

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 651**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/30** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61K 47/38** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61K 33/34** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016 PCT/EP2016/059074**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170152**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016 E 16717670 (0)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3285759**

54 Título: **Composiciones antibacterianas que comprenden nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre y su preparación**

30 Prioridad:

**24.04.2015 GB 201507002**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.06.2020**

73 Titular/es:

**UNITED KINGDOM RESEARCH AND INNOVATION (100.0%)  
 Polaris House, North Star Avenue  
 Swindon SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

**BASTOS, CARLOS ANDRÉ PASSOS;  
 BRUGGRABER, SYLVAINÉ FRANCOISE ALINE;  
 FARIA, NUNO, JORGE, RODRIGUES y  
 POWELL, JONATHAN, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 767 651 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones antibacterianas que comprenden nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre y su preparación

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones antibacterianas para su uso en el tratamiento de heridas o el tratamiento o la prevención de una infección microbiana, en las que la composición comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando.

10

**Antecedentes de la invención**

El desarrollo de nuevos antimicrobianos se ha ralentizado progresivamente desde la década de 1980, dejando un escenario funesto frente a los patógenos emergentes resistentes a múltiples fármacos. Las denominadas 'superbacterias' se reconocen cada vez más como una amenaza global para la salud pública, impulsando la exploración de nuevos antimicrobianos, incluyendo agentes inorgánicos, tales como aquellos a base de cobre y plata. Estos metales han tenido un uso histórico y, de manera significativa, actúan hipotéticamente a través de una multiplicidad de mecanismos biocidas, lo que podría potenciar la longevidad clínica al requerir que los microorganismos experimenten múltiples mutaciones para ganar resistencia. De los dos metales, la plata ha demostrado una mayor eficacia antimicrobiana: sin embargo, el coste, la toxicidad *in vivo* y la inestabilidad química probablemente limiten su utilidad para aplicaciones clínicas tales como la curación de heridas infectadas. El cobre, aunque es menos eficaz, es económico y, siendo un micronutriente esencial, es mejor tolerado por el hombre, lo que permite usar dosis mayores. Sin embargo, debido a su menor eficacia biocida, el desarrollo de sistemas de entrega que maximicen la biodisponibilidad del cobre libre es crítico para su uso en entornos clínicos.

25

El documento GB 1600449 (Mooney Chemicals Inc.) se refiere a sustancias similares a resinas o jabones en las que las partículas de óxido metálico cristalino están rodeadas en una matriz amorfa de moléculas orgánicas de una manera estequiométrica para producir composiciones de óxido metálico que pueden disolverse en disolventes no polares (similares a aceite), principalmente para su uso en catálisis. El documento GB 1600449 demuestra que estas composiciones retienen núcleos de micelas no modificados por difracción de rayos X que muestran que las moléculas orgánicas se aplican como recubrimiento sobre la superficie de las partículas en lugar de incorporarse dentro de ellas.

30

El documento WO 2008/096130 (Consejo de Investigación Médica) describe materiales de iones metálicos de poli oxo-hidroxi modificado con ligando y se desvelan sus usos, en particular para aplicaciones nutricionales, médicas, cosméticas o relacionadas biológicamente, tales como el tratamiento de una deficiencia relacionada con un componente del material tal como la anemia o para la retirada de una sustancia endógena capaz de unirse al material. En el documento WO 2010/015827 se describen ejemplos de estos tipos de materiales para su uso como materiales de unión a fosfato.

35

El documento WO 2012/101407 se refiere a sensores de oxígeno para su uso en el embalaje de productos para almacenar un artículo en una envoltura de embalaje en condiciones de atmósfera modificada, en los que los sensores de oxígeno se basan en oxo-hidróxidos metálicos que se modifican opcionalmente con uno o más ligandos. Los sensores pueden estar presentes en una matriz hidratada, permeable al oxígeno, por ejemplo, formada a partir de un material, tal como la gelatina.

45

El documento DE 20205014332 se refiere a nanopulvos organometálicos que contienen grupos químicamente reactivos y a su uso en la formación de compuestos poliméricos.

50

El documento US 2008/0147019 describe el uso de una composición antibacteriana en la que se incorpora plata metálica o cobre en una matriz de quitosano para proteger las nanopartículas metálicas de la oxidación incontrolada.

El desarrollo de enfoques para la administración eficaz de iones metálicos antimicrobianos tales como el cobre, sigue siendo un problema no resuelto en la técnica, especialmente para su uso en un entorno clínico.

55 **Sumario de la invención**

En términos generales, la presente invención se refiere a nanopartículas formadas a partir de oxo-hidróxido de cobre que son capaces de administrar concentraciones biocidas de cobre, normalmente en forma de iones de cobre libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Las composiciones de nanopartículas de la presente invención consiguen este resultado proporcionando partículas pequeñas, normalmente con diámetros medios en el intervalo de 1 nm a 100 nm y más preferentemente en el intervalo de 1 nm a 10 nm, que tienen una relación de área superficial-a-volumen comparativamente alta y una reactividad potenciada en comparación con los materiales de contrapartida a granel correspondientes y que son suficientemente lábiles para liberar el cobre libre eficientemente, lo que les permite actuar como composiciones farmacéuticas o antibacterianas, a diferencia de las nanopartículas de cobre de la técnica anterior. En realizaciones preferidas, esto se consigue a través de la modificación con ligando del oxo-hidróxido de cobre en el que uno o más de los grupos oxo o hidroxilo del oxo-hidróxido de cobre están sustituidos no estequiométricamente por ligandos. Los

60

65

experimentos que se describen en el presente documento demuestran que las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre son tan eficaces como los agentes antibacterianos y son superiores en comparación con las nanopartículas de óxido de cobre (CuO) disponibles en el mercado, las nanopartículas de hidróxido de cobre estabilizado con silicato y los complejos de cobre con agentes quelantes fuertes, tales como EDTA. Las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención se modifican preferentemente con ligandos de ácido carboxílico o formas ionizadas de los mismos, tales como tartrato y adipato.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición antibacteriana para su uso en el tratamiento de heridas, en la que la composición comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre tienen una estructura en la que los grupos oxo o hidroxilo están sustituidos no estequiométricamente por uno o más ligandos, en la que el uno o más ligandos comprenden un ligando de ácido carboxílico o una forma ionizada del mismo y el cobre está presente en la formulación farmacéutica como iones de cobre libre (Cu<sup>2+</sup>).

Como las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre tienen una estructura polimérica en la que los ligandos se distribuyen dentro de la estructura de fase sólida del oxo-hidróxido de cobre, en lugar de simplemente aplicarse como recubrimiento o adsorberse físicamente sobre la superficie de las partículas de oxo-hidróxido de cobre, los presentes inventores creen que la inclusión de los ligandos ayuda a modular la disolución de las nanopartículas para proporcionar iones de cobre libre solubles disponibles para su uso biocida. Se prefiere que las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre tengan una o más propiedades fisicoquímicas reproducibles, por ejemplo, el perfil de disolución, el porcentaje de cobre soluble disponible en función del cobre total presente en las nanopartículas y/o la actividad biocida de las nanopartículas en un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano y/o retención de la labilidad tras resuspender una composición que se ha secado.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición antibacteriana para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección microbiana, en la que la composición comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre tienen una estructura en la que los grupos oxo o hidroxilo están sustituidos no estequiométricamente por uno o más ligandos, en la que el uno o más ligandos comprenden un ligando de ácido carboxílico o una forma ionizada del mismo y el cobre está presente en la formulación farmacéutica como iones de cobre libre (Cu<sup>2+</sup>).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso para producir una composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de acuerdo con la presente invención, comprendiendo el proceso:

- (a) mezclar la solución que comprende Cu<sup>2+</sup> y un ligando de ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más ligandos adicionales o componentes de reacción, en un medio de reacción a un primer pH(A) en el que los componentes son solubles;
- (b) cambiar el pH(A) a un segundo pH(B) para provocar que se forme un precipitado sólido o un coloide de la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre;
- (c) separar y, opcionalmente, secar y/o formular, la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre producida en la etapa (b).

También se describe una composición que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando, en la que las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre tienen una estructura en la que los grupos oxo o hidroxilo están sustituidos no estequiométricamente por uno o más ligandos, en la que el uno o más ligandos comprenden un ligando de ácido carboxílico o una forma ionizada del mismo, como puede obtenerse mediante el proceso anterior.

También se describe un artículo que tiene una superficie tratada para incluir nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando de la presente invención, en el que las nanopartículas proporcionan a la superficie del artículo propiedades antibacterianas. A continuación se proporcionan ejemplos de artículos tratables de esta manera, tales como equipos médicos, vendajes y apósitos.

Se entenderá que los sustratos recubiertos pueden ser para su uso en un método de tratamiento médico, por ejemplo, para el tratamiento y/o la profilaxis de una infección microbiana o el tratamiento de heridas. El sustrato también puede ser útil para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos de la piel o trastornos de las membranas mucosas.

La presente invención también proporciona el uso de una composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos de la piel o trastornos de las membranas mucosas. Se entiende que el medicamento puede ser un recubrimiento o sustrato recubierto de la presente invención, por ejemplo, un apósito para heridas recubierto o un dispositivo médico recubierto tal como un dispositivo médico implantable, por ejemplo, un stent.

Se describirán ahora realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo y no de limitación con referencia a las figuras y ejemplos adjuntos. Las Figuras 1-6 se proporcionan con fines comparativos.

### Breve descripción de las figuras

- 5 **Figura 1.** Curvas de crecimiento de *E. coli* con exposición a cloruro de cobre a 0 a 50 ppm de Cu. El crecimiento bacteriano se siguió a través de la medición de la densidad óptica (DO) a lo largo del tiempo (parte superior). Solubilidad de cloruro de cobre en el medio de crecimiento bacteriano durante el período del ensayo (parte inferior). Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 3$ ).
- 10 **Figura 2. (A)** NP de CuO y CuSi (según ejemplos experimentales) en agua a aproximadamente 1270 ppm, inmediatamente después de dispersarse (0 h) y una hora después de reposar sin agitación, que muestran la formación de grandes aglomerados de CuO (sedimento de color negro), a diferencia de las NP de CuSi que permanecieron estables en suspensión. **(B)** Potencial Zeta de NP de CuO en una suspensión en agua a aproximadamente 1270 ppm de Cu. Distribución del tamaño de partícula **(C)** y potencial zeta **(D)** de NP de CuSi, ambos analizados a pH 12 en agua a aproximadamente 1200 ppm de cobre. Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 3$ ).
- 15 **Figura 3.** Curvas de crecimiento de *E. coli* después de la exposición a NP de CuO (A) y NP de CuSi a 50 ppm de Cu (B) y su respectiva inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con CuCl<sub>2</sub>, control de cobre soluble (C). Disolución de NP de CuSi y NP de CuO en medio de cultivo bacteriano, a 50 ppm de Cu (D). Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 3$ ).
- 20 **Figura 4.** Comparación de la inhibición del crecimiento de *E. coli* con los niveles de cobre en nanopartículas y soluble en el medio de cultivo bacteriano, a 3 concentraciones diferentes de cobre (12,5, 25 y 50 ppm de Cu) después de 4 horas de incubación con NP de CuO (parte superior) y NP de CuSi (parte inferior).
- 25 **Figura 5.** Cu dispersable en un tampón MOPS a pH  $7,4 \pm 0,2$  tras la dilución de CuCl<sub>2</sub> a un intervalo de concentraciones de 10 a 500 ppm ( $n = 3$ ).
- 30 **Figura 6. (A)** Solubilidad de soluciones madre de Cu-EDTA a pH  $7,5 \pm 0,2$  en agua a aproximadamente 1270 ppm de Cu. Las barras de error representan las desviaciones típicas de dos réplicas analíticas. (B) Inhibición del crecimiento de *E. coli* después de la incubación con complejos de CuEDTA en diferentes relaciones. Téngase en cuenta que los valores negativos representan un aumento en el crecimiento inicial en comparación con los cultivos sin cobre. (C) Cobre dispersable en un tampón MOPS a pH  $7,4 \pm 0,2$  tras la dilución de nanopartículas de CuSi a un intervalo de concentraciones de 10 a 500 ppm. Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 3$ ).
- 35 **Figura 7.** Caracterización de las nanopartículas de CuTartAd (preparadas según ejemplos experimentales). A - Análisis por MET de una suspensión preparada a pH 8 que contenía aproximadamente 2500 ppm de Cu (la suspensión se moldeó gotas en una rejilla de MET). B - Distribución de tamaño de partícula hidrodinámica de las mismas nanopartículas analizadas mediante dispersión dinámica de luz que muestra un tamaño medio de  $3,72 \pm 0,04$  nm. C. Potencial Zeta de NP de CuTartAd a pH 8, aproximadamente 1000 ppm de Cu. D. Espectro de DRX de nanopartículas de CuTartAd amorfas. Los picos en rojo corresponden a halita (NaCl cristalino), que se formó mediante neutralización de una solución ácida que contiene cloruro con hidróxido de sodio. Las barras de error representan las desviaciones típicas de tres réplicas analíticas.
- 40 **Figura 8. A)** Perfil de disolución de NP de CuTartAd en medio de cultivo bacteriano a 12,5, 25 y 50 ppm de Cu; Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 3$ ). B) Cobre dispersable en tampón MOPS a pH  $7,4 \pm 0,2$  tras la dilución de NP de CuTartAd en un intervalo de concentraciones de 10 a 500 ppm. Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 3$ ).
- 45 **Figura 9.** Inhibición del crecimiento de *E. coli* (parte superior) y *S. aureus* (parte superior) después de la incubación con nanopartículas solubles de Cu y CuTartAd, ambas a 50 ppm de Cu. Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 2$ ).
- 50 **Figura 10.** Matriz de HEC que contiene NP de CuTartAd a 250 ppm de Cu (A). Liberación de Cu de las matrices de HEC que contienen 250 ppm de Cu. Las barras de error representan desviaciones típicas ( $n = 3$ ). Este ensayo consistió en exponer el HEC que contiene cobre, con un área superficial específica ( $7,1 \text{ cm}^2$ ), a una solución tamponada de bicarbonato a pH  $7,0 \pm 0,2$ , siguiendo la concentración de cobre a lo largo del tiempo.
- 55 **Figura 11.** También se obtuvo el espectro de DRX del hidróxido de cobre sin modificar sintetizado con fines comparativos (Ejemplo 4.N6) (parte superior). Este último mostró un patrón cristalino correspondiente a la paratacamita, un hidróxido de cobre de fórmula química Cu<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>Cl en el que se incorporó un átomo de cloro en la estructura mineral (parte inferior).
- 60 **Figura 12.** Proliferación celular de fibroblastos dérmicos (estirpe celular CCD-25Sk) tras la exposición a CuCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> y nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con adipato y tartrato (NP de CuTartAd) durante 48 horas.
- 65

## Descripción detallada

### Composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre

5 La producción y caracterización de materiales de iones de poli oxo-hidroxi metálicos modificados con ligandos sólidos y, en particular, materiales a base de oxo-hidróxido de hierro férrico, se describen en las solicitudes anteriores de los presentes inventores WO 2008/096130 y WO 2010/015827. Los procesos correspondientes se adaptaron en el trabajo publicado en la presente solicitud para proporcionar las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando de la presente invención que tienen usos en aplicaciones antibacterianas y antimicrobianas, por ejemplo, para promover la curación de heridas.

En general, esta clase de materiales puede estar representada por la fórmula no estequiométrica  $(M_xL_y(OH)_n)$ , donde M representa uno o más iones metálicos, L representa uno o más ligandos y OH representa grupos oxo o hidroxilo, dependiendo de si los grupos son uniones (grupos oxo) o grupos de superficie en el material sólido de oxo-hidróxido. Como es bien sabido en la técnica, los compuestos no estequiométricos son compuestos químicos con una composición elemental que no puede representarse por una relación de números naturales bien definidos, es decir, los subíndices x, y y n en la fórmula anterior no serán necesariamente todos números naturales, a pesar de que los materiales pueden fabricarse de manera reproducible y tener propiedades uniformemente reproducibles. Preferentemente, los oxo-hidróxidos de cobre modificados con ligando de la presente invención tienen una estructura polimérica en la que los grupos oxo o hidroxilo están sustancialmente sustituidos aleatoriamente por los ligandos. Esto proporciona nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre que tienen una o más propiedades fisicoquímicas reproducibles, por ejemplo, composiciones que tienen uno o más de un diámetro medio de tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm (por ejemplo, como se determina por dispersión dinámica de luz, véase la sección 1.2.1), un perfil de disolución reproducible, composiciones en las que las nanopartículas son sustancialmente amorfas (por ejemplo, como se determina mediante difracción de rayos X o microscopía electrónica de transmisión, véanse las secciones 1.2.3 y 1.2.4) y/o composiciones en las que las nanopartículas tienen un enlace metal-ligando demostrable (por ejemplo, como se determina usando espectroscopía infrarroja). Adicionalmente, o como alternativa, las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre son capaces de liberar un porcentaje de cobre soluble que es preferentemente de al menos el 25 % del cobre total presente en la composición, más preferentemente al menos el 30 %, más preferentemente al menos el 40 % y mucho más preferentemente al menos el 50 %. La liberación de cobre soluble puede medirse en un ensayo de liberación de cobre libre (por ejemplo, como se describe en los ejemplos a continuación). Las propiedades biocidas de las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre pueden medirse usando un ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano y preferentemente consigue al menos un 50 % de inhibición del crecimiento bacteriano, más preferentemente al menos un 60 % de inhibición del crecimiento bacteriano, más preferentemente al menos un 70 % de inhibición del crecimiento bacteriano y más preferentemente al menos un 90 % de inhibición del crecimiento bacteriano en condiciones normalizadas. En una realización preferida, la inhibición completa (100 %) del crecimiento de *E. coli* se consigue usando las composiciones antimicrobianas de la presente invención, por ejemplo, en un ensayo en el que *E. coli* se expuso a las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado por ligando durante 6 horas con concentraciones de cobre superiores a 25 mg/l inhibiendo por completo el crecimiento de *E. coli* (100 %) en estas condiciones específicas. Un ejemplo adicional de un ensayo de inhibición del crecimiento adecuado se proporciona en la sección 1.3.2.

Normalmente, el ion metálico (por ejemplo,  $Cu^{2+}$ ) estará presente originalmente en forma de una sal que en la preparación de los materiales puede disolverse y después inducirse a formar co-complejos de poli oxo-hidroxi con ligando (L). Como se describe a continuación, puede haber presentes otros iones metálicos además de los iones de cobre ( $Cu^{2+}$ ). Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los presentes inventores creen que en estos materiales y en las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado por ligando de la presente invención, parte del ligando utilizado para modificar el oxo-hidróxido de metal está integrado dentro de la fase sólida a través de un enlace M-L formal, es decir, no todo el ligando (L) está simplemente atrapado o adsorbido en el material a granel y/o está adsorbido o aplicado como recubrimiento sobre la superficie de las partículas del material de oxo-hidróxido metálico. La unión del ión metálico en los materiales puede determinarse usando técnicas analíticas físicas tales como la espectroscopía infrarroja donde los espectros tendrán picos característicos de los enlaces entre el ión metálico y el ligando (L), así como picos característicos de otros enlaces presentes en el material tales como M-O, O-H y enlaces en la especie de ligando (L). Como alternativa o adicionalmente, las especies de ligando pueden introducirse en la estructura de fase sólida mediante la sustitución de grupos oxo o hidroxilo por moléculas de ligando de una manera que disminuya el orden global en el material de fase sólida, de manera que los materiales tengan una naturaleza más amorfa en comparación, por ejemplo, con la estructura del correspondiente hidróxido de cobre no modificado. El experto puede determinar fácilmente la presencia de una estructura más desordenada o amorfa usando técnicas bien conocidas en la materia. Una técnica de ejemplo es la microscopía electrónica de transmisión (MET). La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución permite evaluar visualmente el patrón cristalino del material. Puede indicar el tamaño y la estructura de las partículas primarias (tal como el espaciado d), proporcionar determinada información sobre la distribución entre material amorfo y cristalino. Esto puede ser especialmente evidente usando microscopía electrónica de transmisión de barrido corregida por campo oscuro anular de alto ángulo debido al alto contraste conseguido mientras se mantenía la resolución, permitiendo de este modo visualizar la superficie y el volumen de las partículas primarias del material.

Las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre que se desvelan en el presente documento usan iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) para proporcionar composiciones que son capaces de administrar concentraciones biológicamente eficaces de cobre biocida, por ejemplo, para su uso como agentes antibacterianos o antimicrobianos. Las composiciones de la presente invención pueden tener adicionalmente la ventaja de ser biológicamente compatibles y no tóxicas en vista de la tolerancia fisiológica general al cobre.

Como antecedente, es bien sabido en la técnica que los óxidos, los hidróxidos y los oxo-hidróxidos de cobre se componen de  $\text{Cu}^{2+}$  junto con 0 y/o OH y se denominan colectivamente en la presente patente y se conocen en la técnica como "oxo-hidróxidos de cobre". Además de la presencia de iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), puede haber presentes otros iones metálicos tales como cationes metálicos seleccionados entre  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y/o  $\text{Zn}^{2+}$ . En particular, puede ser deseable incluir cationes metálicos adicionales con propiedades antimicrobianas, tales como  $\text{Ag}^+$ . Un tipo preferido adicional de materiales incluye  $\text{Zn}^{2+}$ , además de iones de cobre.

Las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención se basan en el desarrollo de composiciones diseñadas para la administración óptima de cobre soluble, por ejemplo, para su uso en aplicaciones donde es deseable la actividad antibacteriana del cobre soluble. Los ejemplos comparativos en el presente documento muestran que cuando se dispersan a las concentraciones que se requieren en las formulaciones clínicas, las sales de cobre comunes tienden a precipitar como hidróxidos de cobre grandes y biocidamente inactivos (como se muestra en la Figura 5). Por otra parte, aunque la adición de agentes formadores de complejos (por ejemplo, EDTA) evita la formación de dichos aglomerados y es capaz de mantener el cobre en solución, estas preparaciones mostraron una inhibición modesta del crecimiento bacteriano debido a la biodisponibilidad limitada de los iones de cobre en forma de complejos. Estos experimentos demostraron que a pesar de que los iones de cobre son la forma activa responsable de la actividad biocida, las sales de cobre no son una buena forma de administrarlos, ya que las formas de sal tienden a convertirse en hidróxidos de cobre insolubles. Los presentes inventores se dieron cuenta de que ninguno de estos enfoques es deseable ya que los iones de cobre no están biológicamente disponibles, ya sea por estar presentes en aglomerados o por formar complejos fuertemente mediante agentes, tales como EDTA.

En consecuencia, la presente invención se refiere a sistemas de nanopartículas para la administración de iones de cobre libre funcionalizando nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre con ligandos, por ejemplo, ligandos dietéticos tales como ácidos carboxílicos o aminoácidos. En un enfoque preferente, la fase mineral de las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre se modificó a través del uso de ligandos de carboxilato, tales como tartrato, gluconato, adipato y/o glutatión, lo que confirió carga superficial negativa y estabilizó las nanopartículas en ambientes acuosos.

Preferentemente, las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención tienen intervalos de diámetro medio de 1 a 100 nm, de 1 a 50 nm, de 1 a 20 nm, de 1 a 10 nm. El tamaño de las partículas de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre puede determinarse usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como la dispersión dinámica de luz, como se demuestra en los ejemplos de la sección 1.2.1. A modo de ejemplo, esto puede realizarse usando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). En un experimento típico, pueden transferirse de 0,5 a 1 ml de una suspensión de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre en una pequeña cubeta desechable a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y las mediciones se realizaron usando los siguientes ajustes: índice de refracción del material 0,192, absorción 0,1, índice de refracción del dispersante 1,330, viscosidad 1,00331 mPa.s.

Sin modificación, las partículas primarias de los materiales utilizados en el presente documento tienen núcleos de óxido metálico y superficies de hidróxido metálico y dentro de diferentes disciplinas pueden denominarse óxidos metálicos o hidróxidos metálicos. El uso del término 'oxo-hidroxi' u 'oxo-hidróxido' pretende reconocer estos hechos sin ninguna referencia a las proporciones de grupos oxo o hidroxi. Por tanto, el hidroxi-óxido podría usarse igualmente. Para disipar cualquier duda, el hidróxido de cobre también incluye diversos polimorfos dopados con cloruro; en particular,  $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$  es un derivado de hidróxido de cobre en el que se incorporó un átomo de cloro en la estructura cristalina que presenta cuatro tipos de fase mineral: atacamita, botallackita, paratacamita y clinoatacamita. Los presentes inventores creen que las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención se alteran al nivel de la partícula primaria del oxo-hidróxido metálico con al menos parte del ligando L que se introduce en la estructura de la partícula primaria, es decir conduciendo al dopaje de la partícula primaria por las moléculas del ligando. Esto puede contrastarse con la formación de nano-mezclas de oxo-hidróxidos metálicos y una molécula orgánica en la que la estructura de las partículas primarias no está tan alterada y el ligando orgánico solamente se aplica como recubrimiento o se adsorbe sobre la superficie de las partículas, como sucede cuando las partículas de oxo-hidróxido metálico se preforman antes de ponerse en contacto con el ligando.

Las partículas primarias de los materiales de iones metálicos de poli oxo-hidroxi modificados con ligando que se describen en el presente documento pueden producirse convenientemente mediante precipitación. El uso del término precipitación con frecuencia se refiere a la formación de agregados de materiales que se separan de la solución mediante sedimentación o centrifugación. En este caso, el término "precipitación" pretende describir la formación de todo el material en fase sólida, incluyendo los agregados descritos anteriormente y los materiales sólidos que no se agregan pero permanecen como restos no solubles en suspensión, ya sea en forma de partículas o nanopartículas (coloidales o sub-coloidales). Estos últimos materiales sólidos también pueden denominarse sólidos en forma de partículas hidratados.

En la presente invención, puede hacerse referencia a los oxo-hidróxidos metálicos modificados que tienen estructuras poliméricas que generalmente no son cristalinas y, por tanto, tienen estructuras poliméricas o reticuladas tridimensionales que generalmente se forman por encima del pH crítico de precipitación. Como se usa en el presente documento, esto no debe tomarse como indicativo de que las estructuras de los materiales sean poliméricas en el sentido estricto de tener una unidad monomérica repetitiva regular porque, como se ha indicado, la incorporación de ligando es, excepto por coincidencia, no estequiométrica. La especie de ligando se introduce en la estructura de fase sólida mediante la sustitución de grupos oxo o hidroxilo conduciendo a un cambio en el orden de la fase sólida. En algunos casos, por ejemplo, en la producción de las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre ejemplificadas en el presente documento, la especie de ligando L puede introducirse en la estructura de fase sólida mediante la sustitución de grupos oxo o hidroxilo por moléculas de ligando de una manera que disminuya el orden global en el material en fase sólida. Aunque esto todavía produce materiales de iones metálicos de poli oxo-hidroxilo modificados con ligando sólido que en la forma bruta tienen una o más propiedades fisicoquímicas reproducibles, los materiales tienen una naturaleza más amorfa en comparación, por ejemplo, con la estructura del oxo-hidróxido metálico no modificado correspondiente. El experto puede determinar fácilmente la presencia de una estructura más desordenada o amorfa usando técnicas bien conocidas en la materia. Una técnica de ejemplo es la microscopía electrónica de transmisión (MET). La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución permite evaluar visualmente el patrón cristalino del material. Puede indicar el tamaño y la estructura de las partículas primarias (tal como el espaciado  $d$ ), proporcionar determinada información sobre la distribución entre material amorfo y cristalino. Usando esta técnica, es evidente que la química descrita anteriormente aumenta la fase amorfa de los materiales descritos por los presentes inventores en comparación con los materiales correspondientes sin el ligando incorporado. Esto puede ser especialmente evidente usando microscopía electrónica de transmisión de barrido corregida por campo oscuro anular de alto ángulo debido al alto contraste conseguido mientras se mantenía la resolución, permitiendo de este modo visualizar la superficie y el volumen de las partículas primarias del material.

La combinación de estas propiedades fisicoquímicas descritas anteriormente promueve la liberación rápida de iones de cobre y, como se muestra en los ejemplos, se traduce en una alta eficacia bactericida contra una amplia gama de bacterias gramnegativas y grampositivas. Es importante destacar que los oxo-hidróxidos modificados con carboxilatos, a diferencia de las sales de cobre (tales como  $\text{CuCl}_2$ ) o las nanopartículas de cobre comerciales, pudieron liberar cobre a niveles biocidas cuando se incorporaron en una matriz de administración tal como gel de hidroxietilcelulosa (un ejemplo de una matriz de administración tópica), mostrando que la funcionalización de ligando puede usarse para el desarrollo de biocidas tópicos o para proporcionar una composición que sea capaz de proporcionar un recubrimiento antibacteriano para artículos.

Los ejemplos de propiedades que pueden modularse de manera útil usando la presente invención incluyen: disolución (velocidad, dependencia del pH y dependencia de  $[\text{Cu}]$ ), desagregación, características de adsorción y absorción, reactividad-inercia, punto de fusión, resistencia a la temperatura, tamaño de partícula, magnetismo, propiedades eléctricas, densidad, propiedades de absorción/reflexión de la luz, dureza-blandura, color y propiedades de encapsulación. En este contexto, una propiedad o característica puede ser reproducible si los experimentos replicados son reproducibles dentro de una desviación típica de preferentemente el  $\pm 10\%$  y más preferentemente el  $\pm 5\%$  y aún más preferentemente dentro de un límite del  $\pm 2\%$ . En particular, los presentes inventores han descubierto que las propiedades de las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre, tales como la labilidad, se conservan tras resuspender las composiciones que se han secado, por ejemplo, para el almacenamiento.

El perfil de disolución de las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando puede representarse mediante diferentes etapas del proceso, en concreto, desagregación y disolución. El término disolución se usa para describir el paso de una sustancia de la fase sólida a la soluble. Más específicamente, la desagregación tiene por objeto describir el paso de los materiales de una fase agregada sólida a una fase acuosa que es la suma de la fase soluble y la fase en partículas hidratada (es decir, fases de solución más suspensión). Por tanto, el término disolución en lugar de desagregación representa más específicamente el paso de cualquier fase sólida (agregada o hidratada) a la fase soluble.

#### *El ligando (L)*

En las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando representadas por la fórmula  $(\text{M}_x\text{-L}_y(\text{OH})_n)$ , L representa uno o más ligandos o aniones, tal como inicialmente en su forma protonada o de metal alcalino, que puede incorporarse en el material de iones metálicos de poli oxo-hidroxilo modificado con ligando en fase sólida. En los materiales que se describen en el presente documento, al menos uno de los ligandos es un ligando de ácido carboxílico o una forma ionizada del mismo (es decir, un ligando de carboxilato), tal como tartrato (o ácido tartárico), gluconato (o ácido glucónico), adipato (o ácido adípico), glutatión y/o un aminoácido y/o un ácido de azúcar. Preferentemente, el ligando es un ligando de ácido mono o dicarboxílico y puede representarse mediante la fórmula  $\text{HOCH}_2\text{-R}_1\text{-COOH}$  o  $\text{HOOC-R}_1\text{-COOH}$  (o una forma ionizada de la misma), donde  $\text{R}_1$  es un grupo alquilo  $\text{C}_{1-10}$  opcionalmente sustituido, alqueno  $\text{C}_{1-10}$  o alquino  $\text{C}_{1-10}$ . En general, se prefiere el uso de ligandos en los que  $\text{R}_1$  es un grupo alquilo  $\text{C}_{1-10}$  y más preferentemente es un grupo alquilo  $\text{C}_{2-6}$ . Los sustituyentes opcionales preferidos del grupo  $\text{R}_1$  incluyen uno o más grupos hidroxilo, por ejemplo, como los presentes en el ácido málico. En realizaciones preferidas, el grupo  $\text{R}_1$  es un grupo alquilo de cadena lineal. Un grupo más preferido de ligandos de ácido carboxílico incluye ácido tartárico (o tartrato), gluconato (o ácido glucónico), ácido adípico (o adipato), ácido glutárico (o glutarato),

ácido pimélico (o pimelato), ácido succínico (o succinato) y ácido málico (o malato) y combinaciones de los mismos. Si el ligando de ácido carboxílico está presente como ácido o si está parcial o completamente ionizado y presente en forma de un anión carboxilato dependerá de diversos factores tales como el pH al que se produce y/o recupera el material, el uso de tratamiento de postproducción o etapas de formulación y cómo se incorpora el ligando en el material de iones metálicos de poli oxo-hidroxi. En algunas realizaciones, al menos una proporción del ligando estará presente en forma de carboxilato ya que el material se recupera normalmente a  $\text{pH} > 4$  y debido a que la interacción entre el ligando y el hierro cargado positivamente se potenciaría en gran medida por la presencia del ion carboxilato cargado negativamente. Para disipar cualquier duda, el uso de ligandos de ácido carboxílico de acuerdo con la presente invención cubre todas estas posibilidades, es decir, el ligando presente como un ácido carboxílico, en una forma no ionizada, en una forma parcialmente ionizada (por ejemplo, si el ligando es un ácido dicarboxílico) o completamente ionizado como un ion carboxilato y mezclas de los mismos.

Normalmente, se incorporan ligandos en los materiales de iones metálicos de poli oxo-hidroxi en fase sólida para ayudar en la modificación de una propiedad fisicoquímica del material sólido, por ejemplo, en comparación con una especie de ion metálico poli oxo-hidroxilado en el que el ligando o ligandos están ausentes. En algunas realizaciones de la presente invención, el ligando o ligandos L también pueden tener determinada capacidad tamponante. Los ejemplos de ligandos que pueden emplearse en la presente invención incluyen, pero no se limitan de ninguna manera a: ácidos carboxílicos tales como ácido tartárico, ácido glucónico, ácido adípico, ácido glutárico, ácido málico, ácido succínico, ácido aspártico, ácido pimélico, ácido cítrico, , ácido láctico o ácido benzoico; aditivos alimentarios tales como maltol, etil maltol o vainillina; aminoácidos tales como triptófano, glutamina, prolina, valina o histidina; y ligandos a base de nutrientes tales como folato, ascorbato, piridoxina o niacina o nicotinamida; ácidos de azúcar tales como el ácido glucónico. Normalmente, se usan dos ligandos de diferentes afinidades para el ion metálico en la producción de estos materiales, aunque pueden ser útiles uno, dos, tres, cuatro o más ligandos en determinadas aplicaciones.

Para muchas aplicaciones, los ligandos deben ser biológicamente compatibles en las condiciones utilizadas y generalmente tienen uno o más átomos con un par solitario de electrones en el punto de reacción. Los ligandos incluyen aniones, ligandos débiles y ligandos fuertes. Los ligandos pueden tener cierta capacidad tamponante intrínseca durante la reacción. Sin desear quedar ligado a una explicación particular, los inventores creen que los ligandos tienen dos modos de interacción:

(a) sustitución de grupos oxo o hidroxilo y, por tanto, incorporación con un carácter en gran parte covalente dentro del material y (b) adsorción no específica (formación de pares de iones). Es probable que estos dos modos se relacionen con diferentes afinidades metal-ligando (es decir, ligandos fuertes para el primero y ligandos débiles/aniones para el segundo). Existen ciertas pruebas en el trabajo actual de los presentes inventores de que los dos tipos de ligando son sinérgicos en la modulación de las características de disolución de los materiales y, quizás, por tanto, en la determinación de otras características del material. En este caso, se usan dos tipos de ligando y puede demostrarse que al menos uno (tipo (a)) muestra la unión del metal dentro del material. La eficacia del ligando, probablemente especialmente para los ligandos de tipo (b), puede verse afectada por otros componentes del sistema, en particular los electrolitos.

La relación del ión o los iones metálicos al ligando o ligandos (L) también es un parámetro del material de hierro metálico de poli oxo-hidroxi modificado con ligando en fase sólida que puede variarse de acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento para variar las propiedades de los materiales. En general, las relaciones útiles de Cu:L estarán entre 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 y 1:1 y 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o 1:10 y preferentemente relaciones de Cu a ligando de 1:1 o inferior.

#### *Producción y procesamiento de las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre*

En general, las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención pueden producirse mediante un proceso que comprende:

(a) mezclar la solución que comprende  $\text{Cu}^{3+}$  y un ligando de ácido carboxílico y, opcionalmente, cualesquier ligandos adicionales u otros componentes, en un medio de reacción a un primer  $\text{pH(A)}$  en el que los componentes son solubles;

(b) cambiar el  $\text{pH(A)}$  a un segundo  $\text{pH(B)}$  para provocar que se forme un precipitado sólido o un coloide de la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre;

(c) separar y, opcionalmente, secar y/o formular, la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre producida en la etapa (b).

Los ejemplos de condiciones que pueden emplearse incluyen lo siguiente usando un primer  $\text{pH(A)}$  que es inferior a 4,0 y el segundo  $\text{pH(B)}$  que está entre 5,0 y 12,0, y más preferentemente entre 6,0 y 8,0, y realizando la reacción a temperatura ambiente (20-25 °C). En general, se prefiere que en la etapa (a), la solución contenga de 20 a 100 mM o  $\text{Cu}^{2+}$  1 M y de 50 a 250 mM de un ligando de ácido carboxílico adecuado y más preferentemente  $\text{Cu}^{2+}$  aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM del ligando.

Después, la separación de un material candidato puede ir seguida de una o más etapas en las que el material se caracteriza o se somete a ensayo. A modo de ejemplo, el ensayo puede realizarse *in vitro* o *in vivo* para determinar

una o más propiedades del material como se ha descrito anteriormente, más en particular su perfil de disolución, liberación de cobre soluble y/o propiedades antibacterianas. Como alternativa o adicionalmente, el proceso puede comprender alterar químicamente, por ejemplo, a través de un proceso de valoración, o físicamente, por ejemplo, a través de un proceso de micronización, el tamaño de partícula final de la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre y/o someter la composición a una o más etapas de procesamiento adicionales en el camino para producir una composición final, por ejemplo, para la administración a un sujeto. Los ejemplos de etapas adicionales incluyen, pero sin limitación: lavado, centrifugación, filtración, secado por pulverización, liofilización, secado al vacío, secado al horno, diálisis, molienda, granulación, encapsulación, formación de comprimidos, mezcla, compresión, nanodimensionamiento y micronización.

En algunas realizaciones, pueden realizarse etapas adicionales entre la producción inicial del material y cualquier etapa posterior en la que se formule como medicamento. Estas etapas de modificación de postproducción adicionales pueden incluir la etapa de lavar el material, para retirar impurezas o reemplazar un ligando incorporado con el ligando adicional.

#### Grupos hidroxilo y oxo

La presente invención puede emplear cualquier forma de formar iones hidróxido a concentraciones que puedan proporcionar grupos hidroxilo de superficie y uniones oxo en la formación de estos materiales de poli oxo-hidroxilo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, soluciones alcalinas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, fosfato de sodio y bicarbonato de sodio, que se añadirían para aumentar [OH] en una mezcla de ML, o soluciones ácidas tales como ácidos minerales o ácidos orgánicos, que se añadirían para disminuir [OH] en una mezcla de ML.

Las condiciones utilizadas para producir las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención pueden adaptarse para controlar la naturaleza fisicoquímica del precipitado o ayudar de otro modo en su recogida, recuperación o formulación con uno o más excipientes. Esto puede implicar la inhibición intencional de la aglomeración o las etapas de secado o molienda utilizadas para afectar posteriormente a las propiedades del material. Sin embargo, estas son variables generales para cualquier sistema de este tipo para la extracción sólida de una fase de solución. Después de la separación del material precipitado, puede secarse opcionalmente antes de su uso o formulación adicional. El producto seco puede, sin embargo, retener algo de agua y estar en forma de un material de ion metálico de poli oxo-hidroxilo modificado con ligando en fase sólida hidratado. Será evidente para los expertos en la materia que en cualquiera de las etapas que se describen en el presente documento para la recuperación de la fase sólida, pueden añadirse excipientes que se mezclan con el material de iones metálicos de poli oxo-hidroxilo modificado con ligando pero no modifican la partícula primaria y se usan en vista de optimizar la formulación para la función prevista del material. Los ejemplos de estos podrían ser, pero sin limitación, glucolípidos, fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina), azúcares y polisacáridos, alcoholes de azúcar (por ejemplo, glicerol), polímeros (por ejemplo, polietilenglicol (PEG)) y ácido taurocólico.

#### Formulaciones y usos

La composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención puede formularse para su uso como agentes antibacterianos o agentes antimicrobianos, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas o microbianas. En consecuencia, las composiciones de la presente invención pueden comprender, además de uno o más de los materiales en fase sólida, un excipiente, un vehículo, un tampón y un estabilizador farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir significativamente con la eficacia de los materiales en fase sólida para la aplicación en cuestión.

El término "antibacteriano" como se usa en el presente documento incluye el tratamiento o la prevención de infecciones provocadas por microorganismos gramnegativos y grampositivos incluyendo *Escherichia sp.*, tal como *E. coli*, *Staphylococcus sp.*, tal como *S. epidermis*, *S. aureus* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina ("SARM"), *Bacillus sp.*, tal como *B. subtilis*, *Pseudomonas sp.*, tal como *P. aeruginosa*, *Vibrio sp.*, tal como *V. fisheri*, *Streptococcus sp.*, tal como *S. pyrogenes* y *S. pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Micrococcus sp.*, tal como *M. luteus*, *Clostridium sp.* tal como *C. difficile*, *Acinetobacter sp.* tal como *A. baumannii*, *Mycobacterium sp.*, tal como *M. tuberculosis* y *Salmonella sp.*, u hongos que incluyen *Candida sp.*, tal como *C. albicans*. Se entiende que el término "antimicrobiano" como se usa en el presente documento se aplica a sustancias que incluyen aquellas que inhiben la unión microbiana a las superficies, destruyen los microbios y/o inhiben la reproducción microbiana. Se entiende que el término "microbio" incluye todos los microorganismos, incluyendo las bacterias como se indicaron anteriormente, así como hongos tales como levadura, arqueas y protistas. Los términos "microbiano" y "antimicrobiano" deben interpretarse en consecuencia.

El uso de las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención dependerá mucho de si las composiciones están destinadas para el tratamiento o prevención de infección en un sujeto humano o animal o para proporcionar una superficie de un artículo que sea resistente a la colonización bacteriana o microbiana. Un ejemplo de la última aplicación incluye proporcionar recubrimientos para equipo médico o apósitos.

En las realizaciones en las que las composiciones están destinadas para la administración al sujeto, por ejemplo, en el tratamiento de heridas o infecciones de la piel, la naturaleza precisa del vehículo u otro componente puede estar relacionada con la forma o vía de administración de la composición, normalmente a través de una vía tópica. Esto puede incluir la formulación de las composiciones de nanopartículas en una matriz sólida, semisólida o en gel, o en un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Los ejemplos de vehículos incluyen solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Los materiales y composiciones utilizados de acuerdo con la presente invención que han de proporcionarse a un individuo se administran preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar beneficio para el estado clínico del individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el ciclo de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la posología, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos, y normalmente se tiene en cuenta el trastorno que ha de tratarse, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins. Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente, dependiendo de la afección que ha de tratarse.

En un ejemplo, las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención se formulan en una matriz, por ejemplo, una matriz de hidroxialquilcelulosa, tal como hidroxietilcelulosa (HEC) o hidroximetilcelulosa (HMC) o una matriz de polialquilenglicol, tal como PEG. Algunas de estas matrices son derivados de celulosa que se han utilizado ampliamente en productos para el cuidado de la salud y cosméticos y tienen la ventaja de que no requieren el procesamiento adicional (por ejemplo, calentamiento y secado) de las nanopartículas durante la preparación de la matriz, por lo que tienen un efecto mínimo sobre las propiedades antibacterianas o antimicrobianas de las composiciones de nanopartículas.

En otras realizaciones, las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención pueden formularse para administración tópica, por ejemplo, en forma de una pomada sólida o semisólida útil en el tratamiento de heridas, úlceras o el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana. En dichas aplicaciones, los polialquilenglicoles son muy adecuados para la administración tópica de los materiales, ya que forman una crema o pomada y están disponibles en un intervalo de diferentes pesos moleculares, lo que permite la adaptación de la viscosidad y otros parámetros físicos que pueden ser deseables en la pomada final. La aplicación de la presente invención a productos tópicos tiene un uso terapéutico para la curación de heridas y como en composiciones antiinfecciosas.

En todos los aspectos de la presente invención en los que las composiciones se formulan para la administración a un sujeto, se prefiere que el pH de la composición o una formulación que la contiene se eleve a un pH fisiológico, preferentemente a un pH de entre 5,0 y 9,0, y más preferentemente a un pH de entre 6,0 y 8,5. Los ejemplos muestran que las composiciones de la presente invención son capaces de hacer que el cobre libre esté biodisponible en estas condiciones. Convenientemente, esto puede hacerse añadiendo una base, tal como hidróxido de sodio o carbonato de sodio. El objetivo de esto es que la administración a un sujeto no produzca resultados clínicos no previstos, tales como dolor o inflamación.

Una cantidad eficaz de composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre en el presente documento puede formularse para la aplicación tópica, por ejemplo, a la piel, los dientes, las uñas o el cabello. Estas composiciones pueden estar en forma de cremas, lociones, geles, suspensiones, dispersiones, microemulsiones, nanodispersiones, microesferas, hidrogeles, emulsiones (aceite en agua y agua en aceite, así como emulsiones múltiples) y geles multilaminares y similares (véase, por ejemplo, *The Chemistry and Manufacture of Cosmetics*, Schlossman et al., 1998) y pueden formularse como composiciones acuosas o de silicona o pueden formularse como emulsiones de una o más fases oleosas en una fase acuosa continua (o una fase acuosa en una fase oleosa). El tipo de vehículo utilizado en la presente invención depende de las propiedades de la composición tópica. El vehículo puede ser sólido, semisólido o líquido. Los vehículos adecuados son líquidos o semisólidos, tales como cremas, lociones, geles, barras, pomadas, pastas, pulverizaciones y espumas. Específicamente, el vehículo tiene la forma de una crema, una pomada, una loción o un gel, más específicamente uno que tiene un espesor o punto de fluencia suficiente para evitar que las partículas sedimenten. El vehículo puede ser inerte o puede poseer sus propios beneficios. El vehículo también debe ser física y químicamente compatible con la composición antibacteriana u otros ingredientes formulados en el vehículo. Los ejemplos de vehículos incluyen agua, hidroxietilcelulosa, propilenglicol, butilenglicol y polietilenglicol o una combinación de los mismos.

Además del uso terapéutico de la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando, también pueden aplicarse como recubrimientos antimicrobianos o antibacterianos a artículos, por ejemplo, recubrimientos sobre sustratos que comprenden tejido, tejido no tejido, plástico, vidrio y/o metal. La naturaleza antimicrobiana de los recubrimientos los hace particularmente adecuados para ser aplicados a sustratos para su uso en aplicaciones médicas o de cuidado personal. En particular, los recubrimientos son particularmente útiles en

sustratos que están en contacto con el cuerpo, por ejemplo, con la piel o las membranas mucosas, en su uso normal, por ejemplo, apósitos, vendajes y tiritas.

Por ejemplo, el crecimiento microbiano es un problema particular cuando la piel o las membranas mucosas están cubiertas, por ejemplo, por un vendaje, pañal o ropa interior. Tan pronto como la piel o la membrana mucosa se cubren, las condiciones ambientales para el crecimiento microbiano mejoran. Los microbios presentes en la piel o la membrana mucosa pueden multiplicarse a velocidades potenciadas, en particular cuando el ambiente está húmedo y/o no expuesto al aire. Las secreciones de estos microbios incluyen excreciones ácidas o alcalinas que pueden alterar el pH de la piel, la secreción de toxinas y la secreción de enzimas, incluyendo la secreción de proteasa. Estas secreciones y excreciones pueden provocar irritación de la piel y de las membranas mucosas y, en los casos más graves, la degradación de la piel o las membranas mucosas, tal como la dermatitis.

Las afecciones particulares que pueden aparecer después del recubrimiento de la piel o la membrana mucosa incluyen úlceras. La candidiasis es una infección fúngica, por el género de levadura *Candida*, en particular *Candida albicans*. Los síntomas incluyen picor, ardor y dolor e inflamación del área infectada. El uso de compresas sanitarias, compresas para la incontinencia, pañales y/o ropa interior ajustada puede producir condiciones favorables para el crecimiento de *Candida*, lo que puede provocar úlceras. Los recubrimientos utilizados en la presente invención pueden ser eficaces contra hongos tales como levadura y, en consecuencia, se entenderá que proporcionar los recubrimientos sobre los artículos mencionados anteriormente puede permitir el tratamiento y/o la profilaxis de las úlceras.

De forma similar, la dermatitis de contacto (habitualmente conocida como erupción del pañal) puede ser provocada por el uso de compresas o pañales para la incontinencia. La piel empapada o húmeda pierde su estructura, el pH alto puede promover el crecimiento bacteriano y las bacterias pueden secretar enzimas que descomponen el tejido de la piel. Este entorno también puede promover o exacerbar las úlceras por presión (habitualmente conocidas como escaras), que son particularmente problemáticas cuando se infectan. Se ha descubierto que los recubrimientos son eficaces contra las bacterias y, en consecuencia, se entenderá que proporcionar los recubrimientos en tampones, compresas sanitarias, compresas o pañales para incontinencia puede permitir el tratamiento y/o la profilaxis de la dermatitis de contacto y/o las úlceras por presión.

Por razones similares, la dermatitis de contacto y las infecciones por hongos pueden aparecer con apósitos médicos, por ejemplo, apósitos para heridas y quemaduras. Una consideración adicional con los apósitos médicos es la necesidad de prevenir la infección bacteriana de la herida o la quemadura. Cuando se quema la piel, puede dañarse una gran cantidad de tejido que puede reducir o destruir las propiedades de barrera naturales de la piel y las heridas que rompen la piel también afectan a las propiedades de barrera de la piel. Esto puede conducir a una infección oportunista que puede retrasar la curación y al choque séptico. Adicionalmente, la infección microbiana, en particular la infección bacteriana, puede ser un problema después de la cirugía. El uso de dispositivos médicos o quirúrgicos, por ejemplo, dispositivos médicos implantables, que estén recubiertos con los presentes recubrimientos antimicrobianos puede ayudar a prevenir o tratar la infección posquirúrgica. En consecuencia, se entenderá que proporcionar los recubrimientos en apósitos para heridas y/o quemaduras puede permitir el tratamiento y/o la profilaxis de la dermatitis de contacto y/o la infección microbiana.

Las composiciones de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de la presente invención, entonces, pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una infección microbiana, y/o trastornos de la piel o de las membranas mucosas tales como la inflamación y la dermatitis. En particular, los recubrimientos antibacterianos o antimicrobianos pueden ser útiles para el tratamiento y/o la profilaxis de la infección de una herida, la infección de una quemadura, la infección de una úlcera por presión, la infección posquirúrgica, las úlceras, la dermatitis de contacto y las úlceras por presión. La infección microbiana puede ser por cualquier microbio, en particular bacterias y/o levaduras tales como *Staphylococcus sp.*, tal como *S. aureus*, *Pseudomonas sp.*, tal como *P. aeruginosa*, *Micrococcus sp.*, tal como *M. luteus*, *Saccharomyces sp.*, tal como *S. cerevisiae*, *Candida sp.*, tal como *C. albicans*, *Staphylococcus sp.*, tal como *S. epidermis*, *Streptococcus sp.*, tal como *S. pyrogenes*, *Klebsiella sp.* y *Escherichia sp.*, tal como *E. coli*, *Chlamydia sp.* Las composiciones pueden además ser activas contra virus o parásitos.

El medicamento puede ser un sustrato recubierto mediante los métodos de recubrimiento de la presente invención. Por ejemplo, entonces, el medicamento puede ser un sustrato recubierto, tal como un dispositivo médico recubierto, por ejemplo, un dispositivo médico implantable. Los ejemplos incluyen una semilla quirúrgica, un catéter (tal como un catéter urinario, un catéter de acceso vascular, un catéter epidural), un puerto de acceso vascular, un sensor intravascular, un tubo de traqueotomía, un tubo de gastrostomía endoscópica percutánea, un tubo endotraqueal, un dispositivo protésico implantable, tal como un stent, y dispositivos relacionados de corta duración o biocontacto. El medicamento puede ser un sustrato recubierto, tal como un pañal recubierto, compresa sanitaria, tampón, compresa para incontinencia, apósito tal como un apósito para heridas o quemaduras, vendajes o ropa interior. Muchos de estos sustratos (en particular los pañales, compresas sanitarias, compresas y apósitos, tales como apósitos para heridas o quemaduras) comprenden un componente de tejido no tejido, que puede estar en contacto con la piel o la membrana mucosa en el uso normal. Los presentes inventores han demostrado que los recubrimientos y los métodos de recubrimiento de la presente invención son particularmente adecuados para sustratos de tejido no tejido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tejido no tejido" incluye tejidos o textiles formados a partir de

una banda de fibras. En el tejido no tejido, las fibras no están tejidas ni tricotadas. Normalmente, los no tejidos se fabrican juntando pequeñas fibras en forma de una lámina o banda y después uniéndolas mecánicamente. Los ejemplos de tejidos no tejidos incluyen no tejidos de polipropileno.

- 5 Se entenderá que el proceso de fabricación del medicamento puede incluir proporcionar un recubrimiento antimicrobiano sobre un sustrato. En consecuencia, la fabricación del medicamento puede comprender cualquiera de las etapas de los métodos que se describen en el presente documento para proporcionar recubrimientos antimicrobianos.
- 10 La presente invención también proporciona sustratos recubiertos mediante los presentes métodos. Los sustratos recubiertos pueden usarse en un método de tratamiento médico e incluyen los sustratos recubiertos mencionados anteriormente como posibles medicamentos. Se entenderá que la presente invención también proporciona un método de tratamiento médico para el tratamiento y/o la profilaxis de una infección microbiana y/o de trastornos de la piel o la membrana mucosa, y el uso de los sustratos recubiertos presentes en dichos métodos. Los métodos de recubrimiento de la presente invención son aplicables al recubrimiento de los sustratos mencionados en el presente documento, como medicamentos u otros.

Además de las aplicaciones descritas anteriormente, los recubrimientos antimicrobianos también pueden proporcionarse en otros equipos para su uso en aplicaciones médicas, por ejemplo, en hospitales. Existe un interés significativo en el control de infecciones en hospitales, en particular infecciones bacterianas tales como SARM y *Clostridium difficile*. Como se ha analizado anteriormente, la colonización microbiana de las superficies es un problema particular. Sin embargo, se ha descubierto que los recubrimientos actuales son eficaces contra muchas especies de microbios, por lo que se entenderá que proporcionar los presentes recubrimientos antimicrobianos en la superficie del equipo hospitalario puede ser beneficioso. En consecuencia, los sustratos que pueden estar recubiertos de acuerdo con la presente invención incluyen equipos y dispositivos médicos que entran en contacto con el cuerpo o los fluidos corporales en el uso normal. Por ejemplo, los sustratos adecuados incluyen tubos, bolsas de fluido, catéteres, jeringuillas y equipos quirúrgicos tales como escalpelos y fórceps, etc. Adicionalmente, otros equipos, por ejemplo, equipos utilizados en hospitales (por ejemplo, equipos de atención médica) pueden recubrirse de acuerdo con la presente invención, por ejemplo batas (por ejemplo, batas quirúrgicas), máscaras quirúrgicas, guantes protectores (por ejemplo, guantes quirúrgicos y de examen), cortinas, uniformes y ropa de cama tales como fundas de almohadas, fundas de colchones impermeables (por ejemplo, en cunas y camas de cuidados intensivos) y sábanas.

El equipo de atención médica alternativo incluye cortinas quirúrgicas, calcetines quirúrgicos, muebles tales como mesas incluyendo mesitas de noche, camas y superficies para sentarse, y otros equipos incluyendo recipientes de almacenamiento, filtros y bandejas de servicio.

Adicionalmente, los recubrimientos son útiles en el recubrimiento de equipos que es deseable mantener libres de microbios, por ejemplo, equipos que se usan en el procesamiento de alimentos, por ejemplo, equipos y superficies de cocina y equipos de fábrica utilizados en la fabricación o procesamiento de alimentos. Por ejemplo, los sustratos que pueden recubrirse de acuerdo con la presente invención incluyen recipientes (tales como recipientes de almacenamiento de alimentos), cintas transportadoras, cuchillas, mezcladoras, rodillos y utensilios de cocina (tales como implementos para cortar y servir). Los sustratos adicionales incluyen superficies de preparación de alimentos, envases flexibles y rígidos y tiradores de puertas.

Adicionalmente, podría recubrirse la ropa protectora utilizada por los trabajadores, por ejemplo, monos de trabajo, guantes, máscaras y sombreros. Otra ropa que puede recubrirse incluye la ropa interior, los calcetines, la ropa deportiva, la ropa quirúrgica, la ropa sanitaria, los zapatos y las botas.

Otros sustratos adecuados para el recubrimiento incluyen filtros, por ejemplo, filtros médicos (incluyendo medios de filtración de respiradores y medios de filtración de fluidos) y otros filtros incluyendo medios de filtración de HVAC, medios de filtración de agua y medios de filtración de fluidos.

Otros sustratos adecuados incluyen divisas, tarjetas de débito/crédito, equipos de gestión de aguas y desechos industriales, equipos e infraestructura petroquímicos y de producción, distribución y almacenamiento de crudo. Los sustratos adecuados adicionales incluyen equipos protectores personales y aparatos militares tales como máscaras, respiradores, trajes y guantes de descontaminación.

### **Ejemplos experimentales**

60 Todos los experimentos se realizaron usando agua ultra alta pura (UHP) (agua desionizada destilada; 18,2  $\omega$ M/cm) y a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C), a menos que se indique otra cosa.

#### **1.1 Síntesis y preparación de materiales de cobre**

65 1.1.1 Solución madre de cloruro de cobre

Se disolvió  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en agua UHP para producir una solución madre concentrada a 40 mM (2542 ppm de Cu), que se usó en ensayos posteriores.

#### 1.1.2 Nanopartículas de CuO

5 Se obtuvieron nanopartículas comerciales de CuO en Sigma-Aldrich (544868) y se usaron tal como se recibieron, para la comparación con las composiciones antibacterianas de la presente invención. Se prepararon suspensiones madre dispersando los nanopulvos en agua UHP a 20 mM (1270 ppm de Cu).

#### 10 1.1.3 Nanopartículas de hidróxido de cobre estabilizado con silicato (NP de CuSi)

Se prepararon nanopartículas de CuSi con fines comparativos mezclando una solución de silicato de sodio 400 mM a aproximadamente pH 12, con una solución de cloruro de cobre (Cu 40 mM), en una relación de volumen de 1:1. La suspensión resultante, que contenía Cu 20 mM y Si 200 mM, se ajustó a  $12 \pm 0,2$  con NaOH 5 M y se mantuvo con agitación durante 24 horas. Después de este período, se formó una solución transparente de color azul claro.

#### 15 1.1.4 Complejos de Cu-EDTA

Se prepararon complejos de Cu-EDTA recientes mediante la disolución de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y dihidrato de etilendiaminotetraacetato de disodio (EDTA) en agua UHP. El pH se ajustó a  $7,5 \pm 0,2$  con NaOH 1 M. Se consiguieron diversas relaciones Cu:EDTA manteniendo la concentración de cobre a 20 mM (aproximadamente 1270 ppm), mientras se cambiaba la de EDTA - 20, 100 y 200 mM, consiguiendo de este modo relaciones Cu-EDTA de 1:1, 1:5 y 1:10, respectivamente. La solubilidad del cobre se confirmó mediante ICP-OES usando distribución de fases elemental (véase 2.4.1.).

#### 25 1.1.5 Nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con adipato y tartrato (NP de CuTartAd)

Se preparó una solución ácida que comprendía cloruro de cobre 40 mM, ácido adípico 20 mM y ácido tartárico 20 mM. El pH de esta solución, inicialmente ácida, se aumentó a través de la adición gota a gota de NaOH 5 M hasta un pH de  $8,2 \pm 0,2$ . La suspensión final contenía Cu aproximadamente 40 mM (2500 ppm).

Las nanopartículas sintetizadas según el Ejemplo 1.1.5 se caracterizaron por la distribución de la fase de cobre. Durante el proceso de síntesis, el cobre soluble se convirtió en oxo-hidróxido de cobre en forma de partículas a medida que aumentaba el pH. Por encima de pH 5, la fase de partículas estaba compuesta principalmente de nanopartículas (fracción mayor al 80 % del total de partículas).

### 35 1.2 Caracterización de nanopartículas

#### 40 1.2.1 Distribución del tamaño de partícula hidrodinámico

La distribución del tamaño de partícula hidrodinámico de las nanopartículas se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DDL) en un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). En un experimento típico, se transfirieron de 0,5 a 1 ml de suspensión de nanopartículas (como se preparó en 2.1.) a una cubeta pequeña desechable a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) y se realizaron 3 mediciones usando los siguientes ajustes:

Índice de refracción del material	0,192
Absorción	0,1
Índice de refracción del dispersante	1,330
Viscosidad	1,00331 mPa.s

#### 1.2.2 Potencial Zeta

50 El potencial Zeta se analizó en un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments), mediante micro-electroforesis doppler láser, usando una constante dieléctrica de 78,5 y una viscosidad de 0,89 cP. Las suspensiones de nanopartículas a aproximadamente 1270 ppm de Cu se transfirieron a células zeta desechables transparentes para realizar la medición.

#### 1.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

55 Una suspensión de NP de CuTartAd que contenía 2500 ppm de Cu se analizó mediante MET. Se prepararon rejillas de MET dispersando la suspensión de nanopartículas en metanol y moldeándola en rejillas de MET de película de carbono Holey (Agar Scientific). Las imágenes se obtuvieron en un MET CM200 (S) equipado con un detector Oxford Instruments X-Max 80 mM2 SD y software de análisis AZTEC.

#### 60 1.2.4 Análisis de difracción de rayos X (DRX)

Las NP de CuTartAd se secaron a 45 °C durante 24 horas y se molieron manualmente antes del análisis de difracción

de rayos X (DRX) convencional.

### 1.3 Trabajo bacteriano

#### 5 1.3.1 Medio MOPS de metales pesados (HMM), pH 7,2 ± 0,2.

10 HMM es un medio definido sin cobre desarrollado para someter a ensayo metales pesados y, en el presente documento, se complementó con glucosa y cas-aminoácidos (hidrolizado ácido de caseína) para proporcionar todos los nutrientes básicos necesarios para el crecimiento bacteriano. Se preparó HMM a partir de soluciones madre concentradas de cada reactivo y el pH se ajustó a 7,2 ± 0,2 (Tabla 1). El medio recién preparado se esterilizó en autoclave inmediatamente a 121 °C durante 15 minutos, se dejó enfriar y se almacenó a 4 ± 2 °C. El medio autoclavado se usó en un mes desde la preparación.

Tabla 1. Composición del medio HMM.

Reactivo	Concentración en medio HMM
Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS)	40 mM
KCl	50 mM
NH <sub>4</sub> Cl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,5 mM
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 µM
Glicerol-2-Fosfato	1 mM
Glucosa	0,4 % (p/v)
Hidrolizado ácido de caseína	0,1 % (p/v)

15

#### 1.3.2 Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano

Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la determinación de la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de compuestos de cobre. Se usó un ensayo turbidimétrico para seguir la concentración bacteriana a lo largo del tiempo, ya que esto es proporcional a la densidad óptica (DO a 595 nm) en medio líquido, lo que permite una detección fácil del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo. *Escherichia coli* NCTC11100 y *Staphylococcus aureus* RN4220 fueron los microorganismos sometidos a ensayo en este ensayo. Las colonias bacterianas almacenadas se mantuvieron en cultivo en placas de agar y el día antes del experimento, una colonia se transfirió a 10 ml de medio líquido HMM y se cultivó durante la noche a 30 °C con agitación constante (80 rpm) en una incubadora. El día del ensayo, se midió la DO de la suspensión bacteriana a 595 nm en un lector de placas (Multiskan RC 351, Lab-systems) y se diluyó en HMM para conseguir una DO de entre 0,05 y 0,10 (UFC), garantizando que la concentración de bacterias se mantuvo constante durante los ensayos. Se diluyeron secuencialmente soluciones madre de cobre (véase la sección 2.1) en HMM para conseguir concentraciones típicas entre 0,8 y 100 ppm de Cu en un volumen de 0,1 ml. A continuación, se añadió 0,1 ml de cultivo bacteriano y la mezcla se incubó con cobre a 30 °C con agitación constante (80 rpm). Las concentraciones finales de cobre en el ensayo variaron entre 0,4 y 50 ppm y la DO se midió cada hora durante un período típico de 7-8 horas para seguir el crecimiento bacteriano. Se determinó la DO de fondo, es decir, la absorbancia de DO no provocada por bacterias, para retirar la interferencia de lectura del cobre y el caldo. La inhibición del crecimiento se calculó de la siguiente manera:

$$35 \quad \% \text{ de inhibición del crecimiento} = \left( \frac{\text{DO de control} - \text{DO de cobre}}{\text{DO de control}} \right) \times 100$$

DO de control: DO de bacterias incubadas en HMM en ausencia de cobre, después de la resta de la DO del medio (sin bacterias).

40 DO de cobre: DO de bacterias incubadas en HMM en presencia de cobre, después de restar la DO del medio más una concentración de cobre correspondiente (sin bacterias).

#### 1.3.3 Asociación cobre-bacteria

45 La asociación del cobre con los cultivos de *E. coli* NCTC11100 se estudió haciendo crecer inicialmente los cultivos bacterianos durante la noche en HMM a pH 7,2 ± 0,2 (como se describe en 2.3.2), para alcanzar la fase estacionaria, de manera que las concentraciones bacterianas permanecieron constantes durante todo el ensayo. Se determinó que esta concentración era de 9x10<sup>8</sup> UFC/ml por recuento en placa de agar. A continuación, se diluyó solución madre de cloruro de cobre en los cultivos bacterianos a 3 y 12,5 ppm de Cu y se incubaron a 30 °C. Se recogieron muestras a las 0, 2, 4 y 8 horas. En cada punto temporal, se usó una alícuota de cada muestra para determinar la concentración total de cobre y una segunda se centrifugó durante 5 minutos a 16000 g en un Biofuge Pico de laboratorio (Heraeus),

50

para sedimentar las bacterias y el cobre asociado. El cobre libre en el sobrenadante se analizó mediante espectroscopía de emisión óptica-plasma acoplado inductivamente (como en 2.4.1.). Por último, el cobre asociado a bacterias se determinó de la siguiente manera:

$$5 \quad [Cu] \text{ asociado a bacterias} = [Cu] \text{ Total} - [Cu] \text{ Sobrenadante}$$

## 1.4 Ensayos químicos

### 1.4.1 Análisis de cobre elemental

10 Se usó espectroscopía de emisión óptica-plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) para determinar la concentración elemental de cobre. Todas las muestras se diluyeron en HNO<sub>3</sub> al 5 % (v/v) al menos 24 horas antes del análisis para disolver los materiales de cobre. Los patrones de calibración se emparejaron con la matriz en HNO<sub>3</sub> al 5 %, que varía de 0,1 a 100 ppm. La línea utilizada para la detección de cobre fue de 324,754 nm.

### 15 1.4.2 Determinación de la distribución en fase de cobre: fracciones solubles, en forma de nanopartículas y micropartículas

20 La distribución de fases se determinó separando el cobre soluble (<1,4 nm), en forma de nanopartículas (<100 nm) y submicrométrico/en forma de micropartículas (>100 nm). Se recogieron tres muestras, 1) Total, analizadas cuidadosamente para determinar la concentración de cobre; 2) sobrenadante, centrifugado durante 5 minutos a 16000 g, seguido de análisis de sobrenadante; y 3) soluble, filtrado a través de un filtro de 3 KDa. Después, se calculó la distribución de fases como:

$$25 \quad \% \text{ de micropartículas de cobre} = \frac{Cu_{Total} - Cu_{Sobrenadante}}{Cu_{Total}} \times 100$$

$$\text{Cobre Soluble}\% = \frac{Cu_{Soluble}}{Cu_{Total}} \times 100$$

$$\% \text{ de nanopartículas de cobre} = Cu_{Soluble}(\%) - Cu_{Micropartículas}(\%)$$

### 30 Disolución de nanopartículas a base de cobre

La disolución de nanopartículas de cobre se estudió en medio de crecimiento bacteriano (HMM). Se diluyeron materiales de cobre a partir de soluciones madre (véase la sección 2.1) a 12,5, 25 y 50 ppm de cobre y se recogieron alícuotas a las 0, 2, 4 y 8 horas. La fracción de cobre soluble se determinó mediante análisis de distribución de fases como se describe en la sección 2.4.2.

### 1.4.4 Dispersibilidad de cobre

40 Se diluyeron materiales madre de cobre en tampón de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 50 mM a pH 7,4 ± 0,2. Las concentraciones finales de cobre variaron entre 10 y 500 ppm. El cobre en forma de micropartículas se retiró por centrifugación a 16000 g durante 5 minutos. El cobre total y el sobrenadante (es decir, la fracción dispersa) se analizaron mediante espectroscopía de emisión óptica-plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) como se describe en la sección 2.4.1.

### 45 1.4.5 Liberación de cobre desde una matriz de gel - Ensayo de liberación de gel

50 Se incorporaron nanopartículas de CuCl<sub>2</sub> y CuTartAd, a pH entre 7 y 8, en una matriz de hidroxietilcelulosa (HEC) diluyendo las soluciones madre originales que contenían aproximadamente 2500 ppm, hasta 250 ppm en agua UHP y después disolviendo hidroxietilcelulosa (HEC) para conseguir una concentración del 2 % (p/v). La mezcla se mantuvo con agitación moderada en un agitador rotativo hasta que se formó un gel homogéneo. Se vertieron 10 g del gel en un tubo falcon de 50 ml y se dejaron reposar durante la noche. Se transfirieron cuidadosamente 10 ml de una solución de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM a pH 7 ± 0,2 en la superficie del gel. Las muestras se recogieron durante 24 horas y la concentración de cobre en la solución superior se determinó por ICP-OES (véase la sección 2.4.1.).

## 55 2. Nanopartículas a base de cobre como agente de administración de iones de cobre biocidas

60 Se desarrolló un ensayo turbidimétrico para someter a ensayo las actividades antimicrobianas de materiales en forma de nanopartículas en el que se siguió la concentración de *E. coli* a través de mediciones de densidad óptica en un medio líquido que permitió la caracterización *in situ* de la distribución de la fase de cobre. Las bacterias se incubaron en presencia de un amplio intervalo de concentraciones de cobre y se usó cloruro de cobre como material biocida de referencia para proporcionar cobre soluble, véase la Figura 1. La siguiente etapa de este trabajo requirió la selección de materiales en forma de nanopartículas apropiados. Inicialmente, se estudiaron nanopartículas comerciales de CuO

con tamaños indicados de aproximadamente 50 nm; sin embargo, cuando se dispersaron en agua, estas nanopartículas formaron grandes aglomerados micronizados (Figura 2A). Su inesperada falta de dispersibilidad se explicó por la repulsión superficial débil como lo demuestra un pico de potencial zeta de solo  $-7,1 \pm 0,5$  mV.

5 En consecuencia, se desarrollaron nanopartículas alternativas a base de cobre para actuar como agentes en forma de nanopartículas genuinos, es decir, coloides estables a concentraciones adecuadas para la administración en el ensayo. Se eligió el silicato como estabilizador dada su falta de actividad antimicrobiana, de manera que la toxicidad de las partículas sería impulsada solo por el cobre. Las nanopartículas de hidróxido de cobre estabilizadas con silicato de referencia resultantes (NP de CuSi) se sintetizaron de este modo a través de coprecipitación, en la que se mezcló  
10 una solución de cloruro de cobre con una solución alcalina de silicato de sodio a aproximadamente pH 12. Inicialmente, se precipitaron iones de  $\text{Cu}^{2+}$  como  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , formando aglomerados de tamaño micrométrico, pero estos se dispersaron con el tiempo para formar nanopartículas pequeñas con un pico de diámetro hidrodinámico de  $8,5 \pm 0,3$  nm (Figura 2D). Se anticipaba que este proceso de dispersión sería impulsado por la adsorción de iones de silicato cargados negativamente en aglomerados de hidróxido de cobre. Adicionalmente, altas relaciones de silicato a cobre (10:1) garantizaron una repulsión de carga negativa eficiente, como lo confirmó la medición del potencial Zeta, que mostró que las nanopartículas estaban suficientemente cargadas negativamente ( $-31 \pm 9$  mV) para resistir la aglomeración (Figura 2B).

A continuación, las actividades antimicrobianas de estos dos tipos distintos de nanopartículas, CuO y CuSi, se compararon con un control de cobre soluble ( $\text{CuCl}_2$ ) en un intervalo de concentraciones de cobre (0,8-50 ppm de Cu) contra *E. coli*. Se descubrió que las nanopartículas son menos eficaces que el cobre soluble, lo que se ilustra particularmente bien a un nivel de exposición de 50 ppm de Cu (Figura 3). En este caso, la inhibición del crecimiento tras la exposición a CuSiNP fue más pronunciada en los últimos puntos temporales, lo que implica un efecto gradual y retardado de las NP de CuSi sobre las bacterias. Sorprendentemente, a pesar de la aglomeración observada, las nanopartículas de CuO mostraron una inhibición del crecimiento equivalente a las NP de CuSi a las 6 horas. Sin embargo, el aumento de la inhibición a lo largo del tiempo no fue tan pronunciado como para las NP de CuSi. Una cinética biocida similar de las nanopartículas, es decir, ambas mostraron una inhibición gradual y retardada del crecimiento, puede implicar un modo de acción en forma de nanopartículas común distinto al del cobre soluble, por ejemplo, la adhesión a la membrana bacteriana. Sin embargo, un mecanismo de este tipo parece poco probable debido a las disparidades en la fisicoquímica entre las nanopartículas (por ejemplo, tamaño, carga y composición). Por ejemplo, se esperaría que las nanopartículas con diferente carga superficial muestren diferentes afinidades por la membrana bacteriana y, en consecuencia, diferentes actividades antimicrobianas, que no se observaron en este caso. Más plausiblemente, un mecanismo mediado por la disolución basado en la liberación de iones de cobre de las nanopartículas explicaría la toxicidad retardada en relación con el cloruro de cobre y está respaldado por los respectivos perfiles de disolución de ambos materiales. La liberación de iones de cobre de acuerdo con la inhibición del crecimiento, en la que la disolución más rápida de las NP de CuO dio como resultado una mayor eficacia antimicrobiana en los puntos temporales más tempranos (2-4 horas). Después de 4 horas, el porcentaje de cobre soluble liberado de cualquiera de las nanopartículas fue equivalente (aproximadamente el 40 % del cobre total), lo que se tradujo en una inhibición similar del crecimiento bacteriano (aproximadamente el 80 %). La similitud en los perfiles de disolución de los dos tipos de nanopartículas fue sorprendente, puesto que se esperaba que las NP de CuSi más pequeñas se disolvieran más rápido, debido a su mayor relación de área superficial a volumen, pero la presencia de silicatos insolubles en la estructura de las nanopartículas puede haber retardado la disolución. De forma crítica, la asociación entre la disolución y la inhibición del crecimiento bacteriano implicó que la actividad biocida fue impulsada por el cobre soluble para ambos tipos de nanopartículas.

45 Para aclarar adicionalmente la teoría de la "disolución", se comparó la inhibición del crecimiento de *E. coli* para la fracción de cobre soluble ( $<1,1$  nm) así como en forma de nanopartículas (1-100 nm) en el medio de cultivo bacteriano. Se observó una respuesta a la dosis para los materiales de CuO, en los que los niveles crecientes de cobre (12,5, 25 y 50 ppm) condujeron a un aumento en la inhibición del crecimiento (Figura 4). Sin embargo, la aglomeración dio como resultado concentraciones muy bajas de cobre en forma de nanopartículas ( $<3$  ppm) y, por tanto, el aumento de la inhibición del crecimiento no pudo atribuirse a esta fracción, sino al aumento del cobre soluble. Las NP de CuSi se comportaron de manera distinta a las NP de CuO comerciales: en este caso, mayores cantidades de material dieron como resultado mayores concentraciones de cobre en forma de nanopartículas (3, 10 y 38 ppm) pero niveles relativamente sin cambios de cobre soluble (10-15 ppm). Sin embargo, dicho aumento en el cobre en forma de nanopartículas no dio como resultado una acción biocida adicional y, en cambio, la inhibición del crecimiento fue de acuerdo con niveles relativamente estáticos de cobre soluble.

La dependencia de la actividad biocida del cobre soluble sugiere que las sales de cobre conseguirían una eficacia antibacteriana óptima, que administran fácilmente iones de cobre solubles en el medio utilizado para el ensayo de inhibición del crecimiento (Figura 4). Sin embargo, el uso de cobre como agente antimicrobiano en aplicaciones clínicas, tales como la cicatrización de heridas (incluyendo el tratamiento de cortes y abrasiones), requiere formulaciones a concentraciones muy superiores a las sometidas a ensayo en el ensayo antimicrobiano ( $<50$  ppm) para permitir la administración de cantidades de cobre que son eficaces para destruir bacterias. Además, estas formulaciones deben administrarse a pH fisiológicos (pH 6-8) para evitar efectos perjudiciales adicionales de pH extremos en una piel que ya es vulnerable por la herida. Por tanto, la idoneidad de las sales de cobre en las formulaciones para la curación de heridas se investigó cuantificando su dispersibilidad, es decir, no precipitadas, en

un tampón MOPS a pH  $7,4 \pm 0,2$ , como indicación de la biodisponibilidad. La mayor parte del cobre precipitó como grandes aglomerados centrifugables, reduciendo la fracción dispersable a un máximo de aproximadamente 10 ppm de Cu, a pesar de la adición de cobre a concentraciones tan altas como de 500 ppm. Por tanto, las sales de cobre tienen un uso limitado en las formulaciones, ya que no son estables a la precipitación, lo que limita el cobre biodisponible.

La precipitación indeseable de sales de cobre a pH fisiológico se produjo a través de la formación de grandes aglomerados de hidróxido de cobre (centrifugables) que puede evitarse mediante el uso de agentes formadores de complejos (por ejemplo, EDTA). Por ejemplo, en el ensayo de inhibición del crecimiento, el cobre se mantuvo soluble en el medio bacteriano mediante agentes formadores de complejos presentes en el medio, posiblemente aminoácidos. La viabilidad de esta estrategia se empleó en diversas relaciones Cu:EDTA y las soluciones resultantes se sometieron a ensayo en el ensayo bacteriano (Figura 6A). A pesar de mantener el cobre en solución, los complejos de Cu-EDTA mostraron una inhibición modesta del crecimiento (<40 %; Figura 6B). Curiosamente, el EDTA solo tuvo un efecto antibacteriano, lo que podría ser responsable de la mayor parte del efecto de los complejos. Estas observaciones mostraron que, aunque la liberación de iones de cobre es esencial con fines antibacterianos, la forma de cobre soluble también es importante y, cuando está en presencia de agentes formadores de complejos fuertes, tales como EDTA, la disponibilidad de iones de cobre libre se reduce puesto que dichos quelatos fuertes 'compiten' con las bacterias por el cobre, dando como resultado una toxicidad reducida.

A pesar de la inhibición retardada del crecimiento observada para las nanopartículas a base de cobre en comparación con las sales de cobre (Figura 3), las nanopartículas mostraron una mayor actividad antimicrobiana que los complejos de cobre, lo que implica una mayor capacidad para administrar iones de cobre libre. Por tanto, su idoneidad para las formulaciones clínicas también se sometió a ensayo en las mismas condiciones que las descritas para el cloruro de cobre.

En resumen, este trabajo inicial demostró que las nanopartículas a base de cobre tenían poco o ningún efecto directo sobre las bacterias y su actividad biocida se desencadenaba a través de la liberación de iones de cobre, la principal forma biocida de cobre. A diferencia de las sales de cobre y los complejos de cobre, que no son apropiados para la liberación de iones de cobre libre, las nanopartículas tienen un gran potencial como sistemas de administración para dichas especies y pueden permanecer dispersas a concentraciones adecuadas para la formulación en aplicaciones clínicas. Sin embargo, las nanopartículas de CuO y CuSi sometidas a ensayo en este trabajo no son óptimas ya que se descubrió que la tasa de cobre liberado fue baja.

### **3. Nanopartículas a base de cobre nuevas y eficaces para la administración de iones de cobre**

#### *3.1 Introducción*

Como la eficacia antimicrobiana máxima de las nanopartículas a base de cobre puede conseguirse a través de la liberación rápida de iones de cobre, los inventores intentaron producir dichos materiales lábiles modificando su estructura mineral a través de metodologías de síntesis que promueven la formación de fases minerales inestables.

#### *3.2 Nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando*

Se prepararon minerales de oxo-hidróxido de cobre a través de precipitación de una solución de cloruro de cobre impulsada por el pH mediante la adición gota a gota de hidróxido de sodio, que forzó la conversión de iones de cobre en oxo-hidróxidos de cobre. Esto se realizó en presencia de ligandos de carboxilato, en concreto, ácido tartárico y ácido adípico, que controlaron el crecimiento mineral a nanoescala como resultado de la incorporación de ligandos y el recubrimiento de la superficie del frente de crecimiento mineral, para producir nanopartículas pequeñas y estables, con estructuras centrales de 2 a 5 nm (Figura 7). El ácido tartárico desempeñó un papel clave en la estabilización de las nanopartículas en solución a través de repulsión electrostática, presumiblemente a través de sus grupos carboxilato negativos, desprotonados por encima de pH 4,4, su segundo pKa. El potencial Zeta mostró que las nanopartículas estaban suficientemente cargadas negativamente (pico a -39 mV) para evitar la agregación de partículas debido a la fuerte repulsión de partículas ( $|\text{Potencial Zeta}| > 30 \text{ mV}$ ) y, por tanto, la formación de una suspensión muy estable. El análisis por DRX indicó una fase mineral amorfa, que probablemente se deba a la incorporación de ácido tartárico en la estructura mineral. Por el contrario, los presentes inventores creen que el ácido adípico, un ligando débil con baja afinidad por el cobre, se usó principalmente por su capacidad tamponante para controlar el pH durante la síntesis. Las NP de CuTartAd también mostraron una fase mineral amorfa, probablemente debido a la interrupción de la superficie de la red mineral por el ácido tartárico. El amorfismo puede afectar a la labilidad, puesto que los materiales con fase de minerales amorfos son más lábiles que los cristalinos.

Después de la síntesis de nanopartículas de CuTartAd, su perfil de disolución se determinó en medio de crecimiento bacteriano tras la dilución a 12,5, 25 y 50 ppm de Cu, concentraciones normalmente utilizadas en los ensayos antimicrobianos. Las nanopartículas se disolvieron inmediatamente después de la dilución en el medio (Figura 8) y permanecieron en solución durante al menos 8 horas, el período estudiado en este ensayo. Como se observó anteriormente para las NP de CuSi, las NP de CuTartAd fueron estables en dispersión a altas concentraciones de cobre (Figura 10B), pero a diferencia de las NP de CuSi, fueron extremadamente lábiles, demostrando una rápida

liberación de cobre en el medio de crecimiento bacteriano.

Una vez confirmada la labilidad, se produjeron ensayos de eficacia antimicrobiana de NP de CuTartAd. Se usaron dos modelos bacterianos convencionales para medir la actividad contra *E. coli* y *S. aureus*, una bacteria gramnegativa y una grampositiva, respectivamente. Se descubrió que las NP de CuTartAd son eficaces contra ambas cepas, inhibiendo el crecimiento de *S. aureus* en más del 80 %, pero inhibiendo por completo el crecimiento de *E. coli* en incubaciones de 50 ppm de Cu (Figura 9A). Esto representó una mejora con respecto a las NP de CuSi, que no pudieron inhibir por completo el crecimiento de *E. coli* a la misma concentración (Figura 3). Estos resultados reforzaron la importancia de los iones de cobre solubles para el efecto antimicrobiano; ambas nanopartículas, las NP de CuSi y las NP de CuTartAd, presentaron propiedades fisicoquímicas similares (por ejemplo, tamaño pequeño y carga negativa), pero diferentes tasas de disolución y las correspondientes diferencias en la actividad antibacteriana. Por otra parte, las NP de CuTartAd mostraron la misma eficacia que el cobre soluble, lo que demuestra su idoneidad para la administración de cobre biocida. Las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando de la presente invención tienen un efecto bactericida contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo modelos patógenos de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Tabla 3).

**Tabla 3.** Concentración bactericida mínima (CBM) obtenida de la incubación de CuCl<sub>2</sub> o CuTartAd con varios modelos bacterianos, incluyendo cepas de laboratorio convencionales (*E. coli* MC1061 y *B. subtilis* BR151), modelos patógenos (*S. aureus* RN4220 y *P. aeruginosa*) y patrones ISO para ensayos de toxicidad (*V. fischeri*). Cada especie bacteriana se incubó con Cu, nanopartículas tanto de CuCl<sub>2</sub> como de CuTartAd, en medio líquido de 4 a 96 horas. A continuación, los cultivos bacterianos se transfirieron a placas de agar y se determinaron los valores de CBM a través de inspección visual de las colonias formadas (n = 1).

CuCl <sub>2</sub>	CBM (ppm de Cu)				
Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. fischeri</i>
4	100	>100	100	100	100
24	50	>100	50	100	100
48	10	>100	50	100	>100
72	50	>100	50	100	>100
96	50	>100	50	100	>100
CuTartAd	CBM (ppm de Cu)				
Tiempo (h)	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. fischeri</i>
4	100	>100	100	100	100
24	100	>100	50	100	100
48	10	>100	50	100	>100
72	50	>100	50	100	>100
96	10	>100	50	100	>100

La eficacia antimicrobiana de amplio espectro a través de especies gramnegativas y grampositivas es ventajosa para numerosas aplicaciones clínicas, en particular, para combatir infecciones de heridas, debido a la diversidad y al número de patógenos a los que se expone la piel herida y a los efectos nocivos de la infección sobre la curación. Por tanto, habiendo demostrado la eficacia biocida de las NP CuTartAd, se sometió a ensayo su idoneidad para administración tópica. Las formulaciones típicas para la cicatrización de heridas comprenden apósitos o cremas en las que los principios activos se impregnan y después se liberan tras la exposición a la humedad. En este caso, como prueba de concepto, se incorporaron nanopartículas en una matriz de hidroxietilcelulosa (HEC). La HEC es un derivado de celulosa que se ha utilizado ampliamente en productos para el cuidado de la salud y cosméticos y a diferencia de los apósitos u otras matrices (por ejemplo, polietilenglicol), la HEC no requiere ningún procesamiento adicional (por ejemplo, calentamiento y secado) de las nanopartículas durante la preparación de la matriz, con alteraciones mínimas de sus propiedades fisicoquímicas. Por tanto, la incorporación de NP de CuTartAd se consiguió simplemente diluyendo coloides a la concentración deseada y disolviendo HEC en la suspensión, lo que dio como resultado la formación de un gel homogéneo que embebía las nanopartículas.

Es importante destacar que se liberó cobre de este gel: durante 24 horas, se descubrió que las matrices HEC impregnadas con NP de CuTartAd a 250 ppm liberaban  $64 \pm 8$  ppm, una concentración más que suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano. Por el contrario, los geles formulados con 250 ppm de cloruro de Cu no pudieron liberar más de 10 ppm de Cu durante el mismo período de tiempo. Esto confirmó lo inapropiado de las sales de cobre como agentes de entrega a pH fisiológicos. Como tales, se demostró que las nanopartículas de CuTartAd tenían propiedades adecuadas para combatir infecciones de heridas, ya que liberaron iones de cobre biocidas fácilmente, lo que dio como resultado una alta actividad antimicrobiana y eran apropiadas para administración tópica.

#### 4. Ejemplos de síntesis

##### 4.1 Nanopartículas de CuOH 40 Tart20 Ad20 preparadas a partir de CuSO<sub>4</sub>

Se sintetizaron nanopartículas según el Ejemplo 1.1.5, pero se usó CuSO<sub>4</sub> en lugar de CuCl<sub>2</sub>. Las nanopartículas sintetizadas a partir de CuSO<sub>4</sub> según este ejemplo se caracterizaron por la distribución de la fase de cobre. Durante el proceso de síntesis, el cobre soluble se convirtió en oxo-hidróxido de cobre en forma de partículas a medida que aumentaba el pH. A pH 7, la fase en forma de partículas estaba compuesta principalmente por nanopartículas (aproximadamente el 80 % del cobre total). El tamaño de partícula hidrodinámico se determinó mediante dispersión dinámica de luz durante el proceso de síntesis de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con adipato de tartrato sintetizadas según el Ejemplo 1.1.5. Además del aumento de la dispersabilidad, el aumento del pH dio como resultado un tamaño de partícula reducido. Por ejemplo, las nanopartículas recuperadas a pH 6,5 presentaron tamaños de partículas más grandes (73 ± 10 nm) que las partículas recuperadas a pH más altos (por ejemplo, 4,6 ± 0,5 nm a pH 8). Cuando se recuperaron a pH 8, estas tenían diámetros hidrodinámicos de entre 1,5 y 20 nm, con diámetros medios de entre 3 y 5 nm.

##### 4.2 Nanopartículas de CuOH 40 Tart20 Ad20 preparadas a partir de CuNO<sub>3</sub>

Se sintetizaron nanopartículas según el Ejemplo 1.1.5, pero se usó CuNO<sub>3</sub> en lugar de CuCl<sub>2</sub>. Las nanopartículas sintetizadas a partir de CuNO<sub>3</sub> según este ejemplo se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz. Cuando se recuperaron a pH 8, estas tenían diámetros hidrodinámicos de entre 2 y 10 nm, con diámetros medios de entre 3 y 5 nm.

##### 4.3 CuOH40 Ácido glucónico 60

Se sintetizaron nanopartículas según el Ejemplo 1.1.5., pero se usó ácido glucónico (60 mM) en lugar de ácidos tartárico y adípico. Las nanopartículas sintetizadas con ácido glucónico según este ejemplo se caracterizaron por la distribución de la fase de cobre. Durante el proceso de síntesis, el cobre soluble se convirtió en oxo-hidróxido de cobre en forma de partículas a medida que aumentaba el pH. A pH 6, la fase en forma de partículas estaba compuesta principalmente por nanopartículas (fracción mayor al 80 % del cobre total). Las nanopartículas sintetizadas con ácido glucónico según este ejemplo se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz. Cuando se recuperaron a pH 8, estas tenían diámetros hidrodinámicos de entre 1 y 10 nm, con diámetros medios de entre 2 y 4 nm.

##### 4.4 CuOH 20 Glutación 20

Se sintetizaron nanopartículas según el Ejemplo 1.1.5., pero se usó glutación (20 mM) en lugar de ácidos tartárico y adípico. La concentración inicial de CuCl<sub>2</sub> también se redujo a la mitad a 20 mM. Las nanopartículas sintetizadas con glutación según este ejemplo se caracterizaron por la distribución de la fase de cobre. Durante el proceso de síntesis, el cobre soluble se convirtió en oxo-hidróxido de cobre en forma de partículas a medida que aumentaba el pH. Entre pH 3 y 4, la fase de partículas estaba compuesta principalmente por grandes aglomerados (aproximadamente el 70 % del cobre total). A pH 6, estas partículas de tamaño micrométrico se dispersaron y el cobre en forma de partículas estaba compuesto principalmente por nanopartículas (fracción mayor al 80 % del cobre total). Las nanopartículas sintetizadas con glutación según el Ejemplo N4 se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz. Cuando se recuperaron a pH 8, estas tenían diámetros hidrodinámicos de entre 1 y 5 nm, con un diámetro medio de aproximadamente 2 nm.

##### 4.5 Nanopartículas de CuOH 40 Tart 20 Ad20 preparadas con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Se sintetizaron nanopartículas según el Ejemplo 1.1.5, pero se usó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en lugar de NaOH. Las nanopartículas sintetizadas usando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ácido como valorador según este ejemplo se caracterizaron por la distribución de la fase de cobre. Durante el proceso de síntesis, el cobre soluble se convirtió en oxo-hidróxido de cobre en forma de partículas a medida que aumentaba el pH. A pH 7, la fase en forma de partículas estaba compuesta principalmente por nanopartículas (fracción mayor al 90 % del cobre total). Las nanopartículas sintetizadas usando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ácido como valorador (según el Ejemplo N5) se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz. Cuando se recuperaron a pH 8, estas tenían diámetros hidrodinámicos de entre 1 y 8 nm, con diámetros medios de entre 2 y 4 nm.

##### 4.6 CuOH 40 no modificado (Ejemplo comparativo)

Se siguió la misma metodología de síntesis descrita en el Ejemplo 1.1.5., pero en ausencia de ácido tartárico y adípico. Durante el proceso de síntesis de hidróxidos de cobre no modificados, la mayor parte del cobre soluble se convirtió en partículas entre pH 4,3 y 5,2. Por encima de este pH, la fase en forma de partículas estaba compuesta por completo por partículas grandes de tamaño micrométrico (fracción superior al 95 % del cobre total). También se obtuvo el espectro DRX del material resultante (Figura 11). Este último mostró un patrón cristalino correspondiente a la paratacamita, un hidróxido de cobre de fórmula química Cu<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>Cl en el que se incorporó un átomo de cloro en la estructura mineral (parte inferior).

##### 4.7 Nanopartículas de CuOH 40 Tart 20

Se sintetizaron nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con tartrato según el Ejemplo 1.1.5., pero en ausencia de ácido adípico. Las nanopartículas sintetizadas en ausencia de ácido adípico según este ejemplo se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz. Cuando se recuperaron a pH 8, estas tenían diámetros hidrodinámicos de entre 2 y 10 nm, con diámetros medios de entre 3 y 5 nm.

#### 4.8 Nanopartículas de CuOH 2000 Tart 1000

Se sintetizaron nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con tartrato según el Ejemplo 4.7, pero a una concentración mayor (cobre 2,0 M y ácido tartárico 1,0 M). El material resultante fue una suspensión viscosa.

#### 4.9 Resuspensión de nanopartículas de CuOH 2000 Tart 1000

Una suspensión preparada como se describe en N9 se diluyó a ~50 mM en una solución de Cu 20 mM en ácido adípico y el pH se ajustó a 8 con NaOH. Las nanopartículas sintetizadas a partir de una suspensión concentrada según este ejemplo se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz. Cuando se recuperaron a pH 8, estas tenían diámetros hidrodinámicos de entre 2 y 10 nm, con diámetros medios de entre 3 y 5 nm.

#### 4.10 Retirada de ligandos no unidos

El ligando libre y las sales se retiraron a través de un proceso de precipitación etanólica, en el que se mezcló una suspensión de NP de CuTartAd (sintetizada como en el Ejemplo 1.1.5.) con etanol en una relación en volumen de suspensión de nanopartículas:etanol 1:2. A continuación, las nanopartículas aglomeradas se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante (que contenía ligandos libres y sales). El sedimento, que contenía las nanopartículas, se resuspendió al volumen original.

### 5. Ensayo de actividad

#### 5.1 Exposición de nanopartículas de CuOH 40 Tart20 Ad20 a fibroblastos dérmicos

Se incubaron células de fibroblastos dérmicos humanos (estirpe celular CCD-25SK) con NP de CuTartAd (0-200 ppm de Cu) en medio esencial mínimo (que contenía L-glutamina y sales de Earle) complementado con suero fetal bovino al 5 % inactivado por calor, penicilina-estreptomina al 1 %, Fungizone al 1 % y albúmina sérica bovina al 3,8 %, a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % humidificado durante 48 horas. También se sometieron a ensayo CuCl<sub>2</sub> y AgNO<sub>3</sub> en paralelo como controles positivos. El porcentaje de confluencia celular se determinó experimentalmente usando un Zoom InCuCyte y se trazó en el tiempo para determinar el área bajo la curva (AUC) para cada concentración sometida a ensayo. La proliferación celular se usó como una indicación de toxicidad celular y se determinó normalizando el AUC de las células expuestas a los compuestos de ensayo contra las de las células que crecen a tasas normales (control).

Las células de fibroblastos dérmicos se expusieron a CuCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> o nanopartículas de cobre modificado con ligando (sintetizadas según el Ejemplo 1.1.5) durante 48 horas. Como se muestra en la Figura 12, CuCl<sub>2</sub> y AgNO<sub>3</sub> provocaron una disminución en la proliferación celular a concentraciones más bajas (de 50 mg/l y 10 mg/l respectivamente) que con las nanopartículas de cobre (de 100 mg/l). Además de la toxicidad reducida, las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre promovieron el crecimiento celular (aumento de la proliferación celular) a bajas concentraciones (Cu 10 y 25 mg/l), lo que indica un efecto beneficioso sobre la cicatrización de heridas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición antibacteriana para su uso en el tratamiento de heridas, en donde la composición comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre tienen una estructura en la que los grupos oxo o hidroxilo están sustituidos no estequiométricamente por uno o más ligandos, en donde el uno o más ligandos comprenden un ligando de ácido carboxílico o una forma ionizada del mismo y el cobre está presente en la formulación farmacéutica como iones de cobre libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ).
2. Una composición antibacteriana para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección microbiana, en donde la composición comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre tienen una estructura en la que los grupos oxo o hidroxilo están sustituidos no estequiométricamente por uno o más ligandos, en donde el uno o más ligandos comprenden un ligando de ácido carboxílico o una forma ionizada del mismo y el cobre está presente en la formulación farmacéutica como iones de cobre libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ).
3. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición es para tratar un sujeto humano o animal.
4. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la infección microbiana es una infección bacteriana o una infección fúngica.
5. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la infección es provocada por una bacteria gramnegativa o una bacteria grampositiva.
6. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la infección bacteriana es provocada por una *Escherichia sp.*, tal como *E. coli*, un *Staphylococcus sp.*, tal como *S. epidermis*, *S. aureus* o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("SARM"), un *Bacillus sp.*, tal como *B. subtilis*, una *Pseudomonas sp.*, tal como *P. aeruginosa*, un *Vibrio sp.*, tal como *V. fischeri*, un *Streptococcus sp.*, tal como *S. pyrogenes* y *S. pneumoniae*, una *Klebsiella sp.*, un *Micrococcus sp.*, tal como *M. luteus*, un *Clostridium sp.* tal como *C. difficile*, un *Acinetobacter sp.* tal como *A. baumannii*, una *Mycobacterium sp.*, tal como *M. tuberculosis* o una *Salmonella sp.*, una *Chlamydia sp.* o una especie fúngica tal como una *Candida sp.*, tal como *C. albicans*.
7. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición es para administración veterinaria.
8. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tratamiento de prevención comprende recubrir o tratar un artículo con una composición antibacteriana.
9. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el artículo es un dispositivo médico implantable o un sustrato recubierto, tal como un sustrato de tejido no tejido.
10. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición se formula para la administración tópica.
11. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición es para el tratamiento de un trastorno de la piel o un trastorno de las membranas mucosas.
12. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material tiene una estructura polimérica en la que los ligandos se distribuyen dentro de la estructura de fase sólida del oxo-hidróxido de cobre.
13. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre modificado con ligando tienen una o más propiedades fisicoquímicas reproducibles, en donde la una o más propiedades fisicoquímicas reproducibles se seleccionan entre el perfil de

disolución, la liberación de cobre soluble como porcentaje del cobre total presente en la composición y/o la actividad antibacteriana como se determina en un ensayo de inhibición del crecimiento.

5 14. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ligando de ácido carboxílico es un ligando de ácido mono o dicarboxílico lineal o cíclico, opcionalmente en donde el ligando de ácido carboxílico o la forma ionizada del mismo es ácido tartárico o tartrato, ácido glucónico o gluconato, ácido adípico o adipato, ácido succínico o succinato, ácido málico o malinato, ácido glutárico o glutarato, ácido pimélico o pimelato y/o glutatión, o en donde el ligando de ácido carboxílico es un aminoácido o un ácido de azúcar.

10 15. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

15 (a) el ligando de ácido carboxílico o la forma ionizada del mismo son ácido tartárico o tartrato o ácido glucónico o gluconato o glutatión; o

(b) el ligando de ácido carboxílico o la forma ionizada del mismo son ácido tartárico o tartrato en combinación con ácido adípico o adipato.

20 16. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

(a) las nanopartículas en la composición tienen un enlace M-L demostrable como se determina usando espectroscopía infrarroja; y/o

25 (b) las nanopartículas en la composición son sustancialmente amorfas como se determina mediante DRX.

30 17. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las nanopartículas tienen un diámetro medio de entre 1 y 100 nm y, opcionalmente, en donde las nanopartículas tienen un diámetro medio de entre 1 y 10 nm.

35 18. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición se formula a un pH de entre 6,0 y 8,0.

40 19. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende adicionalmente una matriz en la que están formuladas las nanopartículas.

45 20. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la matriz comprende hidroxietilcelulosa o PEG.

50 21. La composición antibacteriana que comprende nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre para su uso en el tratamiento o la prevención de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es para administración tópica, administración vaginal, administración nasal, administración rectal o administración oral.

22. Un proceso para producir una composición farmacéutica de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, comprendiendo el proceso:

55 (a) mezclar la solución que comprende  $\text{Cu}^{2+}$  y un ligando de ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más ligandos adicionales o componentes de reacción, en un medio de reacción a un primer pH(A) en el que los componentes son solubles;

(b) cambiar el pH(A) a un segundo pH(B) para provocar que se forme un precipitado sólido o un coloide de la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre;

(c) separar y, opcionalmente, secar y/o formular la composición de nanopartículas de oxo-hidróxido de cobre producida en la etapa (b).

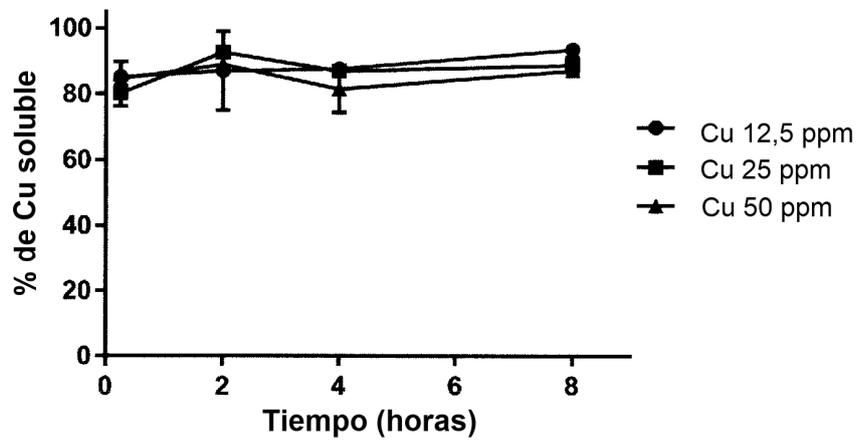
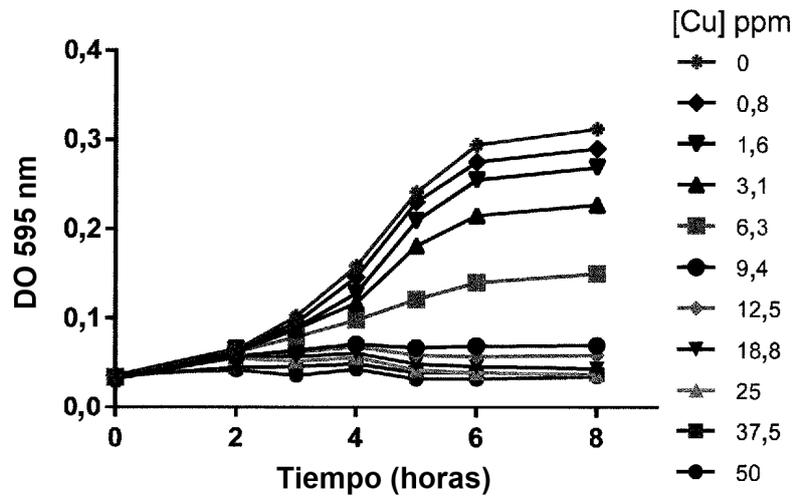


Figura 1

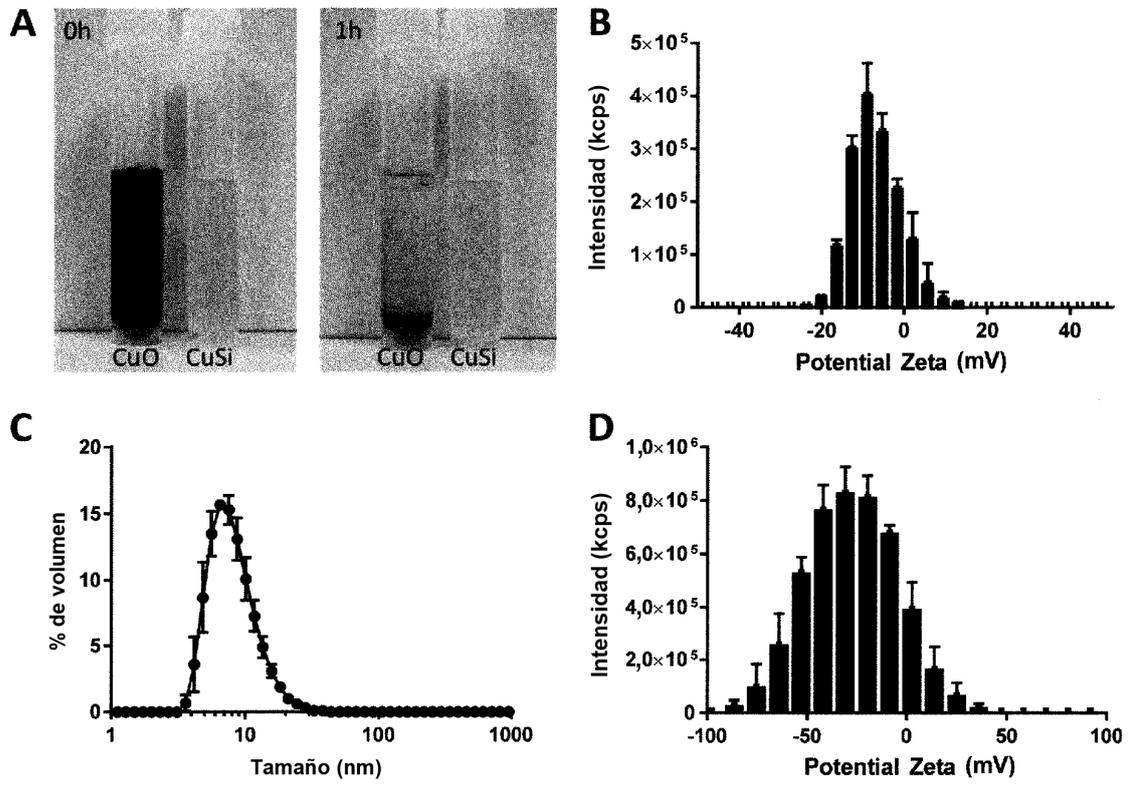


Figura 2

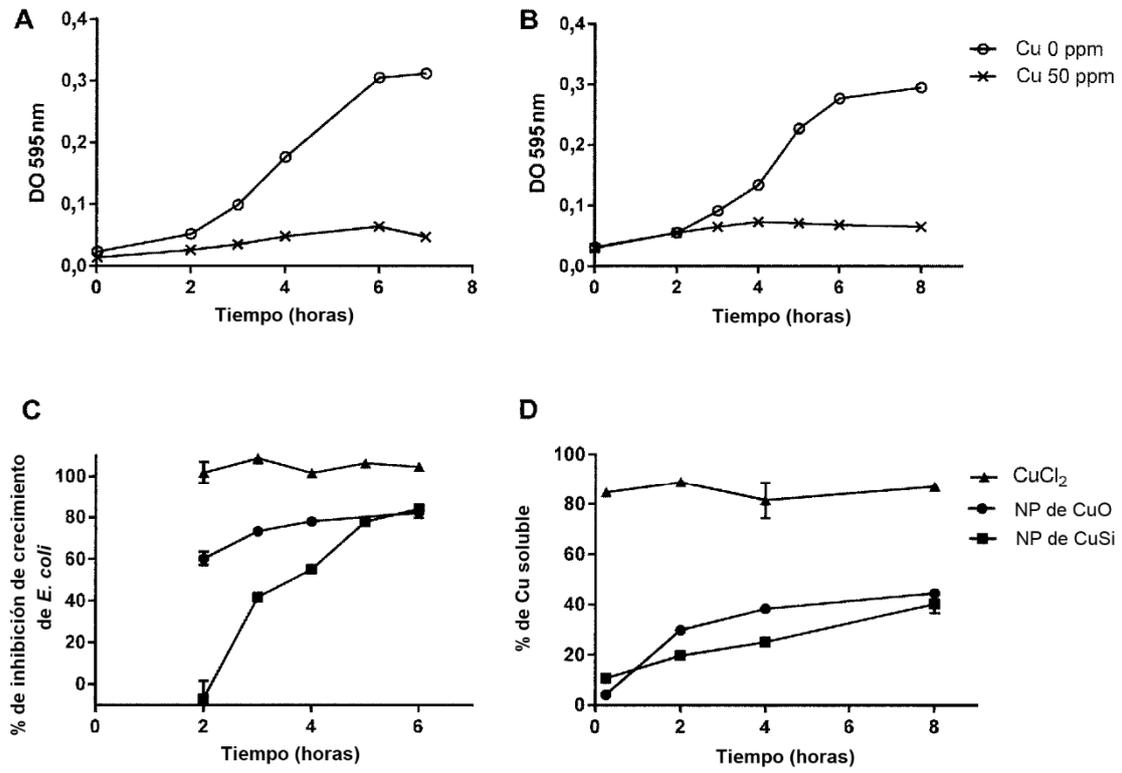


Figura 3

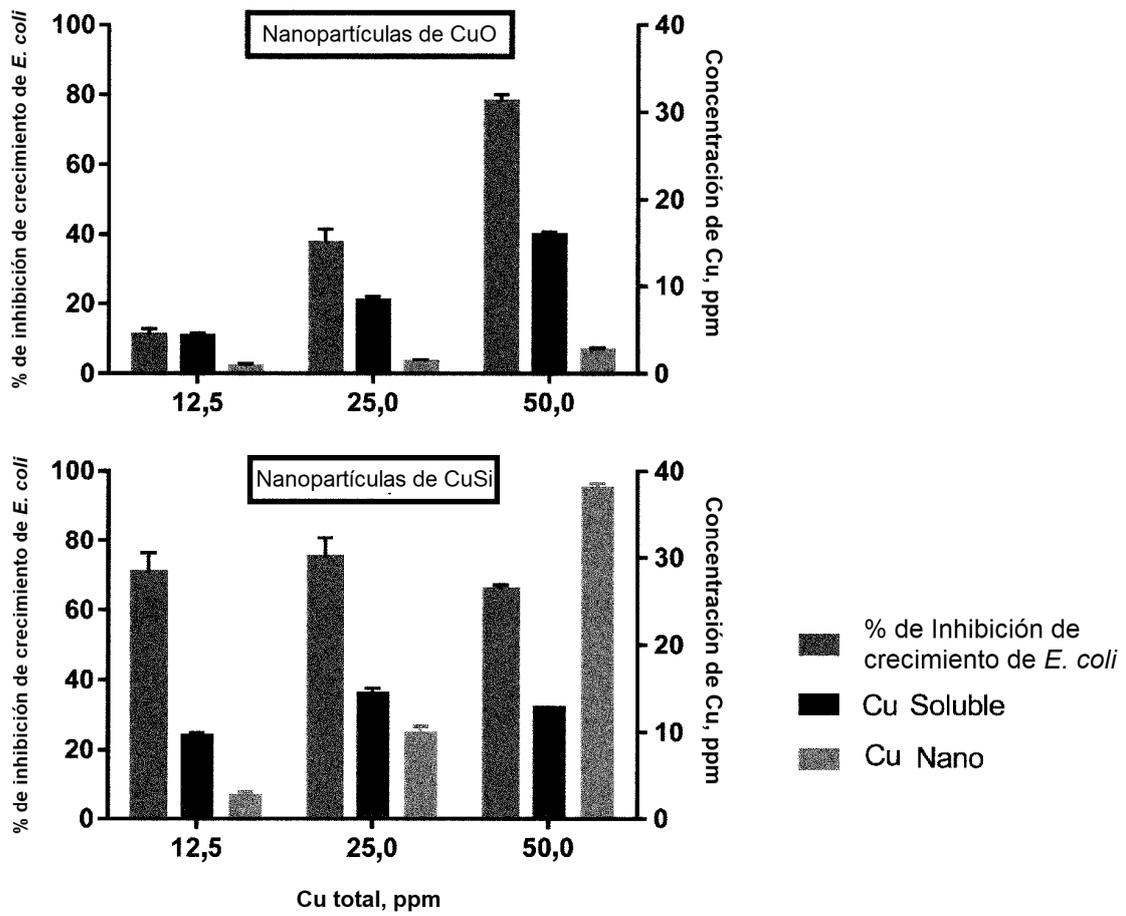


Figura 4

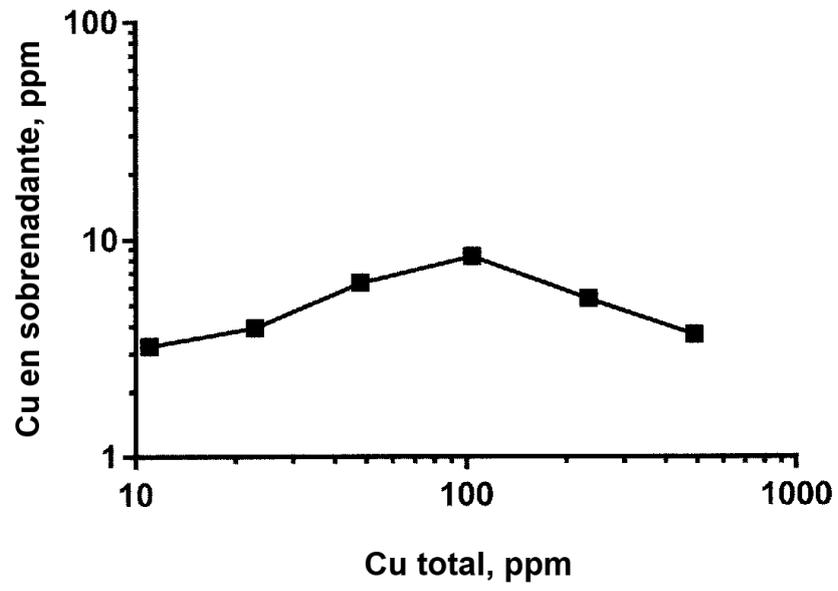


Figura 5

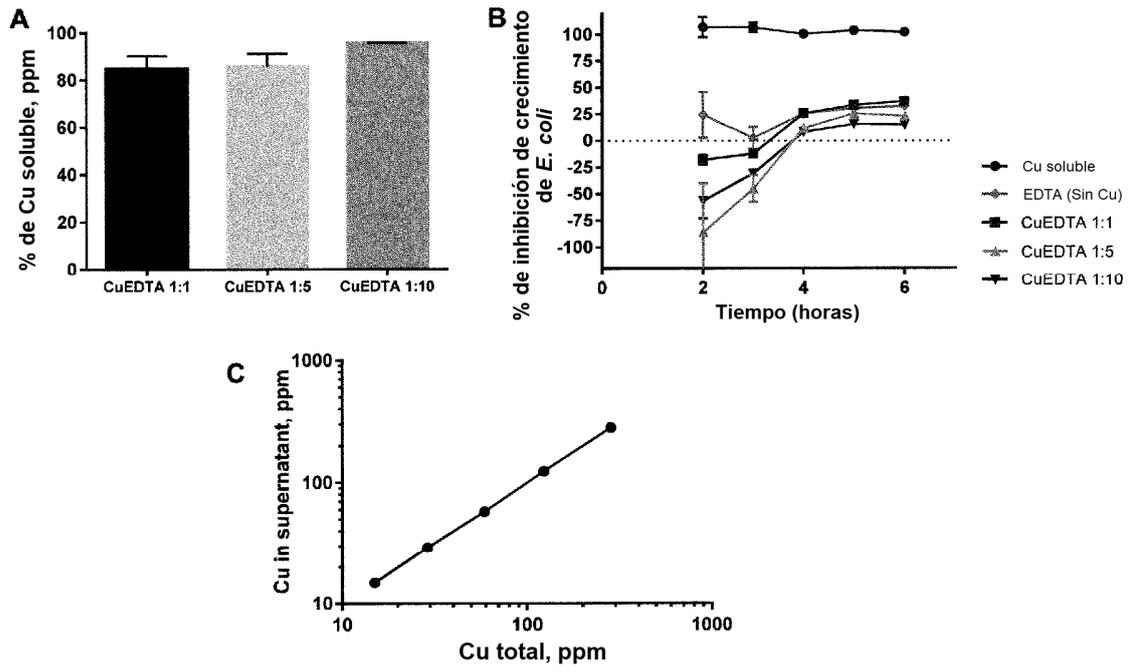


Figura 6

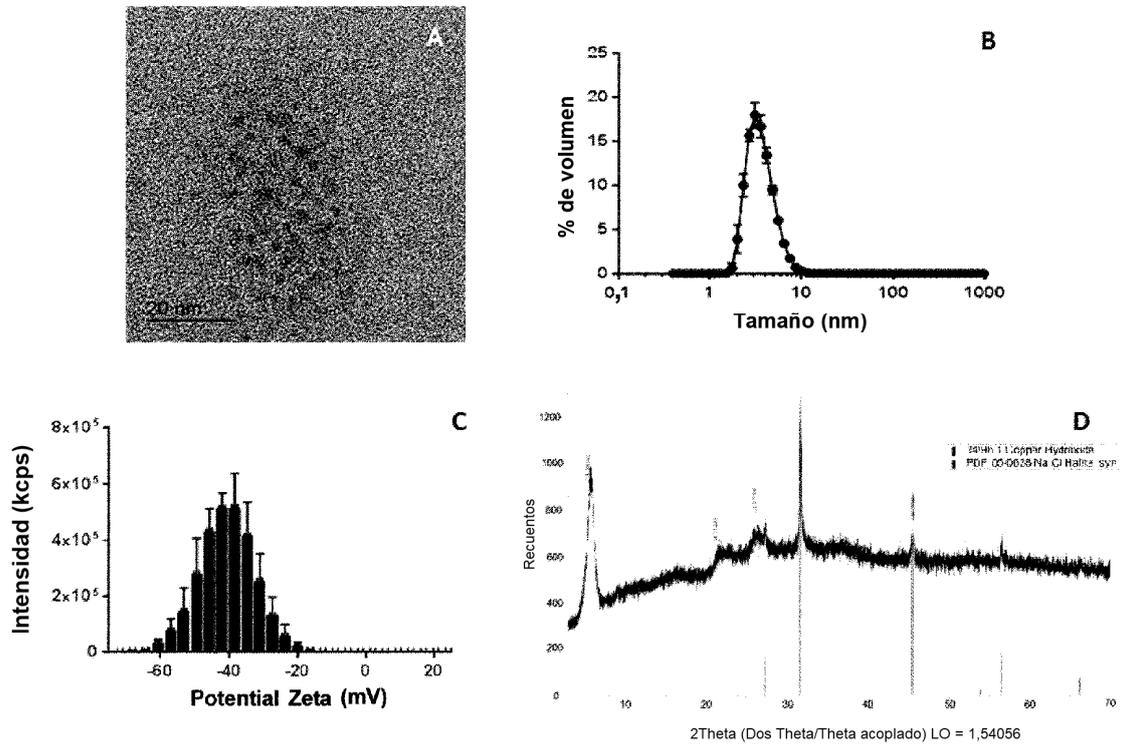


Figura 7

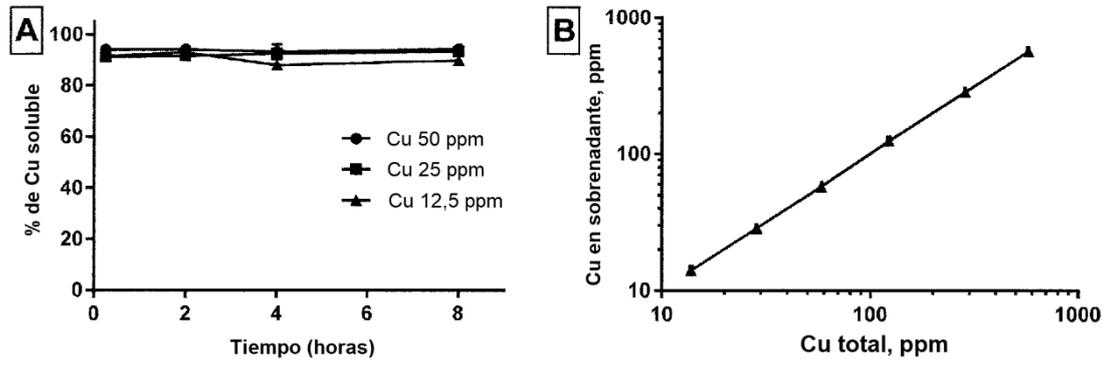


Figura 8

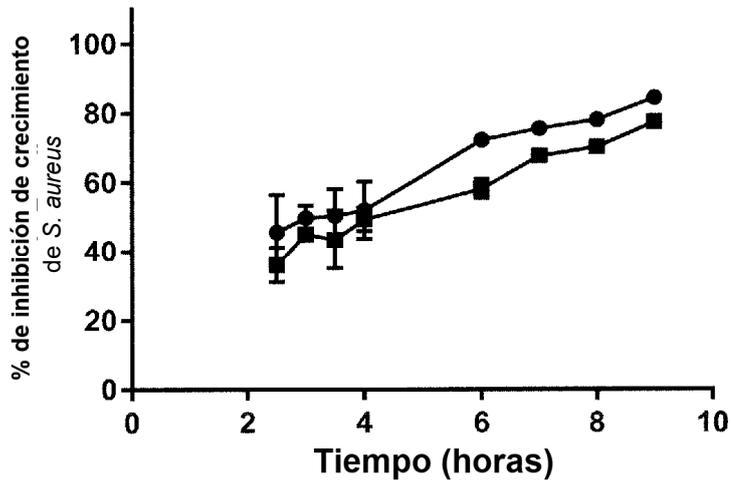
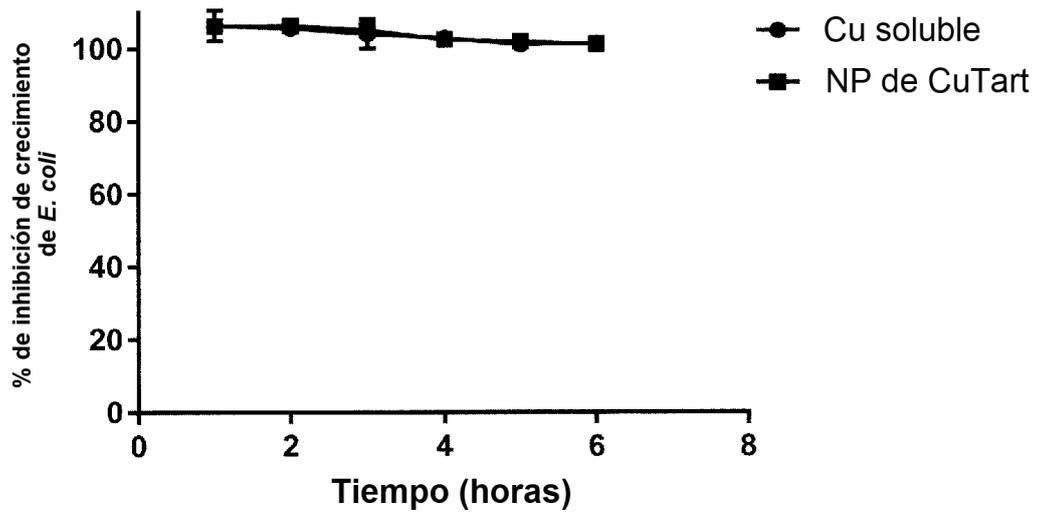


Figura 9

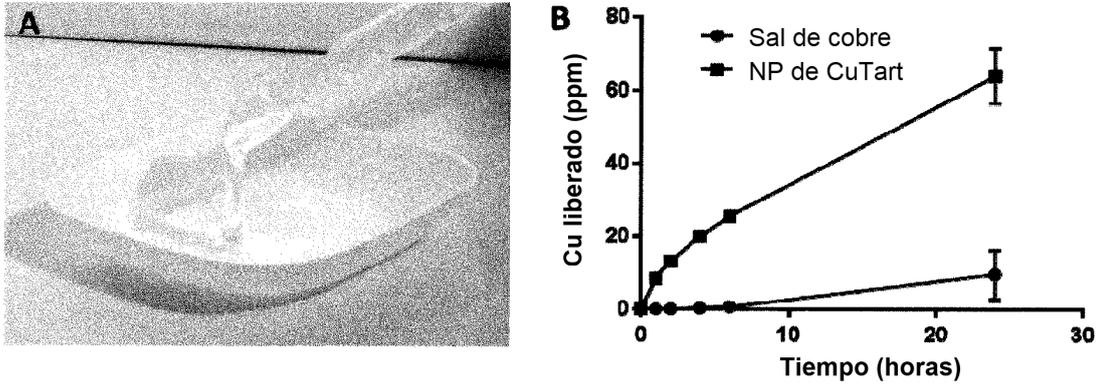


Figura 10

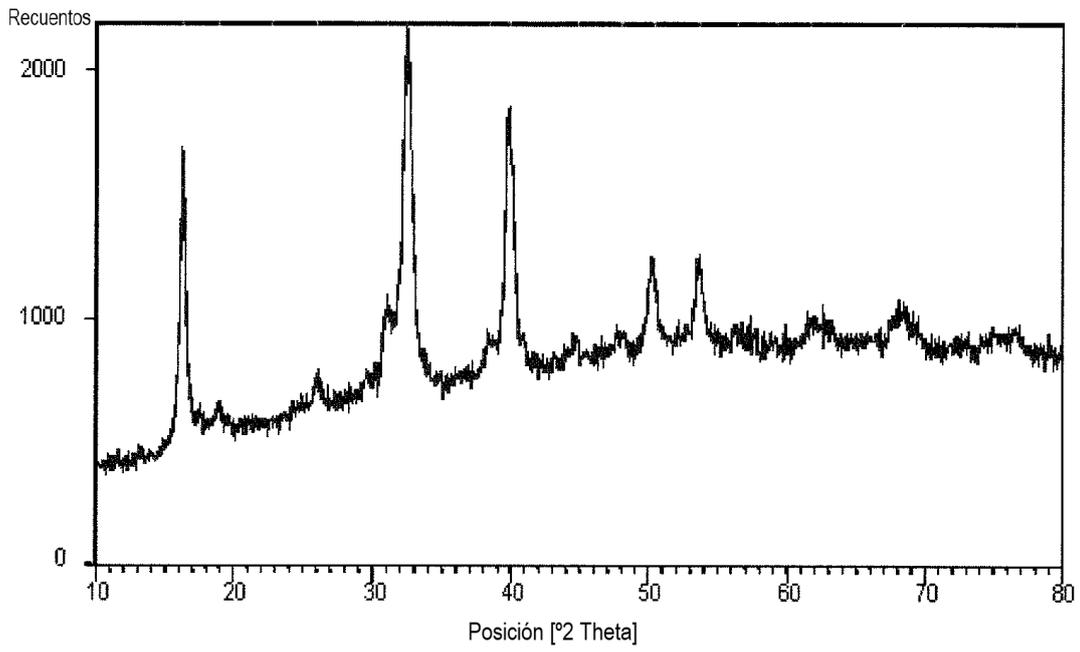


Figura 11

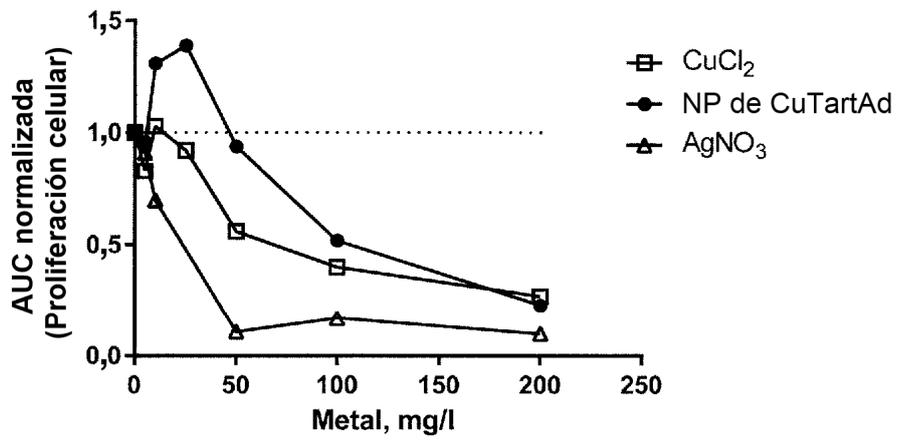


Figura 12