évaluation du diamètre hydrodynamique (Dh) des nanoclusters de cuivre par diffusion dynamique de la lumière sont illustrés à la figure 5.

Les résultats obtenus pour l'évaluation du diamètre métallique des nanoclusters de cuivre par microscopie électronique à transmission sont illustrés à la figure 6. On observe une population majoritaire avec un diamètre moyen inférieur à 1,0 nm.

- 30 Les résultats obtenus pour l'évaluation du diamètre hydrodynamique (Dh) des nanoclusters de cuivre par dispersion de Taylor sont illustrés à la figure 7.

Il ressort de ces figures que le diamètre hydrodynamique moyen, tout comme le diamètre métallique, des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc est inférieur à 1,0 nm. Les caractéristiques énumérées ci-dessus à propos des nanoclusters de cuivre concernent plus

- 35 particulièrement des nanoclusters de cuivre recouverts à leur surface d'histidine, d'ions acétate et d'ions ascorbate.

[0066] Propriétés spectrophotométriques

Les propriétés spectrophotométriques des nanoclusters de cuivre ont été évaluées par spectroscopie UV-Visible et par spectroscopie de fluorescence.

Les résultats obtenus pour la spectroscopie UV-Visible sont illustrés à la figure 8. On
5 constate qu'il existe un épaulement sur le spectre UV-vis à 325 ± 10 nm qui confirme l'existence des nanoclusters.

Les résultats obtenus pour la spectroscopie par fluorescence sont illustrés à la figure 9. Une fluorescence des nanoclusters de cuivre existe avec une longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 380 ± 15 nm et 460 ± 15 nm qui confirme l'existence des
10 nanoclusters.

Les nanoclusters de cuivre de l'invention présentent des propriétés optiques, en particulier de fluorescence, caractéristiques de cette échelle intermédiaire entre la molécule et la nanoparticule.

[0067] Stabilité des nanoclusters de cuivre

15 La stabilité des nanoclusters de cuivre CuNC@HisAc a été évaluée en diffusion dynamique de la lumière (angle 173° , laser 530 nm, température 25°C sur Nanosizer Malvern).

Les analyses ont été effectuées sur les échantillons obtenus à l'issue du protocole en solution et à l'issue du protocole en phase solide.

Plus particulièrement, concernant le protocole en solution, les analyses ont été effectuées
20 sur les solutions de nanoclusters de cuivre 1x, 2x et 4x.

Concernant le protocole en phase solide, les analyses ont été effectuées sur les échantillons lyophilisés et sur les solutions reconstituées après lyophilisation, conservés ou non sous azote. La stabilité des nanoclusters est préservée en environnement exempt de dioxygène.

25 Les résultats ne sont pas les mêmes selon que les nanoclusters de cuivre sont conservés sous forme liquide ou sous forme solide.

Pour le protocole de synthèse en solution on observe une stabilité des nanoclusters de cuivre en solution allant jusqu'à :

- 140 jours pour les nanoclusters de cuivre préparés à partir d'une solution d'acétate de
30 cuivre 1x et 2x ;
- 40 jours pour les nanoclusters de cuivre préparés à partir d'une solution d'acétate de cuivre 4x.

Pour le protocole de synthèse en phase solide on observe une stabilité des nanoclusters de cuivre lyophilisés d'au moins 12 mois pour une conservation sous azote à 4°C . La
35 mesure du diamètre hydrodynamique des nanoclusters de cuivre à 12 mois de conservation est de 1,6 nm.

[0068] Exemple 3**[0069] Essais *in vivo* chez la souris****[0070] Généralités**

Des essais *in vivo* ont été effectués sur le modèle *ATP7A-Mo^{bio}* de souris, qui possède une mutation spontanée du gène de la Maladie de Menkes, le gène *ATP7A* codant pour l'ATPase 7A. Le gène de la maladie de Menkes est porté par le chromosome X. Les femelles hétérozygotes sont viables et fertiles. Les mâles quant à eux, sont soit sains (chromosome X normal, i.e. allèle sauvage) soit hémizygotés (porteur de la mutation sur le chromosome X) et donc atteints de la maladie de Menkes. La majorité des animaux hémizygotés possèdent un taux de réticulation défectueux pour l'élastine et également un déficit en collagène, ce qui explique des ruptures précoces d'anévrisme aortique et un emphysème pulmonaire, ce qui entraîne une mortalité vers l'âge de 5 semaines de vie. L'absorption du cuivre dans les intestins est réduite de 64% et la concentration du cuivre dans le foie est réduite de 56%. Les mâles possèdent également un déficit en noradrénaline au niveau cérébral, ce qui est causé par le déficit en dopamine-beta-hydroxylase cérébrale, qui est une enzyme cupro-dépendante.

Les femelles hétérozygotes ont un phénotype modéré avec des tâches hypopigmentées irrégulières sur le pelage avec une alternance de zones sombres et de zones claires. Elles possèdent un métabolisme et un comportement normaux, et sont donc capables de se reproduire.

Les mâles sains possèdent un pelage noir tandis que les mâles hémizygotés possèdent un pelage clair, sans tâche. De plus, ces derniers ont un faible poids, sont généralement petits et possèdent parfois des membres postérieurs déformés.

[0071] Tests effectués

Les solutions de nanoclusters de cuivre 1x, 2x et 4x telles qu'obtenus à l'exemple 1 (protocole solution) ont été respectivement injectées aux souris mâles par piqûre sous-cutanée au niveau de la nuque. 5 groupes d'animaux âgés de 5 semaines (définis ci-dessous) ont été étudiés.

1/ Groupe **WT** : les souris sauvages (« Wild Type ») (mâles sains), qui ne possèdent pas de mutation sur le gène *ATP7A* au niveau du chromosome X, ont été traitées au démarrage du protocole dans le but d'évaluer une éventuelle toxicité de l'excipient utilisé pour administrer le nanocluster de cuivre.

2/ Groupe **HE NT** : les souris hémizygotés (HE), qui possèdent une mutation du gène *ATP7A* présent sur le chromosome X, ne sont pas traitées, elles servent de contrôle.

3/ Groupe **HE 1x** : les souris hémizygotés sont traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre (dose initiale : 1x), qui a été administrée 3 jours par semaine.

4/ Groupe **HE 2x** : les souris hémizygotes sont traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre 2x (dose 1x doublée), qui a été administrée 3 jours par semaine.

5/ Groupe **HE 4x** : les souris hémizygotes sont traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre 4x (dose 1x quadruplée), qui a été administrée soit 3 jours, soit 5 jours par semaine.

[0072] Dosage du cuivre cérébral chez les souris hémizygotes

Les résultats obtenus quant à la concentration de cuivre cérébral sont illustrés à la figure 10. On entend par « cuivre cérébral » le cuivre dosé sur un homogénat de cerveau entier. Le cuivre est mesuré par spectrométrie d'absorption atomique (PinAAcle 900T Atomic Absorption Spectrometer, Perkin Elmer). Il ressort de cette figure que la concentration du cuivre cérébral est corrélée à la posologie des nanoclusters administrée chez les animaux. La concentration de cuivre cérébral augmente avec l'augmentation de la posologie. Les souris traitées à la dose 4x, 5 jours par semaine présentent une concentration en cuivre cérébral bien plus importante que celles traitées à la dose 4x mais 3 jours par semaine.

[0073] Espérance de vie des souris hémizygotes

Les résultats obtenus sur la survie des souris hémizygotes sont illustrés à la figure 11. Les animaux non traités ou traités à des doses faibles (1x et 2x) ont une durée de vie qui ne dépasse pas les 45 jours alors que les animaux traités à la dose 4x, 3 jours ou 5 jours par semaine ont une durée de vie très améliorée, puisque la majorité de ces animaux sont toujours vivant à plus de 100 jours de vie. Par ailleurs, aucune réaction adverse n'a été observée chez les souris, y compris avec le groupe traité avec la dose 4x. Aucune anomalie tissulaire n'a été observée sur les tissus étudiés après la mise à mort des animaux.

[0074] Analyse de la motricité des souris hémizygotes

Une différence de l'activité motrice des animaux a été observée entre les souris sauvages et les souris hémizygotes. Au cours du vieillissement, les souris hémizygotes non traitées ont une diminution notable de leur activité globale (diminution de l'activité motrice, atonie, impossibilité de se dresser...). En effet, les souris éprouvent une certaine difficulté à se déplacer et à se nourrir. Ceci se traduit par une difficulté à atteindre la mangeoire avec une impossibilité à se redresser comme le font les souris sauvages.

Lorsque les souris hémizygotes ont été traitées avec la solution de nanoclusters de cuivre à la dose 1x, une diminution progressive de l'activité est observée, entraînant ainsi une dominance des animaux sauvages. Dans ce cas, les souris hémizygotes sont prostrées dans un coin et ne se déplacent plus.

A contrario, dans le groupe des souris hémizygotes traitées avec la solution de nanoclusters de cuivre à la dose 4x, on observe une amélioration importante de l'activité globale. Les souris traitées à la dose 4x se redressent et sautent plus facilement. Cela démontre une

amélioration de la forme physique des souris traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre à la dose 4x.

[0075] Analyse de la pigmentation du poil par microscopie optique

Le poil est un bon indicateur de l'état métabolique des souris. La pigmentation du poil, qui
5 est un aspect fortement observable chez les souris hémizygotes, est analysée dans ce qui
suit. Chez les souris hémizygotes traitées avec une solution de nanoclusters de cuivre à la
dose 4x, on observe au microscope optique sur les poils une alternance de zones sombres
et de zones claires, ce qui pourrait correspondre à la périodicité des injections effectuées
précédemment. En effet, l'administration de cuivre par le biais de la solution de
10 nanoclusters de cuivre restaure la production de mélanine, car celle-ci dépend de l'activité
de la tyrosinase qui est une cuproprotéine. C'est l'amélioration de cette fonction
enzymatique qui est à l'origine de l'amélioration de la coloration du pelage des souris.

[0076] Marquage du cuivre à la rhodanine : résultats préliminaires

L'étude anatomopathologique du contenu en cuivre des différents tissus, via un marquage
15 à la rhodanine, a permis de montrer l'absence d'accumulation pathologique de cuivre dans
les différents tissus étudiés (foie, rein, cerveau). Dans le but de détecter la présence ou non
de cuivre dans les organes de stockage comme le foie et le rein ou dans les organes où il
est nécessaire pour observer des effets notables comme le cerveau, le cuivre a été marqué
à l'aide d'une coloration à la rhodanine, permettant de détecter les dépôts de cuivre au sein
20 des tissus cibles. Cette étude permet également d'identifier une possible toxicité (au niveau
du foie et des reins) en mettant en évidence des lésions histologiques de ces organes liées
à la présence de cuivre dans les cellules hépatiques et/ou rénales. Ces études ont été faites
chez les souris hémizygotes non traitées et traitées à la dose 2x de nanoclusters de cuivre.
Les résultats observés sont illustrés aux figures 12 (rein) et 13 (foie).

25 L'analyse anatomopathologique du rein (figure 12) montre la présence de faibles dépôts de
cuivre au niveau du rein des animaux traités à la dose 2x (figure en haut à droite) sans qu'il
y ait d'aspect de toxicité tissulaire au niveau du tissu rénal (figure en bas à droite).

L'analyse anatomopathologique du foie (figure 13) montre la présence de faibles dépôts de
cuivre au niveau du foie des animaux traités à la dose 2x (figure en haut à droite) sans qu'il
30 y ait d'aspect de toxicité tissulaire au niveau du tissu hépatique (figure en bas à droite).

Ces données montrent que l'on a bien une captation du cuivre par les tissus, sans entraîner
de toxicité cellulaire au niveau du rein et du foie à la dose de traitement 2x.

[0077] Analyse de la chaîne respiratoire cérébrale

[0078] La respiration cellulaire est une des fonctions altérées lors d'une carence en cuivre.

35 Il a été montré qu'un défaut d'insertion du cuivre dans la chaîne respiratoire entraîne un

défaut de fonctionnalité du complexe I et du complexe IV, et également un défaut de la phosphorylation oxydative. Dans la maladie de Menkes, les zones cérébrales atteintes sont principalement les noyaux gris. De ce fait, la respiration mitochondriale a été mesurée dans le striatum de souris incluses dans l'étude (souris sauvage, hémizygotés non traitées, 5 hémizygotés traités à la dose 2x) grâce à un oxygraphe à haute résolution (Oroboros, O2k, Laboratoire NGERE). Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 14. On peut observer sur cette figure une nette amélioration de l'activité de la chaîne respiratoire chez la souris traitée (courbe supérieure) par rapport à la souris non traitée (courbe inférieure). Cette amélioration est particulièrement visible au niveau du complexe IV (C IV) qui comporte des 10 protéines liées au cuivre.

L'analyse de l'activité de la chaîne respiratoire cérébrale est un index de la restauration des activités liées aux cuproprotéines cérébrales. En effet, l'activité complexe IV de la chaîne respiratoire est dépendante de la présence de cuproprotéines fonctionnelles. La restauration de l'activité de ce complexe IV (figure 14) montre donc que les nanoclusters 15 de cuivre permettent leur pénétration dans le cerveau, et qu'ils traversent donc bien la barrière hémato-encéphalique. Le cuivre ainsi disponible est utilisable dans les neurones pour restaurer une activité enzymatique cupro-dépendante.

[0079] Conclusion

Les essais *in vivo* effectués chez la souris montrent que :

- 20 - le traitement à l'aide des nanoclusters de cuivre permet une amélioration de la concentration de cuivre cérébral chez les animaux traités,
- l'augmentation de la concentration de cuivre cérébral permet une amélioration de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire qui est dépendant de la présence de cuivre.

Ces données démontrent que les nanoclusters de cuivre de l'invention passent la barrière 25 hémato-encéphalique et que le cuivre est biodisponible pour restaurer les activités enzymatiques cérébrales dépendantes de la présence de cuivre. En outre l'administration des nanoclusters de cuivre participe à l'amélioration de la survie des animaux traités.

[0080] Exemple 4 : exemple comparatif

[0081] Préparation de nanoclusters de cuivre à partir de chlorure de cuivre ou de sulfate de 30 cuivre

Les Inventeurs ont préparé des nanoclusters de cuivre en substituant l'acétate de cuivre par du chlorure de cuivre ou du sulfate de cuivre. Le protocole utilisé est le protocole en solution décrit dans l'exemple 1, la seule différence résidant dans l'utilisation de chlorure de cuivre ou de sulfate de cuivre à la place d'acétate de cuivre.

35 Des solutions de chlorure de cuivre 1x ou de sulfate de cuivre 1x sont respectivement préparées pour obtenir respectivement des solutions de nanoclusters de cuivre 1x.

La concentration en cuivre de chacune des solutions de nanoclusters de cuivre obtenue, éventuellement dialysée, est de 16 µg/mL.

Les trois solutions de nanoclusters de cuivre 1x respectivement obtenues à partir d'acétate de cuivre, de chlorure de cuivre ou de sulfate de cuivre sont comparées en terme de stabilité.

- 5 La stabilité a été évaluée en diffusion dynamique de la lumière comme indiqué à l'exemple 2 ci-avant. Les résultats obtenus montrent une stabilité très supérieure, en suivant l'évolution du diamètre hydrodynamique en fonction du temps, lorsque l'acétate de cuivre est utilisé comparativement au chlorure ou au sulfate de cuivre. Comme indiqué dans l'exemple 2 les nanoclusters de cuivre en solution de l'invention présentent une stabilité
- 10 allant jusqu'à 140 jours alors que la stabilité des nanoclusters de cuivre en solution obtenus à partir de chlorure de cuivre n'est que de 2 jours et celle des nanoclusters de cuivre en solution obtenus à partir de sulfate de cuivre n'est que de 4 jours. En effet, en mesurant le diamètre hydrodynamique en fonction du temps, celui-ci augmente très largement (supérieur à 100 nm dès 2 jours ou dès 4 jours lorsque les nanoclusters de cuivre sont
- 15 respectivement préparés à base de chlorure de cuivre ou de sulfate de cuivre) démontrant ainsi la déstabilisation des nanoclusters de cuivre.

[0082] Comparaison des nanoclusters de cuivre de l'invention avec les clusters de cuivre décrits dans le document CN 105 965 028

- L'exemple 9 du document chinois décrit la préparation de clusters de cuivre à partir d'acétate de cuivre 0,01 mol/L, d'histidine 0,1 mol/L et d'acide ascorbique 0,1 mol/L. Le
- 20 protocole décrit dans cet exemple a été reproduit à l'identique par les Inventeurs. Les synthèses ont été effectuées trois fois en tout. Les mélanges liquide de clusters de cuivre obtenus à l'issue de chacune des trois synthèses sont respectivement stockés dans trois tubes à essai gradués avec bouchon à vis et sont appelés Lot 1, Lot 2 et Lot 3.

- 25 Le diamètre hydrodynamique (Dh) des clusters de cuivre de chacun des lots a été évalué immédiatement après leur synthèse, par diffusion dynamique de la lumière (angle 173°, laser 530 nm, température 25°C sur Nanosizer Malvern). Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 15, d'où il ressort que le diamètre hydrodynamique de chacun des trois lots varie de 70 à 120 nm. De tels diamètres hydrodynamiques ne permettent pas donc de qualifier
- 30 les clusters du document chinois de « nanoclusters ».

- Les lots 1 à 3 ont ensuite été stockés pendant 24 heures à 4°C dans le noir. L'analyse du diamètre hydrodynamique (Dh) a été recommencée au bout de 24 h après leur synthèse. Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 16. Seules deux courbes sont visibles sur cette figure car le lot 1 est superposé au lot 2. Il ressort de la figure 16 que le diamètre
- 35 hydrodynamique a fortement augmenté, ce qui montre une mauvaise stabilisation des clusters et une forte tendance à l'agrégation. Cette constatation de la mauvaise stabilité et

de l'agrégation s'observe d'un point de vue macroscopique dans la figure 17 au niveau des tubes dans lesquels sont stockés les clusters.

En conclusion, les particules obtenues selon le protocole du document chinois ne sont pas des nanoclusters (taille supérieure à 2 nm) et ne sont pas stables.

- 5 **[0083]** La présente divulgation ne se limite pas aux exemples décrits ci-avant, seulement à titre d'exemple, mais elle englobe toutes les variantes que pourra envisager l'homme de l'art dans le cadre de la protection recherchée.

Revendications

[Revendication 1] Nanoclusters de cuivre caractérisés en ce qu'ils :

- sont recouverts à leur surface d'une couche mixte comprenant de l'histidine (His), des ions acétate (Ac) et éventuellement des ions ascorbate (Asc),
- 5 - présentent une forme sphérique,
- présentent un diamètre hydrodynamique allant de 0,6 à 2,0 nm, et de préférence de 1,3 nm,
- présentent un diamètre de cœur métallique allant de 0,5 à 1,5 nm, et de préférence de 1,0 nm,
- 10 - présentent une stabilité dans le temps allant de 5 à 12 semaines lorsque les nanoclusters sont sous forme liquide,
- présentent une stabilité dans le temps d'au moins 12 mois, et de préférence de 12 à 18 mois lorsque les nanoclusters sont sous forme sèche,
- présentent des propriétés spectrophotométriques, avec un épaulement sur le spectre UV-Visible à 325 ± 10 nm et un spectre de fluorescence avec des longueurs d'onde d'excitation allant de 365 à 395 nm et des longueurs d'onde d'émission allant de 445 à 475 nm,
- 15 lesdits nanoclusters de cuivre étant désignés par la formule « CuNC@HisAc » ou par la formule « CuNC@HisAcAsc ».

[Revendication 2] Nanoclusters de cuivre selon la revendication 1, caractérisés en ce

- 20 qu'ils se présentent sous forme liquide ou sous forme sèche.

[Revendication 3] Nanoclusters de cuivre selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en qu'ils présentent au moins une des caractéristiques suivantes :

- ils sont aptes à passer la barrière hémato-encéphalique,
- ils présentent une bonne biodisponibilité,
- 25 - ils sont biocompatibles,
- ils sont biodégradables,
- ils sont lyophilisables,
- ils ne sont pas toxiques pour l'organisme humain,
- ils ne s'accumulent pas dans les organes tels que le foie, la rate, les reins ou les poumons.

30 **[Revendication 4]** Procédé de préparation de nanoclusters de cuivre selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- réaction entre de l'acétate de cuivre (II) et de l'histidine afin d'obtenir un mélange d'acétate de cuivre et d'histidine, le ratio molaire histidine/acétate de cuivre (II) étant supérieur ou
- 35 égal à 50, et de préférence va de 50 à 200,

- réaction entre le mélange d'acétate de cuivre et d'histidine avec de l'acide ascorbique afin d'obtenir un mélange d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique, le ratio molaire acide ascorbique/acétate de cuivre (II) étant supérieur ou égal à 130, et de préférence va de 130 à 700,

- 5 - récupération des nanoclusters de cuivre recouverts à leur surface d'une couche mixte comprenant de l'histidine, des ions acétate et des ions ascorbates.

[Revendication 5] Procédé de préparation selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est effectué sous gaz inerte et en ce que :

- l'acétate de cuivre est sous forme de solution et l'histidine est sous forme de poudre,
- 10 - une solution d'acétate de cuivre et d'histidine est préparée par ajout d'histidine dans la solution d'acétate de cuivre,
 - la solution d'acétate de cuivre et d'histidine est ajustée à une valeur de pH allant de 11 à 13, et de préférence est de 12,
 - l'acide ascorbique est sous forme de poudre,
- 15 - une solution d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique est préparée par ajout d'acide ascorbique à la solution d'acétate de cuivre et d'histidine dont le pH a été ajusté aux valeurs susmentionnées,
 - la solution d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique est agitée pendant 2h à 6h, et de préférence 4h, à une température allant de 35°C à 45°C, et de préférence 40°C,
- 20 - une solution comprenant des nanoclusters de cuivre est obtenue à l'issue de l'étape précédente d'agitation,
 - la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre est éventuellement dialysée afin d'obtenir une solution purifiée de nanoclusters de cuivre,
 - la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysée, est
- 25 éventuellement lyophilisée afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.

[Revendication 6] Procédé selon la revendication 5, caractérisé en qu'il comprend en outre au moins une caractéristique choisie parmi :

- le gaz inerte est de l'azote,
- la solution d'acétate de cuivre est préparée par ajout d'acétate de cuivre dans de l'eau
- 30 ultra pure filtrée,
 - la solution d'acétate de cuivre présente une concentration allant de 0,5 à 5,0 mM,
 - la concentration d'histidine est supérieure à la concentration de la solution d'acétate de cuivre,
 - le pH de la solution d'acétate de cuivre et d'histidine est ajusté à l'aide d'hydroxyde de
- 35 sodium,
 - la concentration d'acide ascorbique est égale à la concentration d'histidine,

- la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysée, présente une concentration en cuivre allant de 16 à 160 µg/mL,
 - la solution qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysée, est lyophilisée afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.
- 5 **[Revendication 7]** Procédé de préparation selon la revendication 4, caractérisé en ce que :
- l'acétate de cuivre est sous forme de poudre et l'histidine est sous forme de poudre,
 - un mélange pulvérulent d'acétate de cuivre et d'histidine est obtenu par mélange de chacune des poudres d'acétate de cuivre et d'histidine,
 - le mélange pulvérulent d'acétate de cuivre et d'histidine est broyé jusqu'à obtention d'un
- 10 mélange pulvérulent homogène en couleur,
- le mélange pulvérulent homogène d'acétate de cuivre et d'histidine est placé dans un réacteur,
 - l'acide ascorbique est sous forme de poudre,
 - l'acide ascorbique est ajouté dans le réacteur comprenant le mélange pulvérulent
- 15 homogène d'acétate de cuivre et d'histidine,
- le mélange pulvérulent d'acétate de cuivre, d'histidine et d'acide ascorbique ainsi obtenu est mis sous agitation, puis de l'eau est ajoutée goutte à goutte dans le réacteur, ladite eau étant de l'eau ultra pure filtrée,
 - le réacteur est mis sous gaz inerte et à l'abri de la lumière,
- 20 - le mélange d'acétate de cuivre, d'histidine, d'acide ascorbique et d'eau est maintenu sous agitation dans le réacteur pendant 16h à 36 h, et de préférence 24h,
- un mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre est obtenu à l'issue de l'étape précédente d'agitation,
 - le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre est éventuellement dialysé
- 25 afin d'obtenir un mélange liquide purifié de nanoclusters de cuivre,
- le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysé, est éventuellement lyophilisé afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.
- [Revendication 8]** Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une caractéristique choisie parmi :
- la concentration d'histidine est supérieure à la concentration d'acétate de cuivre,
 - la concentration d'acide ascorbique est égale à la concentration d'histidine,
 - l'eau ajoutée dans le réacteur est de l'eau ultra pure filtrée,
 - le gaz inerte est de l'azote,
 - le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysé,
- 35 présente une concentration en cuivre allant de 1600 à 4000 µg/mL,

- le mélange liquide qui comprend les nanoclusters de cuivre, éventuellement dialysé, est lyophilisé afin d'obtenir une forme sèche de nanoclusters de cuivre.

[Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la forme sèche de nanoclusters de cuivre est conservée sous azote, de préférence dans des flacons, et de préférence à 4°C, ladite poudre pouvant être conservée pendant une durée d'au moins 12 mois, et de préférence de 12 à 18 mois, sans altération de la stabilité des nanoclusters de cuivre.

[Revendication 10] Nanoclusters de cuivre tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou obtenus selon le procédé de l'une quelconque des revendications 4 à 9, pour une utilisation comme médicament.

[Revendication 11] Nanoclusters de cuivre tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou obtenus selon le procédé de l'une quelconque des revendications 4 à 9, pour une utilisation dans le traitement des pathologies liées à un déficit en cuivre.

[Revendication 12] Nanoclusters de cuivre pour une utilisation selon la revendication 11, caractérisés en ce que la pathologie liée à un déficit en cuivre est la maladie de Menkès.

[Revendication 13] Nanoclusters de cuivre pour une utilisation selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils sont sous une forme adaptée à une administration par voie sous cutanée, une fois par jour.

[Revendication 14] Nanoclusters de cuivre pour une utilisation selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils sont sous une forme adaptée à une administration continue via une pompe sous-cutanée.

[Revendication 15] Nanoclusters de cuivre pour une utilisation selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils sont destinés à une utilisation pédiatrique.