

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges  
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum  
22. Mai 2014 (22.05.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2014/075935 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 31/7042 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61K 47/40 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/072856

(22) Internationales Anmeldedatum:  
1. November 2013 (01.11.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
12192717.2 15. November 2012 (15.11.2012) EP

(71) Anmelder: SAPIOTEC GMBH [DE/DE]; Nikolausstraße  
18, 97082 Würzburg (DE).

(72) Erfinder: ROEWER, Norbert; Nikolausstraße 20, 97082  
Würzburg (DE). BROSCHKEIT, Jens; Kerzenleite 35,  
97209 Würzburg (DE).

(74) Anwalt: WESTPHAL, Thomas; GLAWE DELFS MOLL,  
Partnerschaft von Patent- und Rechtsanwälten,  
Rothenbaumchaussee 58, 20148 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,  
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,

GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,  
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,  
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,  
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,  
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,  
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu  
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz  
3)



WO 2014/075935 A1

(54) Title: DELPHINIDIN COMPLEX AS AN ANTIPHLOGISTIC OR IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVE INGREDIENT

(54) Bezeichnung : DELPHINIDINKOMPLEX ALS ANTIPHLOGISTISCHER ODER IMMUNOSUPPRESSIVER WIRKSTOFF

(57) Abstract: The invention relates to a composition comprising a complex of delphinidin and a sulfoalkyl ether  $\beta$ -cyclodextrin for use as an antiphlogistic and/or immunosuppressive.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Zusammensetzung umfassend einen Komplex aus Delphinidin und einem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin zur Verwendung als Antiphlogistikum und/oder Immunsuppressivum.

5

**DELPHINIDINKOMPLEX ALS ANTIPHLOGISTISCHER ODER  
IMMUNSUPPRESSIVER WIRKSTOFF**

- 10 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Zusammensetzungen umfassend
- einen Komplex aus Delphinidin und einem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin und/oder
  - Delphinidin oder dessen Salze
- 15 als Antiphlogistikum und/oder Immunsuppressivum.

Reaktionen des Immunsystems werden durch die Komponenten des angeborenen und erworbenen Immunsystems vermittelt. Das angeborene unspezifische Immunsystem umfasst alle Reaktionen

20 auf antigene und körperfremde Stimuli (Bakterien, Viren, Pilze, etc.), die von Makrophagen, Monocyten und Granulozyten ausgehen, sowie humorale Abwehrmechanismen einschließlich Interferon, Defensine und Akute-Phase-Proteine. Das erworbene oder adaptive Immunsystem umfasst alle spezifi-

25 schen Abwehrreaktionen, die von Lymphozyten, insbesondere von B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen), ausgehen. Unter bestimmten Bedingungen können die Reaktionen des Immunsystems selbst Ursache von Erkrankungen oder krankheitsrelevanten Zuständen sein. Solche Erkrankungen

30 oder Zustände sind z.B. akute und chronische Entzündungen, Sepsis, Autoimmunerkrankungen oder Abstoßungsreaktionen nach Organ-, Zell- oder Gewebetransplantation. Bei diesen und anderen Zuständen, in denen eine inadäquate oder unerwünschte Immunantwort auftritt, ist aus klinischer Sicht

35 eine Immunsuppression mittels Antiphlogistika bzw. Immunsuppressiva erforderlich.

Eine antiphlogistisch oder antiinflammatorisch wirkende Substanz ist eine Substanz, die in der Lage ist, partiell oder total, unmittelbar oder zeitversetzt eine Entzündung oder eine ihrer Manifestationen zu vermindern oder zu hemmen. Eine antiinflammatorisch wirkende Substanz kann entweder auf lösliche Mediatoren wie Zytokine gerichtet sein oder die Expression von bestimmten an einer Entzündungsreaktion beteiligten zellulären Oberflächenrezeptoren wie z.B. MHC-Klasse II Moleküle modulieren. Eine immunsuppressorisch wirkende Substanz ist eine Substanz, deren Wirkung auf das Immunsystem zu einer unmittelbaren oder verzögerten Reduzierung der Aktivität des immunologischen Systems führt. Eine immunsuppressorisch wirkende Substanz wird dann eingesetzt, wenn es zu einer überschießenden Immunantwort kommt z.B. gegen körpereigene Moleküle oder Gewebe oder gegen transplantiertes Gewebe, z.B. Autoimmunerkrankungen, Typ I Diabetes, Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis. Derzeit verwendete Antiphlogistika sind z.B. Azetylsalicylsäure, Diclophenac, Indometacin oder Glukokortikoide. Aus der Gruppe der Immunsuppressiva werden Zellteilungshemmer (Azathioprin) Calcineurin-Inhibitoren (Tacrolimus, Cyclosporin, Pimecrolimus) und Hydrocortison eingesetzt.

Im klinischen Alltag wird Hydrocortison zur Entzündungshemmung und Immunsuppression eingesetzt und beispielsweise in den Enddarm zur Linderung entzündlicher Symptome bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn oder bei anderen Entzündungen des unteren Darmabschnitts wie der Proktosigmoiditis örtlich angewendet. Ebenfalls bekannt ist die Verwendung von Hydrocortison in Cremes und Salben zur Auftragung auf die Haut bei entzündlichen oder allergischen Hauterkrankungen wie Ekzemen,

Neurodermitis, Schuppenflechte, Sonnenbrand, Hautinfektionen und Insektenstichen, um eine Linderung von Beschwerden wie Juckreiz oder Entzündungen zu bewirken.

5 Während die kurzzeitige Gabe auch hoher Hydrocortisongaben vom Körper in der Regel noch gut toleriert wird, treten bei längerer Behandlung und insbesondere bei innerlicher Gabe des Wirkstoffs unerwünschte Nebenwirkungen auf. Die innerliche Gabe des Wirkstoffes hat zwei wesentliche Nebenwirkungen. So fördert Hydrocortison zum einen die Wasserrückaufnahme aus dem Urin ins Blut. Dadurch vergrößert sich die Blutmenge, der Druck in den Blutgefäßen erhöht sich und damit der Blutdruck. Auf diese Weise kann es auch dauerhaft zu Bluthochdruck kommen. Zum anderen kann Hydrocortison 15 Herzhrythmusstörungen auslösen. Hydrocortison steigert die Kaliumausscheidung mit dem Urin. So kann ein Kalium-Mangel entstehen, der Herzhrythmusstörungen begünstigt. Deshalb werden solche Präparate in der klinischen Praxis üblicherweise nur ab dem sechsten Lebensjahr und maximal zwei Wochen lang angewendet. 20

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein wirksames Antiphlogistikum und/oder Immunsuppressivum als Alternative oder Ergänzung zu aus dem Stand der Technik bekannten Antiphlogistika oder Immunsuppressiva wie Hydrocortison zur Verfügung zu stellen. 25

Gelöst wird diese Aufgabe durch die in den unabhängigen Ansprüchen beanspruchten Zusammensetzungen und Verwendungen, wobei vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung in den 30 Unteransprüchen offenbart sind. Dass diese Aufgabe in der Tat gelöst wird, belegen die *in-vitro* und *in-vivo* Versuchsergebnisse zu der antiphlogistischen und antiinflammatori-

schen Wirkung von Delphinidin und Delphinidin-Sulfoethylether- $\beta$ -Cyclodextrin in den erfindungsgemäßen Beispielen 6-11.

5 Zunächst seien einige im Rahmen der Erfindung verwendete Begriffe erläutert.

Der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammensetzung werden zur Behandlung eines Objekts oder Individuums eingesetzt, das an einer Indikation leidet  
10 und/oder einer prophylaktischen Behandlung bedarf, die vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- entzündlichen Zuständen oder entzündlichen Erkrankungen,
- mit entzündlichen Gewebeveränderungen assoziierte Erkran-
- 15 kungen,
- Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation und
- Autoimmunerkrankungen.

„Entzündliche Zustände oder entzündliche Erkrankungen“ im  
20 Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen Indikation wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, chronische Polyarthrititis, juvenile idiopathische Arthritis, Spondylitis, Osteoarthritis, Sepsis, Septischer Schock, Zerebrale Malaria, eine chronisch entzündliche Lungenerkrankung, Silikose,  
25 Sarkoidose, Reperfusionssyndrom, neurodegenerative oder neuroinflammatorische Erkrankungen, wie Crohn'sche Erkrankung, Multiple Sklerose und Parkinson, Colitis ulzerosa, Fieber bei Infektionen und auch Depressionen, die ebenfalls durch entzündliche Gewebereaktionen verursacht werden [Pace  
30 *et al.* (2006), Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am. J. Psychiatry.* 163(9):1630-3].

Inflammatorische Reaktionen sind ebenfalls im Zuge einer myokardialen und/oder zerebralen Minderdurchblutung (Ischämie), insbesondere nach wiederhergestellter Durchblutung (Reperfusion), zu beobachten, bei der die nekrotische Schwellung der Zellen zum Aufbrechen der Zellmembran und damit einhergehender Freisetzung der Bestandteile des Zytoplasmas kommt, welche eine inflammatorische Reaktion verursachen. Dem erfindungsgemäßen Komplex oder der erfindungsgemäßen Zusammensetzung kommt damit erfindungsgemäß auch eine Verwendung zu, die als Gewebe- und/oder Organprotektion im Kontext von zerebraler und/oder myokardialer Ischämie angesehen werden kann und mit den klinischen Krankheitsbildern des Schlaganfalls und des Myokardinfarkts korrelieren. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Komplexes oder der erfindungsgemäßen Zusammensetzung von dem betroffenen Gewebe oder Organ zusätzlicher Schaden (Reperusionsparadox) abgewendet bzw. gemildert, wie in den Untersuchungen des Ausführungsbeispiels 10 belegt.

Von den Atherosklerose assoziierte Erkrankungen, unter die insbesondere Schlaganfall, koronare Herzkrankheit (KHK) und periphere arterielle Verschlusskrankheit subsumiert werden, sind Menschen in den Industrieländern im erheblichen Maße betroffen. Derzeit sterben jährlich mehr als 7 Millionen Menschen an den Folgen ischämischer Herzkrankheiten. KHK verursacht eine mangelhafte Durchblutung und damit einhergehende nicht ausreichende Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff (myokardiale Ischämie), mit der Folge, dass es zu Myokardinfarkt und Herztod kommen kann. Die KHK wird in 6 Verlaufsformen unterteilt: die stabile Angina pectoris, das akute Koronarsyndrom (instabile Angina pecto-

ris/Herzenge und akuter Myokardinfarkt/Herzinfarkt), der plötzliche Herztod, die chronische Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen sowie die stumme Myokardischämie. Mit fortschreitender myokardialer Ischämie folgt der Zelluntergang der Kardiozyten durch „zufälligen“ (Nekrose) und „programmierten“ (Apoptose) Zelltod, wobei die nekrotische Schwellung der Zellen zum Aufbrechen der Zellmembranen unter Freisetzung der für die inflammatorische Reaktion verantwortlichen Zytoplasmabestandteile führt.

10

Unter „mit entzündlichen Gewebeveränderungen assoziierte Erkrankungen“ fallen Indikationen wie aus der Gruppe bestehend aus Alzheimer, Parkinson und Krebs.

15 Der Begriff „Objekt“ umfasst lebende Tiere und Menschen.

Der Begriff „Zusammensetzung umfassend einen Komplex aus Delphinidin und einem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin und/oder Delphinidin oder dessen Salze“ schließt die Zusammensetzung als Monopräparat, d.h. ohne weitere therapeutisch aktive Komponenten ein. Alternativ kann die Zusammensetzung mindestens eine weitere therapeutisch aktive Substanz umfassen. Diese weitere therapeutisch wirksame Substanz ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe der Antiphlogistika, der Antikörper gegen inflammatorische Zytokine, der löslichen Rezeptoren inflammatorischer Zytokine oder der Immunosuppressiva und besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acetylsalicylsäure, Diclphenac, Indometacin, Ciclosporin, Azathioprin, Bortezomib, Melphalan, Prednison, Vincristin, Carmustin, Cyclophosphamid, Dexamethason, Thalidomid, Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Cytarabin.

30

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf Verfahren zur Behandlung eines Objekts, das an einem entzündlichen Zustand oder einer entzündlichen Erkrankung, an einer mit entzündlichen Gewebeveränderungen assoziierten Erkrankung, einer Abstoßungsreaktion nach einer Transplantation oder einer Autoimmunerkrankung leidet, wobei dem Objekt eine therapeutisch wirksame Menge der erfindungsgemäßen Zusammensetzung verabreicht wird. Wie bereits erwähnt, kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung allein oder in Kombination mit mindestens einem anderen therapeutischen Mittel verabreicht werden. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann gleichzeitig mit dem anderen therapeutischen Mittel, welches Bestandteil derselben Zusammensetzung sein kann oder in einer anderen Zusammensetzung bereitgestellt wird, verabreicht werden. Alternativ kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung vor oder nach der Verabreichung des anderen therapeutischen Mittels verabreicht werden. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann über den gleichen oder einen anderen Verabreichungsweg wie das andere therapeutische Mittel verabreicht werden.

Der Begriff „Behandlung“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung das ganze oder teilweise Erreichen der nachfolgend genannten Ergebnisse: Ganze oder teilweise Reduktion des Krankheitsbildes; Verbesserung mindestens eines der klinischen Symptome oder mit der Krankheit assoziierten Indikatoren; Verzögerung, Unterdrückung oder Schutz vor dem Fortschreiten der Krankheit; oder ganze oder teilweise Verzögerung, Unterdrückung oder Schutz vor dem Ausbrechen oder Entstehung der Krankheit. Das zu behandelnde Objekt ist ein Mensch oder Tier, vorzugsweise ein Säugetier. Die veterinärmedizinische Behandlung umfasst neben der Behandlung von Nutz- oder Wildtieren (z.B. Schafe, Katzen, Pferde, Kühe,

Schweine) auch Labortiere (z.B. Ratten, Mäuse, Meerschwein-  
ne, Affen).

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung wird vorzugsweise als  
5 pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt und verab-  
reicht. Der Begriff „pharmazeutische Zusammensetzung“ um-  
fasst ein oder mehrere Wirkstoffe und ein oder mehrere  
inerte Inhaltstoffe, die als Träger für den Wirkstoff bzw.  
die Wirkstoffe fungieren. Die pharmazeutischen Zusammenset-  
10 zungen erlauben es, den erfindungsgemäßen Komplex oder die  
erfindungsgemäße Zusammensetzung oral, rektal, parenteral,  
einschließlich intraperitoneal, perkutan, subkutan, intra-  
muskulär, intravenös, ophthalmisch, pulmonal oder nasal zu  
verabreichen. Eine parenterale Verabreichungsform kann bei-  
15 spielsweise eine Tablette, Kapsel, Lösung, Suspension oder  
Dispersion sein. Eine ophthalmische, pulmonale oder nasale  
Verabreichungsform kann beispielsweise ein Aerosol, Lösung,  
Creme, Paste, Lotion, Gel, Salbe, Suspension oder Dispersi-  
on sein. Entsprechende Techniken für die Formulierung und  
20 Verabreichung sind aus dem Stand der Technik bekannt, siehe  
beispielsweise „Remington's Pharmaceutical Sciences“ (Mack  
Publishing Co, Easton Pa.). Zum Beispiel können die erfin-  
dungsgemäßen Zusammensetzungen einem Subjekt intravenös  
mittels eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers (z.B. phy-  
25 siologische Salzlösung) verabreicht werden. Für die Injek-  
tion bietet sich eine Formulierung in wässriger Lösung,  
vorzugsweise in physiologisch akzeptablen Puffern an (z.B.  
Hanks-Lösung, Ringer-Lösung oder physiologisch gepufferte  
Salzlösung). Für die parenterale Verabreichung, einschließ-  
30 lich der intravenösen, subkutanen, intramuskulären und  
intraperitonealen Verabreichung, kommt ebenfalls eine wäss-  
rige oder ölige Lösung oder eine Feststoffformulierung in  
Betracht. Der Anteil des aktiven Wirkstoffs in der pharma-

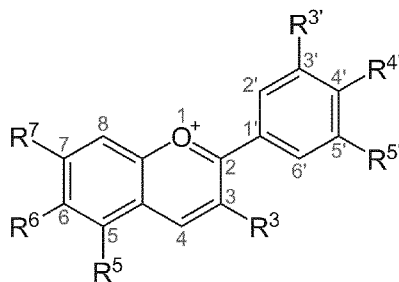
zeitischen Zusammensetzung kann variieren und liegt üblicherweise zwischen 2 und 60 Gew.-% der Verabreichungseinheit. Der Wirkstoffanteil ist entsprechend so ausgewählt, dass eine wirksame Dosis erreicht wird. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Delphinidin oder dessen Salze und/oder der Komplex aus Delphinidin und dem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin in einer galenischen Zubereitung zur kontrollierten und/oder zeitverzögerten Freisetzung des Delphinidins eingesetzt.

10

„Salz“ oder „pharmazeutisch akzeptables Salz“ steht für jegliches unter pharmazeutischen Gesichtspunkten akzeptables Salz einer Verbindung vorliegender Erfindung, welches den pharmazeutisch wirksamen Wirkstoff oder dessen aktives Metabolit nach der Verabreichung freigegeben kann. Salze der Zusammensetzungen und Komplexe der vorliegenden Erfindung können von anorganischen oder organischen Säuren und Basen abgeleitet sein.

20 Das Anthocyanidin Delphinidin kann in „Reinform“ oder „gereinigt“ verwendet werden, was bedeutet, dass ungewünschte Komponenten entfernt wurden.

„Anthocyanidine“ weisen die nachfolgend wiedergegebene Grundstruktur auf.



25

Die Substituenten in dieser Formel sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxygruppe und Methoxygruppe.

5 Cyclodextrine, die mit dem Anthocyanidin Delphinidin erfindungsgemäß komplexiert sein können, sind zyklische Oligosaccharide aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen.  $\beta$ -Cyclodextrin besitzt sieben Glukoseeinheiten. Bei einem Sulfoalkyether- $\beta$ -Cyclodextrin sind Hydroxygruppen der  
10 Glukoseeinheit in einem Sulfoalkylalkohol verethert. Erfindungsgemäß ist in der Regel lediglich ein Teil der 21 Hydroxygruppen eines  $\beta$ -Cyclodextrins verethert. Die Herstellung von Sulfoalkyethercyclodextrinen ist dem Fachmann geläufig und beispielsweise in US 5,134,127 oder WO  
15 2009/134347 A2 beschrieben.

Sulfoalkyethergruppen werden bei Cyclodextrinen im Stand der Technik zur Erhöhung der Hydrophilie beziehungsweise Wasserlöslichkeit eingesetzt. Sulfoalkylethergruppen tragen  
20 in besonderem Maße zur Erhöhung der Stabilität des Komplexes aus Anthocyanidinen und dementsprechend substituiertem  $\beta$ -Cyclodextrin bei, so dass damit die Lagerstabilität und Formulierbarkeit der besonders oxidationsempfindlichen Anthocyanidine wesentlich verbessert wird. Der erfindungsgemäße Komplex kann als lagerstabile wässrige Lösung oder  
25 Feststoff formuliert werden, wie unten noch näher gezeigt werden wird.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Komplexierung  
30 des Wirkstoffs Delphindin mit einem Sulfoethylether- $\beta$ -Cyclodextrin, was überraschenderweise die Löslichkeit und Stabilität des Wirkstoffs erhöht. Ein den Schutzbereich nicht beschränkender Erklärungsversuch hierfür ist, dass

die negativ geladenen Sulfoethyleinheiten mit den positiv geladenen Anthocyanidin Delphinidin elektrostatisch wechselwirken und unter den Alkylgruppen die Ethylgruppe die optimale Länge besitzt, um sterisch eine entsprechende Wechselwirkung zu ermöglichen. An dieser Stelle sei ange-  
5 merkt, dass keine allgemein gültige Aussage getroffen werden kann, dass ein beliebiger Wirkstoff, beispielsweise Delphinidin, im Komplex mit einem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin zu einer Verbesserung der Löslichkeit und Sta-  
10 bilität führt. Beispielhaft verwiesen sei an dieser Stelle auf Tabelle 1 in Ueda et al., „Evaluation of a Sulfobutyl Ether  $\beta$ -Cyclodextrin as a Solubizing/Stabilizing Agent for Several Drugs“, Drug Development and Industrial Pharmacy, 24(9), 863-867 (1998), in der die Löslichkeiten verschiede-  
15 ner Wirkstoffe allein, im Komplex mit Sulfobutylether- $\beta$ -Cyclodextrin und im Komplex mit  $\beta$ -Cyclodextrin gegenübergestellt sind. Aus den dort dargestellten Löslichkeitswerten (SBE7- $\beta$ -CD vs.  $\beta$ -CD) erkennt man, dass bei einem Drittel der untersuchten Wirkstoffe im Komplex mit Sulfobutylether-  
20  $\beta$ -Cyclodextrin genau das Gegenteil der Fall ist, d.h. der Komplex aus Wirkstoff und Sulfobutylether- $\beta$ -Cyclodextrin eine signifikant geringere Löslichkeit gegenüber dem Komplex mit  $\beta$ -Cyclodextrin zur Folge hat.

25 Bevorzugt beträgt der Substitutionsgrad des Cyclodextrins mit Sulfoalkylethergruppen 3 bis 8, weiter vorzugsweise 4 bis 8, weiter vorzugsweise 5 bis 8, weiter vorzugsweise 6 bis 7. Ebenfalls verwendbar sind Sulfobutylether- $\beta$ -Cyclodextrine mit gleichem Substitutionsgrad, so sind ent-  
30 sprechende Cyclodextrine mit einem mittleren Substitutionsgrad von 6 bis 7 beispielsweise in der genannten WO 2009/134347 A2 beschrieben und unter dem Handelsnamen Captisol® kommerziell erhältlich. Ebenfalls verwendbar sind

entsprechende Cyclodextrine mit einem Substitutionsgrad von 4 bis 5, beispielsweise 4,2.

Das erfindungsgemäß in reiner, Salz- oder komplexierter Form verwendete Anthocyanidin ist Delphinidin. Die chemische Struktur entspricht der oben wiedergegebenen Formel mit dem folgenden Substitutionsmuster

	R <sup>3'</sup>	R <sup>4'</sup>	R <sup>5'</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine wässrige Lösung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zur Verwendung als Medikament gemäß den Ansprüchen.

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Komplexes sowie einer entsprechend wässrigen Lösung umfasst die folgenden Schritte:

- a) Herstellen einer wässrigen Lösung des Sufoalkylether-β-Cyclodextrins,
- b) Zugabe des Anthocyanidin Delphinidin und Vermischen zur Herstellung des Komplexes.

In Schritt a) wird bevorzugt eine wässrige Lösung hergestellt, die 5 bis 10 Gew.-% des verwendeten Cyclodextrins enthält. Besonders bevorzugt ist es im Rahmen der Erfindung, wenn der pH-Wert der wässrigen Lösung während oder nach, bevorzugt jedoch vor der Zugabe des Delphinidins auf einen pH-Wert von 7 oder weniger, vorzugsweise 6 oder weniger, weiter vorzugsweise 5 oder weniger, weiter vorzugsweise 4 bis 5, eingestellt wird. Es hat sich gezeigt, dass bei diesem pH-Wert sich eine höhere Konzentration des Komplexes in wässriger Lösung einstellen lässt.

Die Konzentration des Delphinidins berechnet als Chlorid, beträgt vorzugsweise wenigstens 0,5 mg/ml, weiter vorzugsweise wenigstens 1,0 mg/ml, weiter vorzugsweise wenigstens 1,5 mg/ml, weiter vorzugsweise 2,0 mg/ml. Der besonders bevorzugte Konzentrationsbereich von wenigstens 2,0 mg/ml lässt sich im Rahmen einer bevorzugten Ausführungsform insbesondere einstellen in einer wässrigen Lösung mit einem pH-Wert zwischen 4 und 5.

10

Im Rahmen der Herstellung kann das Vermischen der Bestandteile der wässrigen Lösung durch Rühren geschehen, bevorzugte Zeiträume für das Vermischen sind 2 bis 20 h. Bevorzugt wird im Dunkeln gearbeitet, um eine lichtinduzierte Oxidation zu vermeiden.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Feststoff zur Verwendung als Medikament, der erfindungsgemäß erhältlich ist durch Entfernen des Lösungsmittels aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen wässrigen Lösung. Das Entfernen kann bevorzugt durch Gefriertrocknung (Lyophilisation) erfolgen. Sowohl die erfindungsgemäße wässrige medikamentöse Lösung als auch der medikamentöse Feststoff besitzen eine hohe Lagerstabilität.

25

Die Erfindung soll nun im Folgenden weiter in den Beispielen unter Bezug auf die beigefügten Figuren beschrieben werden, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Figur 1 zeigt das *in-vitro* Wirkungsprofil der prophylaktischen und/oder mit Lipopolysaccharid (LPS) gleichzeitigen Verabreichung von Delphinidin auf Zellen im Vergleich zu nur mit LPS (Kontrolle)

behandelten Zellen.

Figur 2a zeigt das *in-vitro* Wirkungsprofil der mit Lipopolysaccharid (LPS) gleichzeitigen Verabreichung von Delphinidin oder Hydrocortison auf Zellen im Vergleich zu nur mit LPS (Kontrolle) behandelten Zellen.

Figur 2b zeigt das *in-vitro* Wirkungsprofil der mit Lipopolysaccharid (LPS) gleichzeitigen Verabreichung von Delphinidin auf Zellen im Vergleich zu nur mit LPS (Kontrolle) behandelten Zellen.

Figur 3 zeigt das *in-vitro* Wirkungsprofil von Delphinidin auf Zellen bei Verwendung verschiedener Delphinidinkonzentration im Vergleich zu mit Hydrocortison behandelten Zellen.

Figur 4 zeigt den Einfluss von Delphinidin und Dexamethason auf die mRNA Expression von Ccl7 [Chemokine (C-C motif) ligand 7] in cEND Zellen nach TNF $\alpha$  [Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ] Behandlung bzw. unbehandelten Zellen *in vitro*.

Figur 5 zeigt den Einfluss von Delphinidin auf die mRNA Expression des Tight junction Proteins Claudin-5 in cEND Zellen nach TNF $\alpha$  [Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ] Behandlung bzw. unbehandelten Zellen *in vitro*.

Figur 6 zeigt den *in-vivo* Einfluss von intraplantar verabreichten Delphinidin-Sulfoethylether- $\beta$ -Cyclodextrin auf eine CFA (Complete Freund's Ad-

juvant)-induzierte Entzündung der Rattenhinterpfote.

Figur 7 zeigt das in Beispiel 10 angewendete akute in vivo Maus-Herzinfarktmodell mit Zeitverlauf und den betroffenen Herzbereichen.

Figur 8 zeigt Löslichkeiten von DelphinidinSBECD.

Figur 9 zeigt das Versuchsprotokoll der Anwendung von DelphinidinSBECD in dem Modell gemäß Figur 7.

Figur 10 zeigt die Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Bereichs für DelphinidinSBECD im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

## Beispiele

### I. Herstellung eines Komplexes aus Delphinidin und Cyclodextrinen

5

#### 1. Eingesetzte Materialien:

Die nachfolgenden Cyclodextrine werden verwendet:

10

$\alpha$ -CD	ID No: CYL-2322
$\beta$ -CD	ID No: CYL-3190
$\gamma$ -CD	ID No: CYL-2323
(2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -CD	ID No: L-043/07
Sulfobutylether- $\beta$ -CD	ID No: 47K010111

Delphinidinchlorid wurde von der Firma Extrasynthese erworben.

#### 15 2. Bestimmung des Delphinidingehalts

Zur Bestimmung des Gehalts von Delphinidinchlorid in den delphinidinhaltigen Zusammensetzungen wurde ein Reverse-phase HPLC-Verfahren verwendet. Dabei wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

5

Gereinigtes Wasser

Methanol für die Chromatographie

Ameisensäure, p. a.

1 M Salzsäure als volumetrische Lösung.

10

Als Säule wurde eine Waters X Bridge™ C18,35 µl, 150 mm x 4,6 mm verwendet.

15 Die mobilen Phasen waren wie folgt:

Kanal A: Wasser 950 ml, Methanol 50 ml, Ameisensäure 10 ml

Kanal B: Wasser 50 ml, Methanol 950 ml, Ameisensäure 10 ml

Folgendes Gradientenprogramm wurde verwendet:

20

Zeit [min]	Prozent Kanal B
0	0
5	0
25	60
30	100

Stoppzeit: 35 min

Nachlaufzeit (posttime): 8 min

25 Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Säulentemperatur: 30°C +/- 2°C

UV-Vis Detektor: 530 µm für den Assay, 275 µm zur Detektion von Verunreinigungen

30 Integrator: Fläche

Lösungen und Probenvorbereitung:

Verdünnungslösung 1: Mischung aus 100 ml Methanol und 2,6 ml M HCL

- 5 Verdünnungslösung 2: Mischung aus 100 ml 40 prozentiger Methanol und 2,6 ml 1 M HCL

Kalibrierungslösung: Eine Referenzlösung von Delphinidin wurde durch Einwiegen von 10 mg Delphinidinchlorid in einen 10 ml Kolben und Lösen in Verdünnungslösung 1 hergestellt. Nach dem Lösen wurde ungefähr 10fach verdünnt mit Verdünnungslösung 2 zur Herstellung einer ungefähren Konzentration von 0,1 mg/ml.

- 15 Die Kontrollkalibrierungslösung wurde auf die gleiche Art und Weise hergestellt. Die Kalibrierungslösungen wurden sofort mittels HPLC analysiert, da Delphinidinchlorid in Lösung instabil ist.

- 20 Herstellung der Prüflösungen:

Zur Bestimmung des Delphinidingehalts erfindungsgemäß hergestellter Feststoffe (Herstellung siehe weiter unten) wurden etwa 50 mg dieser Zusammensetzung in einem 10 ml Kolben eingewogen. Anschließend wurde in Verdünnungslösung 2 gelöst und mit der gleichen Verdünnungslösung 2 weiter verdünnt bis zur Einstellung einer ungefähren Delphinidinkonzentration von 0,1 mg/ml.

- 30 Die Bestimmung des Delphinidingehalts in den Proben wurde berechnet unter Zuhilfenahme der Agilent ChemStation Software unter Verwendung der Kalibrierung mit dem beschriebenen externen Standard.

**Beispiel 1:** Komplexierung von Delphinidin mit SBE- $\beta$ -CD

In diesem Beispiel wird die Komplexierung von Delphinidin  
 5 durch verschiedene Cyclodextrine und die Löslichkeit des  
 Komplexes in wässriger Lösung untersucht.

Es wurden neutrale wässrige Lösungen hergestellt, die 10  
 Gew.-% des jeweiligen Cyclodextrines enthalten. Bei  $\beta$ -CD  
 10 wurde auf Grund der mangelnden Löslichkeit eine Konzentra-  
 tion von lediglich 2 Gew.-% gewählt.

Je 5 ml der wässrigen Cyclodextrinlösungen und von reinem  
 Wasser wurden in Glaskolben gefüllt. Anschließend wurde ein  
 15 Überschuss Delphinidinchlorid zugegeben. Die erforderliche  
 Überschussmenge war 10 mg für die Lösungen von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  
 $\gamma$ -Cyclodextrin und 15 mg für die Lösungen von HPBCD (2-  
 Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin) und SBE- $\beta$ -CD.

20 Die Suspensionen wurden für 20 h bei 30° C im Dunkeln ge-  
 rührt. Anschließend wurde filtriert durch einen Membranfil-  
 ter mit 0,22  $\mu$ m Porengröße.

Die erzielbaren Löslichkeiten sind in der nachfolgenden Ta-  
 25 belle 1 wiedergegeben.

Cyclodextrin	Cyclodextrin- Konzentration	Delphinidinchlorid
-	0	0.07 mg/ml
$\alpha$ -CD	10 %	0.14 mg/ml
$\beta$ -CD	2 %	0.05 mg/ml
$\gamma$ -CD	10 %	0.21 mg/ml
HPBCD	10 %	0.19 mg/ml

SBE- $\beta$ -CD	10 %	0.66 mg/ml
------------------	------	------------

Man erkennt, dass die Komplexierung und die dadurch bewirkte Löslichkeitserhöhung für SBE- $\beta$ -CD weit besser ist als für die anderen Cyclodextrine.

5

**Beispiel 2:** Einfluss des pH-Wertes

In diesem Beispiel wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Löslichkeit eines Delphinidin-SBE- $\beta$ -CD in wässriger Lösung untersucht. Nach der Vorschrift von Beispiel 1 wurden wässrige Lösungen von SEB- $\beta$ -CD hergestellt, diese Lösungen jedoch mit 1 M HCL auf die in Tabelle 2 genannten sauren pH-Werte eingestellt. Anschließend wurde Delphinidinchlorid nach der Vorschrift des Beispiels 1 zugegeben und weitergearbeitet, als einzige Abweichung wurde die Rührzeit auf 2,5 h begrenzt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 wiedergegeben.

10

15

pH	Delphinidinchlorid
6.0	0.60 mg/ml
4.8	2.12 mg/ml
4.1	2.03 mg/ml

Man erkennt, dass bei pH-Werten zwischen 4 und 5 die Löslichkeit des komplexierten Delphinidinchlorids sich etwa um den Faktor 3 gegenüber einem neutralen pH-Wert erhöht.

20

25

**Beispiel 3** Herstellung eines erfindungsgemäßen Feststoffs

In diesem Beispiel wird ein erfindungsgemäßer Komplex als Feststoff formuliert. Zu Vergleichszwecken werden ein

Delphinidin/HPBCD Komplex sowie eine Delphinidin/Stärkeformulierung als Feststoff zubereitet.

**Beispiel 3.1:** Delphinidin/SBE- $\beta$ -CD

5

5 g SBE- $\beta$ -CD wurden in 40 ml destilliertem Wasser zu einer klaren Lösung gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mittels 1 M HCL auf 4,8 eingestellt. Anschließend wurden 0,11 g Delphinidinchlorid hinzugefügt und 2 h bei 27°C im Dunkeln gerührt. Die homogene Flüssigkeit wurde durch einen Cellulosenitratmembranfilter mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m vakuumfiltriert. Die Lösung wurde gefroren und anschließend gefriergetrocknet bei -48°C und einem Druck von etwa 10,3 Pa (77 mTorr). Das Lyophilisat wurde gemahlen und durch ein Sieb von 0,3 mm Maschenweite gesiebt.

**Beispiel 3.2:** Delphinidin/HPBCD

Es wurde in gleicher Weise wie Beispiel 3.1 gearbeitet, jedoch wurde bei der Filtration eine signifikante Menge Material abfiltriert, was darauf hindeutet, dass die Solubilisierung deutlich weniger effektiv war als bei Verwendung von SBE- $\beta$ -CD gemäß Beispiel 3.1.

25 **Beispiel 3.3** Delphinidin/Stärkeformulierung

5 g Stärke wurde in 40 ml destilliertem Wasser suspendiert. Man erhielt eine weiße Suspension. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M HCL auf 4,6 eingestellt. Anschließend wurde 0,11 g Delphinidinchlorid zugegeben und für 2 h bei 27° C im Dunkeln gerührt. Die erhaltene homogene Flüssigkeit wurde wie in Beispiel 3.1 gefriergetrocknet, gemahlen und gesiebt.

Beispiel 3.1 ist erfindungsgemäß, bei den Beispielen 3.2 und 3.3 handelt es sich um Vergleichsbeispiele.

5 **Beispiel 4:** Stabilitätsversuche

Die Feststoffe gemäß den Beispielen 3.1 bis 3.3 wurden unter folgenden Bedingungen gelagert:

- 10 - 8 Tage bei Raumtemperatur in braunen, verschraubten Glasbehältern,
- anschließend 22 Tage bei Raumtemperatur in Glasbehältern unter Sauerstoffatmosphäre im Dunkeln.

15 Die letzten 22 Tage der oben beschriebenen Lagerung wurden in Glasviolen mit einem Volumen von 20 ml durchgeführt. Jeweils 250 mg der vorher bereits für 8 Tage gelagerten Proben wurden dort eingefüllt, die Violen wurden mit einem Gummistopfen verschlossen und abgedichtet. Mittels zwei In-

20 jektionsnadeln wurde der Kopfraum der Violen mit reinem Sauerstoff gespült. Die Proben wurden anschließend im Dunkeln gelagert.

Der Delphinidingehalt der Feststoffe (berechnet als Delphinidinchlorid und angegeben in Gew.-%) wurde mittels der

25 oben beschriebenen HPLC-Methode bestimmt. Die Ergebnisse finden sich in der nachfolgenden Tabelle 3.

	Zeitablauf [Tage]				
	Start	2	8	19	30
Beispiel 3.1	1.69	1.52	1.55	1.40	0.93
Beispiel 3.2	1.30	1.20	1.14	1.03	0.68
Beispiel 3.3	1.60	1.59	1.56	1.53	1.15

Die Ergebnisse zeigen, dass sich erfindungsgemäß ein Delphinidinkomplex herstellen lässt, der selbst unter reiner Sauerstoffatmosphäre eine hohe Stabilität und damit gute Lagerfähigkeit besitzt. Der Komplex besitzt ferner eine gute Löslichkeit in wässrigen, insbesondere leicht sauren Lösungen, sodass sich Delphinidin erfindungsgemäß auf vielfältige Art und Weise formulieren lässt. Die Stabilität des erfindungsgemäßen Feststoffes ist ähnlich gut wie eine Formulierung mit Stärke (Beispiel 3.3), dieses Vergleichsbeispiel lässt sich allerdings nicht in einer wässrigen Lösung formulieren.

**Beispiel 5:** Stabilitätsversuche in wässriger Lösung

15

Zur Bestimmung des Gehalts von Delphinidinchlorid in den delphinidinhaltigen Lösungen wurde ein Reverse Phase HPLC-Verfahren ähnlich dem oben bereits beschriebenen verwendet. Dabei wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

20

Gereinigtes Wasser

Methanol für die Chromatographie

Armeisensäure, p. a.

1 M Salzsäure als volumetrische Lösung.

25

Als Säule wurde eine Waters X Bridge™ C18, 35 µl, 150 mm x 4,6 mm verwendet.

Die mobilen Phasen waren wie folgt:

30

Kanal A: Wasser 770 ml, Methanol 230 ml, Armeisensäure 10 ml

Kanal B: Wasser 50 ml, Methanol 950 ml, Armeisensäure 10 ml

Folgendes Gradientenprogramm wurde verwendet:

Zeit [min]	Prozent Kanal B
0	0
5	0
20	20
25	100

Stoppzeit: 25 min

Nachlaufzeit (posttime): 8 min

5

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Säulentemperatur: 30°C +/- 2°C

UV-Vis Detektor: 530 µm für den Assay, 275 µm zur Detektion  
10 von Verunreinigungen

Integrator: Fläche

Lösungen und Probenvorbereitung:

15 Verdünnungslösung 1: Mischung aus 100 ml Methanol und 2,6  
ml 1 M HCL

Verdünnungslösung 2: Mischung aus 100 ml 50 %igem  
Methanol und 2,6 ml 1 M HCL

20

Kalibrierungslösung: Eine Referenzlösung von Delphinidin  
wurde durch Einwiegen von 10 mg Delphinidinchlorid in einen  
10 ml Kolben und Lösen in Verdünnungslösung 1 hergestellt.  
Nach dem Lösen wurde ungefähr 10fach verdünnt mit Verdün-  
25 nungslösung 2 zur Herstellung einer ungefähren Konzentration  
von 0,1 mg/ml.

Die Kontrollkalibrierungslösung wurde auf die gleiche Art und Weise hergestellt. Die Kalibrierungslösungen wurden sofort mittels HPLC analysiert, da Delphinidinchlorid in Lösung instabil ist.

5

Herstellung der Prüflösungen:

Zur Bestimmung des Delphinidingehalts einer erfindungsgemäßen wässrigen Lösung wurden Delphinidin/SBE- $\beta$ -CD des Beispiels 3.1 (erfindungsgemäß) und Delphinidin (Vergleichsbeispiel in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst bis zur Einstellung einer Startkonzentration (bezogen auf das Delphinidin) von 1,584 mg/ml (erfindungsgemäßes Beispiel) bzw. 0,0216 mg/ml (Vergleichsbeispiel). Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur hergestellt und anschließend bei 37°C im Dunkeln in verschlossenen Violen gelagert.

Nach 1, 2, 3 und 4 h wurde der Delphinidingehalt bestimmt. Die nachfolgende Tabelle gibt den ermittelten Gehalt als Prozentanteil der oben genannten Startkonzentration an.

20

Zeit [h]	Delphinidin unkomplexiert	Delphinidin/SBE- $\beta$ -CD
0	100%	100%
1	8,3%	80,7%
2	6,5%	74,5%
3	5,6%	64,7%
4	5,1%	62,8%

Die Bestimmung des Delphinidingehalts in den Proben wurde berechnet unter Zuhilfenahme der Agilent ChemStation Software unter Verwendung der Kalibrierung mit den beschriebenen externen Standard.

25

**II. Antiphlogistische und antiinflammatorische Wirkung von Delphinidin und Delphinidin-Sulfoethylether- $\beta$ -Cyclodextrin *in-vitro* und *in-vivo***

**Beispiel 6:** *In-vitro* Wirkungsprofil der prophylaktischen und/oder mit Lipopolysaccharid (LPS) gleichzeitigen Verabreichung von Delphinidin auf Zellen im Vergleich zu nur mit LPS (Kontrolle) behandelten Zellen.

Methodik

Bei gesunden Probanden wurde mittels Immunfluoreszenz Kernfärbung für NF $\kappa$ B die Konzentration von NF $\kappa$ B im Zellkern von Monozyten nach Stimulation mit LPS und/oder Delphinidin getestet und im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen ins Verhältnis gesetzt. NF $\kappa$ B wird durch unterschiedliche, vor allem inflammatorische und stress-assoziierte Stimuli aktiviert. Inaktive NF $\kappa$ B-Proteine sind im Zytosol an Inhibitor-Proteine der I $\kappa$ B-Familie gebunden (Baeuerle and Baltimore, 1988, Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor, Cell (53), 211-7; Baeuerle and Baltimore, 1988, I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor, Science (242), 540-6), wobei die Stimulus-abhängige proteolytische Degradation verschiedener I $\kappa$ B-Mitglieder die Kernwanderung von NF $\kappa$ B bewirkt (Ghosh et al., 1988, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, Annu Rev Immunol (16), 225-60) und somit die Bestimmung des Ausmaßes der Translokation von NF $\kappa$ B aus dem Zytosol in den Zellkern ein geeignetes Nach-

weismittel für die inflammatorische bzw. antiinflammatorische Wirkung zu untersuchender Zusammensetzungen ist.

Es wurde wie folgt vorgegangen und in Figur 1 von links  
5 nach rechts dargestellt, wobei die Stimualtion/Inkubation der Zellen (jeweils 1 ml RPMI-1640 umfassend 1 Million Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase) in einer Vertiefung einer 24-Well-Polysterol-Zellkulturschale bei 37°C erfolgte und die angegebenen Konzentrationen Endkonzentrationen sind:  
10

- „1,5h 10µg LPS“ - Stimulation der Zellen 1,5 h mit 10µg/ml LPS (Kontrolle)
- „24h Vorstim. 5µM Del-Cl; 1,5h 10µg LPS“ - 24h Vorstimulation der Zellen mit 5µM Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-1640 Zellmedium) und anschließend 1,5h Stimulation mit 10µg/ml LPS
- „1,5h 5µM Del-Cl + 10µg LPS“ - 1,5h Stimulation der Zellen mit 10µg/ml LPS und 5µM Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-1640 Zellmedium)
- „24h Vorstim. 5µM Del-Cl; 1,5h 5µM Del-Cl“ - 24h Vorstimulation der Zellen mit 5µM Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-1640 Zellmedium) und anschließend erneute Stimulation mit 5µM Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-1640 Zellmedium) für 1,5h
- „24h Vorstim. 5µM Del-Cl; 1,5h 5µM Del-Cl“ - 24h Vorstimulation der Zellen mit 5µM Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-1640 Zellmedium) und anschließend er-

+ 10µg LPS“                   neute Stimulation mit 5µM Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-1640 Zellmedium) sowie 10µg/ml LPS für 1,5h

### Ergebnisse

Wie aus Figur 1 ersichtlich hemmt eine prophylaktische Gabe von 5µM Delphinidin 24h vor der Stimulation der Zellimmunantwort mit LPS (schwach) die nachfolgende 1,5h LPS-vermittelte Immunantwort („24h Vorstim. 5µM Del-Cl; 1,5h 10µg LPS“ versus „1,5h 10µg LPS“), die Hemmung der Immunantwort ist geringer als bei gleichzeitiger Gabe von Delphinidin in Kombination mit LPS („1,5h 5µM Del-Cl + 10µg LPS“), und kann durch prophylaktische und wiederholte Zugabe von 5µM Delphinidin bei der LPS-Zugabe „24h Vorstim. 5µM Del-Cl; 1,5h 5µM Del-Cl + 10µg LPS“) weiter verstärkt werden (additiver Effekt).

15

**Beispiel 7:** *In-vitro* Wirkungsprofil der mit Lipopolysaccharid (LPS) gleichzeitigen Verabreichung von Delphinidin oder Hydrocortison auf Zellen im Vergleich zu nur mit LPS (Kontrolle) behandelten Zellen.

20

### Methodik

Es wurde analog der Methodik in Beispiel 5 vorgegangen und in den Figuren 2a und 2b von links nach rechts dargestellt, wobei die Stimualtion/Inkubation der Zellen (jeweils 1 ml RPMI-1640 umfassend 1 Million Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase) in einer Vertiefung einer 24-Well-Polysterol-Zellkulturschale bei 37°C erfolgte und die angegebenen Konzentrationen Endkonzentrationen sind:

30

Figur 2a:

- „1,5h 10µg LPS“ - Stimulation der Zellen 1,5 h mit  
10µg/ml LPS (Kontrolle)
- „1,5h 5µM Del-Cl + 10µg LPS“ - 1,5h Stimulation der Zellen mit 10µg/ml  
LPS und 5µM Delphinidinchlorid (gelöst  
in RPMI-1640 Zellmedium)
- „1,5h Hydrocortison + 10µg LPS“ - Stimulation der Zellen mit 10<sup>-5</sup>M Hydro-  
cortison und 10µg/ml LPS für 1,5h

Figur 2b:

- „1,5h 10µg LPS“ - Stimulation der Zellen 1,5 h mit  
10µg/ml LPS (Kontrolle)
- „1,5h 10µM Del-Cl + 10µg LPS“ - 1,5h Stimulation der Zellen mit 10µg/ml  
LPS und 10µM Delphinidinchlorid (ge-  
löst in RPMI-1640 Zellmedium)

5

### Ergebnisse

Wie aus Figur 2a ersichtlich wird die LPS-vermittelte Immunantwort der Zellen bei gleichzeitiger Gabe von 5µM Delphinidin („1,5h 5µM Del-Cl + 10µg LPS“) mindestens ge-  
10 nau so gut gehemmt, wie durch Zugabe von vergleichsweise he-  
rangezogenem Hydrocortison („1,5h Hydrocortison + 10µg LPS“). In einem in Figur 2b dargestellten Wiederholungsver-  
such wurde bestätigt, dass die LPS-vermittelte Immunantwort  
15 der Zellen bei gleichzeitiger Gabe von 10 µM Delphinidin  
 („1,5h 10µM Del-Cl + 10µg LPS“) signifikant verringert ist.

**Beispiel 8:** *In-vitro* Wirkungsprofil von Delphinidin auf Zellen bei Verwendung verschiedener Delphinidinkonzentration im Vergleich zu mit Hydrocortison behandelten Zellen.

Methodik

Es wurde analog der Methodik in den Beispielen 5 und 6 vor-  
5 gegangen und in Figur 3 von links nach rechts dargestellt,  
wobei die Stimualtion/Inkubation der Zellen (jeweils 1 ml  
RPMI-1640 umfassend 1 Million Zellen in der exponentiellen  
Wachstumsphase) in einer Vertiefung einer 24-Well-  
Polysterol-Zellkulturschale bei 37°C erfolgte und die ange-  
10 gebenen Konzentrationen Endkonzentrationen sind:

„1,5h 2,5µM Del-C1“ - 1,5h Stimulation der Zellen mit  
2,5µM Delphinidinchlorid (gelöst in  
RPMI-1640 Zellmedium)

„1,5h 5µM Del-C1“ - 1,5h Stimulation der Zellen mit 5µM  
Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-  
1640 Zellmedium)

„1,5h 10µM Del-C1“ - 1,5h Stimulation der Zellen mit 10µM  
Delphinidinchlorid (gelöst in RPMI-  
1640 Zellmedium)

„1,5h  
Hydrocortison“ - 1,5h Stimulation der Zellen mit  $10^{-5}$   
M Hydrocortison

Ergebnisse

15 Wie aus Figur 3 ersichtlich nimmt mit steigender Delphini-  
dinkonzentration auch die Delphinidin vermittelte Hemmung  
der Zellimmunantwort zu (Dosiseffekt), wobei die hemmende  
Wirkung bei entsprechend hoher Konzentration mit der von  
Hydrocortison vergleichbar ist.

**Beispiel 9:** Zellprotektive (antiinflammatorische/ antiphlogistische) Wirkung von Delphinidin auf die Blut-Hirnschranke, insbesondere Einfluss von Delphinidin im Vergleich zu Dexamethason auf die mRNA Expression von Ccl7 [Chemokine (C-C motif) ligand 7] in cEND Zellen nach TNF $\alpha$  [Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ] Behandlung bzw. unbehandelten Zellen *in vitro*)

10 Methodik

Um die antiinflammatorische Wirkung von Delphinidin zu untersuchen, wurde ein *in-vitro* Modell der Blut-Hirnschranke, cEND Zellen (Forster, C. et al., Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine *in vitro* system. J Physiol 565 (Pt 2), 475 (2005)), verwendet. Dieses *in-vitro* Modell besteht aus den mikrovaskulären Endothellzellen, die aus den Mäusehirnkapillaren isoliert und immortalisiert wurden. Die Zellen werden auf mit Kollagen IV (Bestandteil der Basallamina um die Hirnkapillaren) beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät.

Exposition von cEND Zellen mit Tumor Nekrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) und Bestimmung der Ccl7 mRNA Expression als Marker für Inflammation. Als Referenzsubstanz für eine antiinflammatorische Wirkung wurde Dexamethason, ein synthetisches Steroidhormon mit starker antiinflammatorischer Wirkung, gewählt und die Wirkung von Delphinidin in Relation zur Wirkung von Dexamethason im in Figur 4 dargestellten Diagramm aufgetragen. Es folgten RNA Isolation und qPCR Untersuchungen vom pro-inflammatorischen Zytokin, Ccl7 (Chemoki-

ne (C-C motif) ligand 7), auch als M<sub>cp</sub>-3 bekannt (monocyte chemotactic protein-3).

Es wurde wie folgt vorgegangen und in Figur 4 von links  
5 nach rechts dargestellt:

- „unbehandelt“ - Kontrolle ohne Reiz
- „dex“ - Dexamethason
- „Del-C1  
0,1µM“ - Delphinidin 0,1µMol
- „Del-C1  
1µM“ - Delphinidin 0,1µMol
- „TNFα  
24h“ - Exposition mit TNFα für 24h
- „TNFα  
48h“ - Exposition mit TNFα für 48h
- „TNFα dann  
dex“ - Exposition mit TNFα für 24h, anschließend  
Hinzufügen von Dexamethason und Expositi-  
on für weitere 24h
- „TNFα  
dann Del-C1  
0,1µM“ - Exposition mit TNFα für 24h, anschließend  
Hinzufügen von Delphinidin 0,1µMol und  
Exposition für weitere 24h
- „TNFα  
dann Del-C1  
1µM“ - Exposition mit TNFα für 24h, anschließend  
Hinzufügen von Delphinidin 1µMol und Ex-  
position für weitere 24h

### Ergebnisse

Behandlung mit TNF $\alpha$  führte zum Anstieg der Ccl7 mRNA Ex-  
5 pression auf das Zweifache im Vergleich zu unbehandelten  
Zellen. Zugabe von Delphinidin in beiden gewählten Konzent-  
rationen von 0,1 $\mu$ M und 1 $\mu$ M führt zu einer deutlichen Unter-  
drückung bzw. Hemmung des TNF $\alpha$ -induzierten Ccl7 mRNA Ex-  
pressionsanstiegs. Interessanterweise führte auch die Zuga-  
10 be von Delphinidin allein in das Zellkulturmedium ohne vor-  
heriger TNF $\alpha$  Exposition zur Suppression der Ccl7 Expressi-  
on in den cEND Zellen. Ein starker Effekt konnte ebenfalls  
bei vergleichsweise herangezogenem Dexamethason nachgewie-  
sen werden.

15

Aus den Messergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die  
antiinflammatorische Wirkung von Delphinidin auf die Blut-  
Hirn-Schranke nach Entzündung mindestens gleichwertig zu  
dem bisherigen „Goldstandard“ Dexamethason ist.

20

**Beispiel 10:** (Wirkung von Delphinidin auf die Barriereeigen-  
schaften der Blut-Hirn-Schranke, insbesondere Einfluss von  
Delphinidin auf die mRNA Expression des Tight junction Pro-  
teins Claudin-5 in cEND Zellen nach TNF $\alpha$  [Tumor Necrosis  
25 Factor  $\alpha$ ] Behandlung bzw. unbehandelten Zellen *in vitro*)

### Methodik

Als Surrogat-Marker für die Barriereeigenheiten wurde die Ex-  
30 pression vom Tight junction Protein Claudin-5 verwendet  
(Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier  
function in disease. Histochem Cell Biol. 2008; 130: 55-70)  
und analog Beispiel 8 vorgegangen.

### Ergebnisse

Die TNF $\alpha$  Behandlung führte zur Minderung der Claudin-5 mRNA  
5 Expression, wobei die Zugabe von Delphinidin nach 24h Stunden dieser TNF $\alpha$ -vermittelten Claudin-5 mRNA Expressionsminderung in beiden gewählten Konzentrationen (0,1 $\mu$ M und 1 $\mu$ M) entgegen wirkte, wie in Figur 5 dargestellt. Interessanterweise führte auch die Zugabe von Delphinidin allein in das  
10 Zellkulturmedium ohne vorherige TNF $\alpha$  Exposition zur Steigerung der Claudin-5 mRNA Expression.

Aus den Messergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die  
Barriere der Blut-Hirn-Schranke nach Entzündung unter dem  
15 Einfluss von Delphinidin stark zunimmt.

**Beispiel 11:** *In-vivo* Einfluss von Delphinidin-Sulfoethylether- $\beta$ -Cyclodextrin auf eine CFA (Complete Freund's Adjuvant)-induzierte Entzündung der Rattenhinterpfote.  
20

### Methodik

a) CFA-induzierte Entzündung der Rattenhinterpfote  
25

CFA wird in einer Dosis von 150  $\mu$ l intraplantar in die rechte hintere Rattenpfote unter Isoflurannarkose induziert. Die Entzündung und der darauffolgende Schmerz in der entzündeten Pfote entwickeln sich innerhalb 2 bis 96 h. Bis  
30 zu diesem Zeitpunkt gibt es keinen signifikanten Unterschied im Essverhalten, Körpergewicht, Kerntemperatur oder dem generellen Aktivitätslevel im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren (Stein *et al.*, Unilateral inflammation

of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds, *Pharmacol Biochem Behav.*, 1988; 31(2): 445-51)

- 5 b) Verabreichung von H<sub>2</sub>O (Kontrolle) und Delphinidin-Sulfoethylether- $\beta$ -Cyclodextrin (Delphinidin-SE $\beta$  CD) in unterschiedlichen Dosierungen

Den Ratten wird 96 Stunden nach vorgenanntem Schritt a) 10 intraplantar in die rechte hintere Rattenpfote 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (Kontrolle) bzw. 100  $\mu$ l Delphinidin-SE $\beta$ CD mit unterschiedlichen Dosierungen (2,50 mg/ml und 5,00 mg/ml) unter Isoflurannarkose injiziert.

- 15 c) Algesiometrisches Messverfahren

Die Ratten wurden wie folgt an die entsprechende Versuchsbedingungen gewöhnt:

20 Für die Gewöhnung an den Randall-Sellito-Test wurden die Tiere 3 x pro Tag in den ersten drei Tagen locker unter einem Zellstoff gehalten, um sie an die Situation des Experimentes zu gewöhnen.

25 Am vierten Tag fand der oben genannte Behandlungsschritt b) statt, wobei beginnend vom Zeitpunkt 0 nach der Injektion nach 5, 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten die Messung der Pfootendruckschwelle mittels Randall-Sellito-Test (Gerät von Ugo Basile) erfolgte.

30

Jede Pfote ipsilateral und kontralateral wird drei Mal im Abstand von mindestens 10s gemessen. Für den Randall-Sellito-Test wird die Ratte locker unter Zellstoff gehalten

und die Pfote auf ein kleines Podest gesetzt. Dann wird von oben über einen Stempel ein steigender Druck auf die Pfote ausgeübt bis die Ratte die Pfote wegzieht (Stein *et al.*, Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin, J Neurosci. 1990; 10(4): 1292-8; Rittner *et al.*, Pain control by CXCR2 ligands through Ca<sup>2+</sup>-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells, FASEB J. 2006; 20(14): 2627-9).

10

### Ergebnisse

Auf den FAC-induzierten Entzündungsreiz in der Pfote der Ratten wurde deren mechanische Schmerzschwelle untersucht. Aus den ermittelten Pfootendruckschwellwerten, die in Figur 6 graphisch aufbereitet dargestellt sind, lässt sich ableiten, dass die Schmerzschwelle bei der Verabreichung von Delphinidin-SE $\beta$ CD gegenüber der Kontrollinjektion mit H<sub>2</sub>O signifikant reduziert ist, insbesondere in den ersten 120 Minuten, wobei die stärkste Wirkung bereits 5 Minuten nach der Verabreichung von Delphinidin-SE $\beta$ CD auftritt. Dies gilt für beide gemessene Dosen von 2,5 mg/ml und 5,00 mg/ml Delphinidin-SE $\beta$ CD, wobei sich aus der signifikant stärkeren Wirkung der höheren Konzentration in den Messpunkten der ersten 30 Minuten ebenfalls eine Dosisabhängigkeit ableiten lässt.

30

**Beispiel 12:** Kardioprotektion durch Delphinidin-Sulfobothylether- $\beta$ -Cyclodextrin (DelphinidinSBECD)

### Methodik und Ergebnisse

In Beispiel 11 wurde eine mögliche Postkonditionierungswirkung von DelphinidinSBECD im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht. Dazu wurde im *in vivo* - *in situ* Herzinfarktmodell der Maus mit den in den Figuren 7 und 9 dargestellten Zeitabläufen unter Anwendung der in Redel *et al.*, 2008 [Redel *et al.*, Impact of Ischemia and Reperfusion Times on Myocardial Infarct Size in Mice *In Vivo*. *Experimental Biology and Medicine* (2008), 233:84-93] und Stumpner *et al.*, 2012 [Stumpner *et al.*, Desflurane-induced post-conditioning against myocardial infarction is mediated by calcium-activated potassium channels: role of the mitochondrial permeability transition pore. *British Journal of Anaesthesia* (2012), 108(4): 594-601] beschriebenen Methodik die resultierende Herzinfarktgröße bewertet und in Figure 10 graphisch dargestellt. Angegeben sind in Figur 10 Mittelwert $\pm$ SEM; IS = Herzinfarktgröße; AAR = Risikobereich (area at risk) und \*=signifikant verschieden von der Kontrollgruppe, wenn  $p < 0,05$ . Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

20

Aus den ermittelten IS- und %AAR-Werten, die in Figur 10 graphisch aufbereitet dargestellt sind, lässt sich ableiten, dass die Verabreichung von DelphinidinSBECD zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Infarktgrößenreduktion führt.

25

**Patentansprüche**

1. Zusammensetzung umfassend einen Komplex aus Delphinidin und einem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin zur Verwendung als Antiphlogistikum und/oder Immunsuppressivum.  
5
2. Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verwendung die Gewebe- und/oder Organprotektion bei oder infolge zerebraler und/oder myokardialer Ischämie, vorzugsweise bei drohenden Reperfusionsschäden, umfasst.  
10
3. Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zerebrale Ischämie und die myokardiale Ischämie mit den klinischen Krankheitsbildern des Schlaganfalls und des Myokardinfarkts korrelieren.  
15
4. Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verwendung die Prophylaxe und/oder Behandlung einer Indikation, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - entzündlichen Zuständen oder entzündlichen Erkrankungen,
  - 25 - mit entzündlichen Gewebeveränderungen assoziierte Erkrankungen,
  - Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation und
  - Autoimmunerkrankungenumfasst.  
30
5. Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die entzündlichen Zustände oder entzündlichen Erkrankungen ausgewählt sind aus

- der Gruppe bestehend aus rheumatoide Arthritis, chronische Polyarthrit, juvenile idiopathische Arthritis, Spondylitis, Osteoarthritis, Sepsis, Septischer Schock, Zerebrale Malaria, eine chronisch entzündliche Lungenerkrankung, Silikose, Sarkoidose, Reperfusionssyndrom, inflammatorisch-neurodegenerative Erkrankungen, einschließlich Crohn'sche Erkrankung, Multiple Sklerose und Parkinson, Colitis ulzerosa, Depressionen und Fieber bei Infektionen.
- 5
- 10
6. Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die mit entzündlichen Gewebeeränderungen assoziierten Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Alzheimer, Parkinson und Krebs.
- 15
7. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin ein Sulfobutylether- $\beta$ -Cyclodextrin oder ein Sulfoethylether- $\beta$ -Cyclodextrin ist.
- 20
8. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Substitutionsgrad des Cyclodextrins mit Sulfoalkylethergruppen 3 bis 8, vorzugsweise 4 bis 8, weiter vorzugsweise 5 bis 8, weiter vorzugsweise 6 bis 7 beträgt.
- 25
- 30 9. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung eine therapeutisch wirksame Menge des

Komplexes aus Delphinidin und Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin umfasst.

10. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der vorange-  
5 henden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung als Monopräparat verwendet wird.
11. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der Ansprüche  
10 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung mindestens eine weitere therapeutisch aktive Substanz umfasst.
12. Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 11, da-  
15 durch gekennzeichnet, dass die mindestens eine weitere therapeutisch aktive Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus der Gruppe der Antiphlogistika, der Antikörper gegen inflammatorische Zytokine, der löslichen Rezeptoren inflammatorischer Zytokine oder der Immunosuppressiva und vorzugsweise ausgewählt ist  
20 aus der Gruppe bestehend aus Acetylsalicylsäure, Diclophenac, Indometacin, Ciclosporin, Azathioprin, Bortezomib, Melphalan, Prednison, Vincristin, Carmustin, Cyclophosphamid, Dexamethason, Thalidomid, Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Cytarabin.
- 25
13. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der vorange-  
henden Ansprüche, weiter umfassend ein oder mehrere  
pharmazeutische Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, vorzugs-  
weise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einen  
30 pharmazeutisch akzeptablen Träger, Füllstoffe, Geruchsstoffe und Stabilisatoren.

14. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche in einer Formulierungsform zur Verabreichung in einer Form ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus oral, rektal, parenteral, einschließlich intraperitoneal, perkutan, subkutan, intramuskulär, intravenös, ophthalmisch, pulmonal und nasal.
15. Zusammensetzung zur Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Verabreichungsform ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Tablette, Kapsel, Suspension, Aerosol, Lösung, Creme, Paste, Lotion, Gel und Salbe.
16. Zusammensetzung zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Komplex aus Delphinidin und dem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin in einer galenischen Zubereitung zur kontrollierten und/oder zeitverzögerten Freisetzung des Delphinidins eingesetzt wird.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen Komplex aus Delphinidin und einem Sulfoalkylether- $\beta$ -Cyclodextrin.

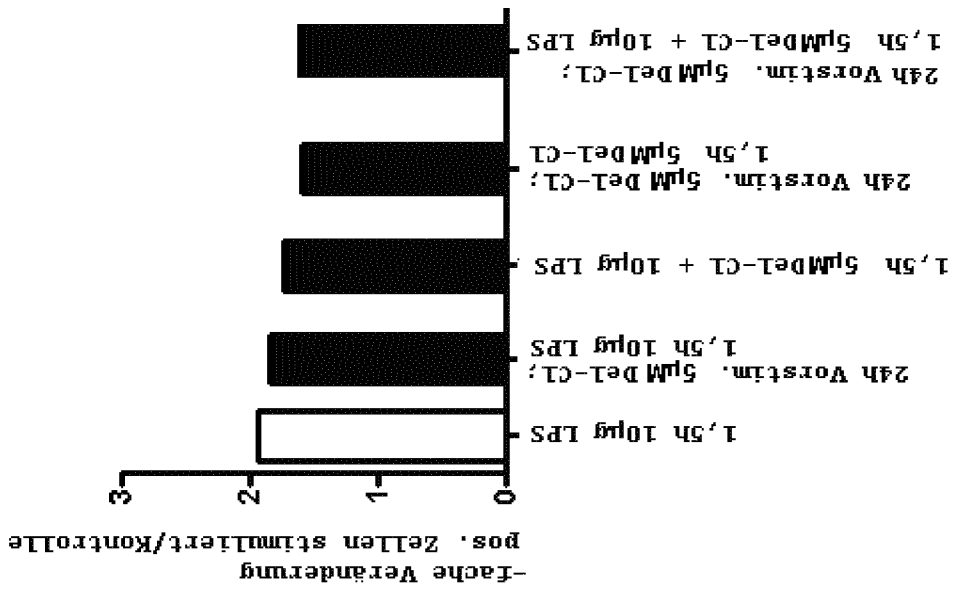


FIG. 1

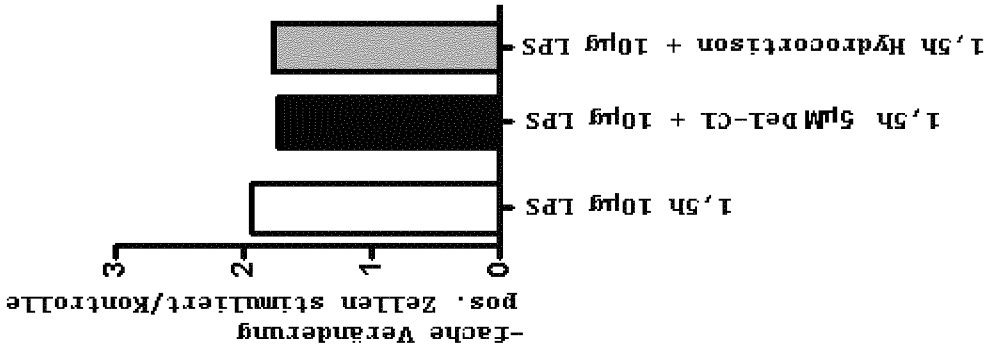


FIG. 2a

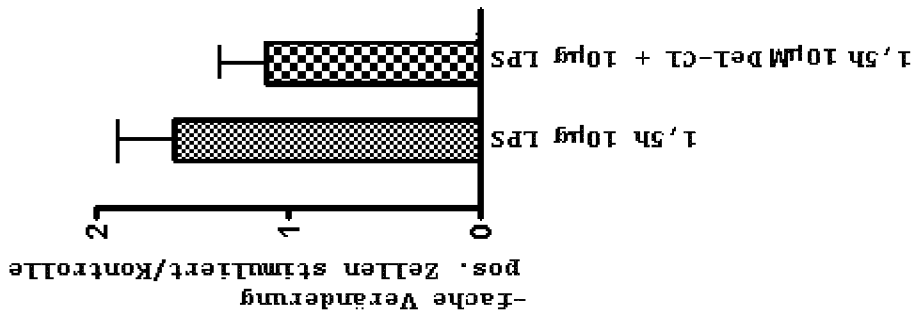


FIG. 2b

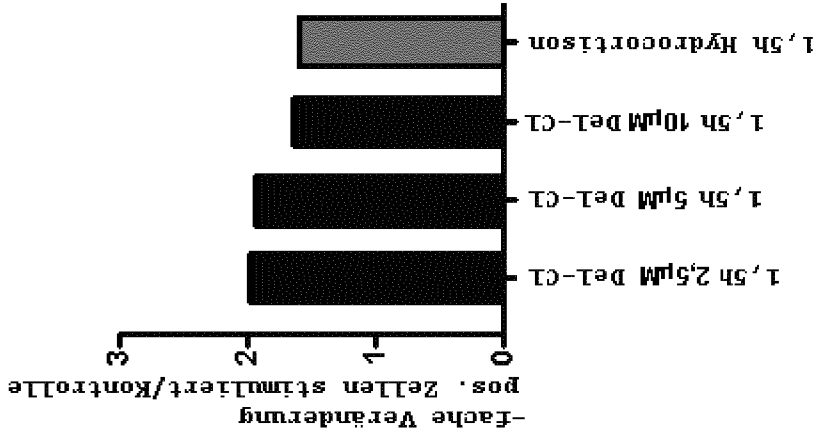
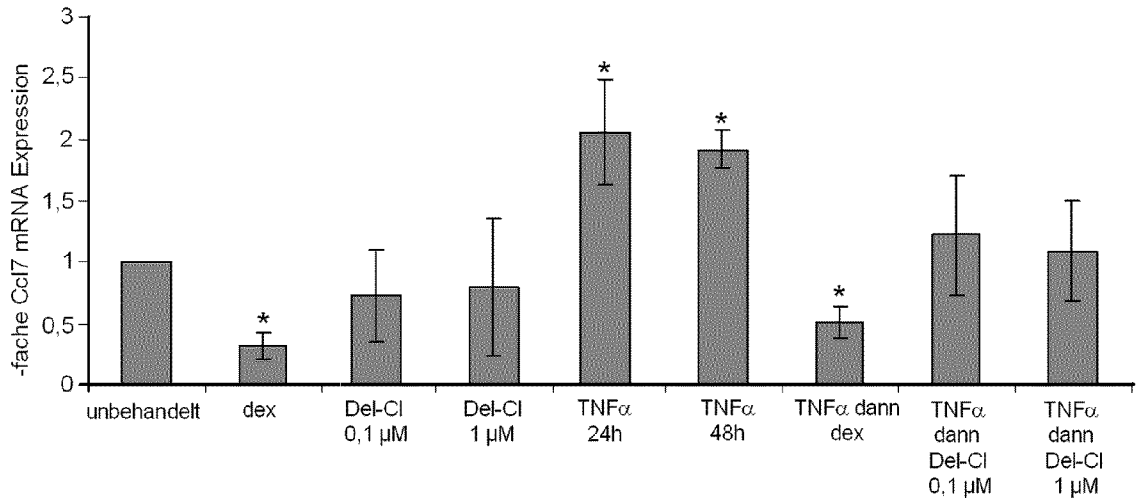
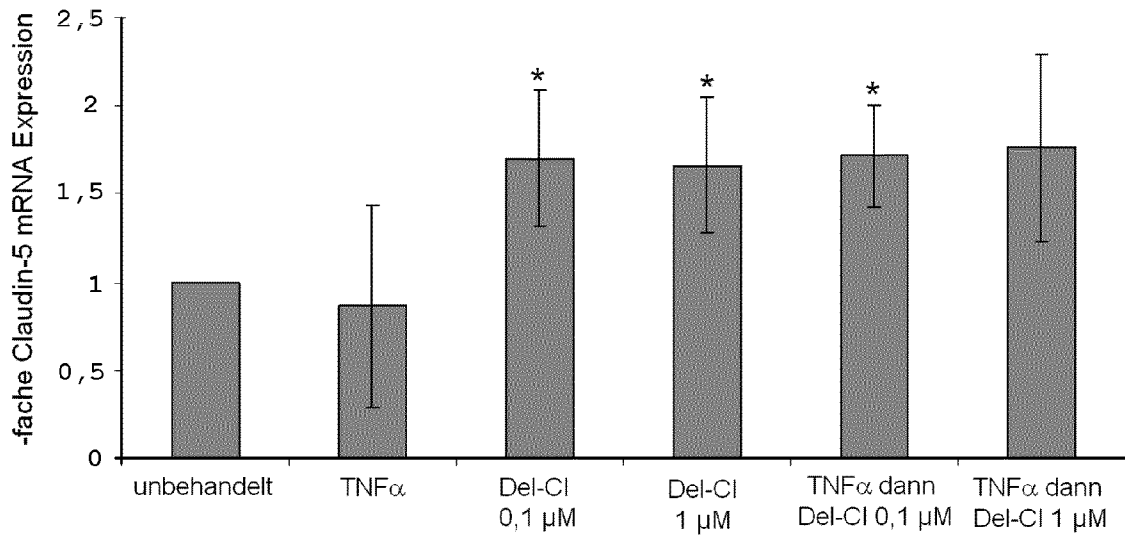


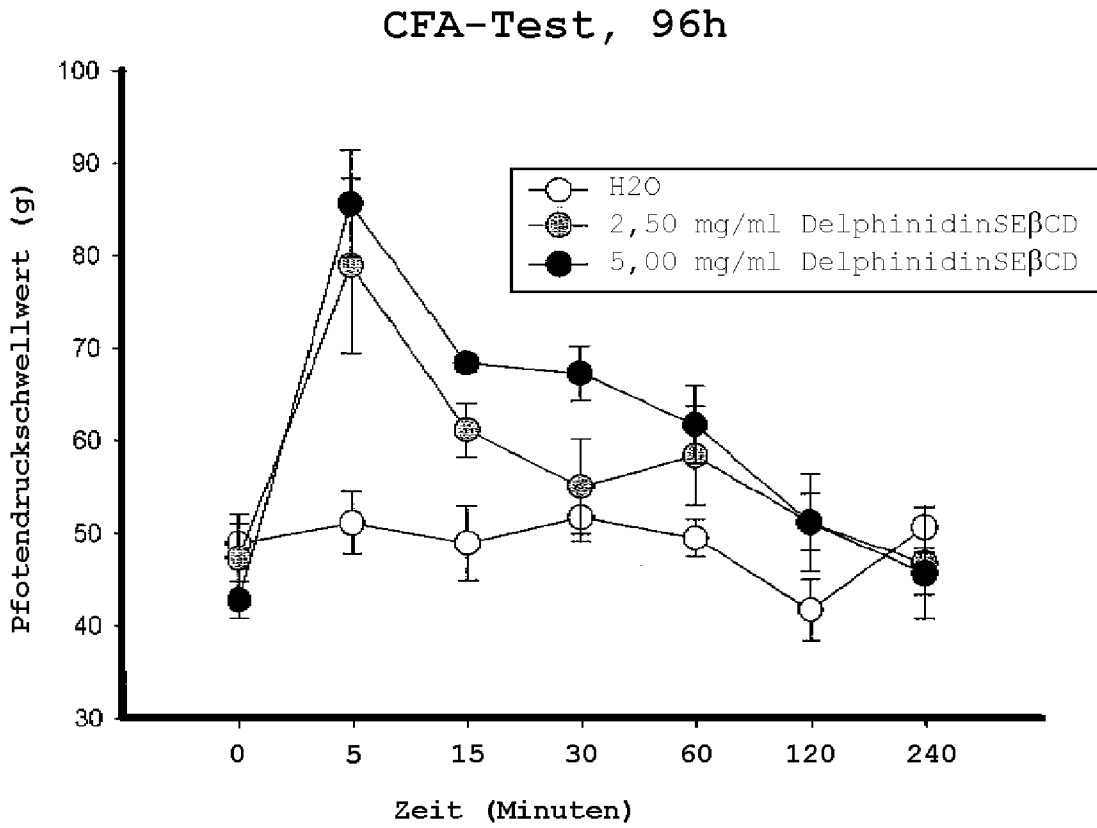
FIG. 3



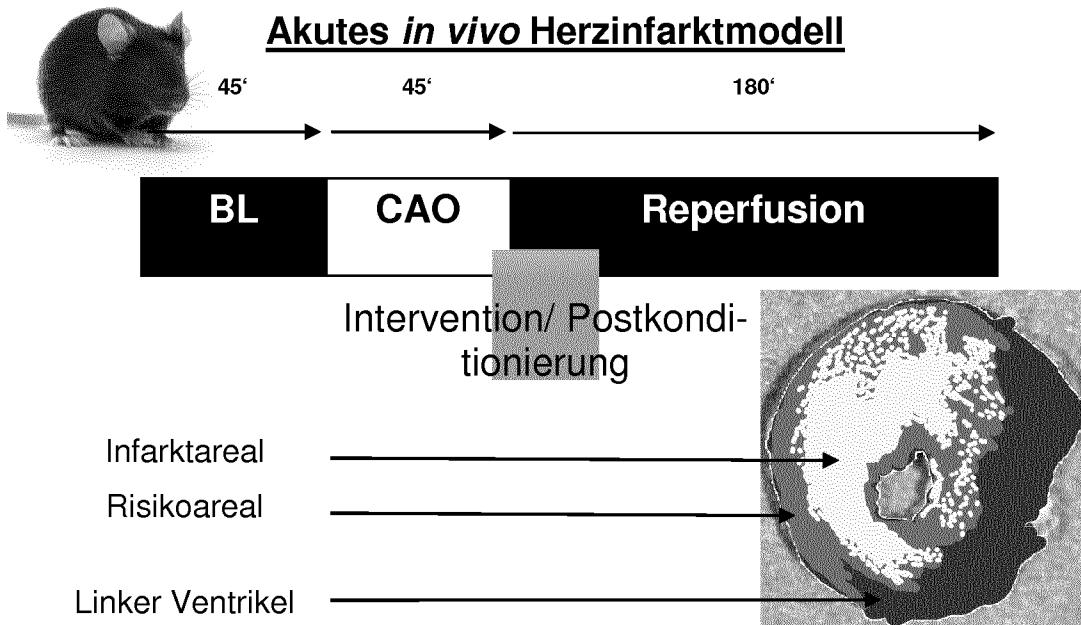
**FIG. 4**



**FIG. 5**

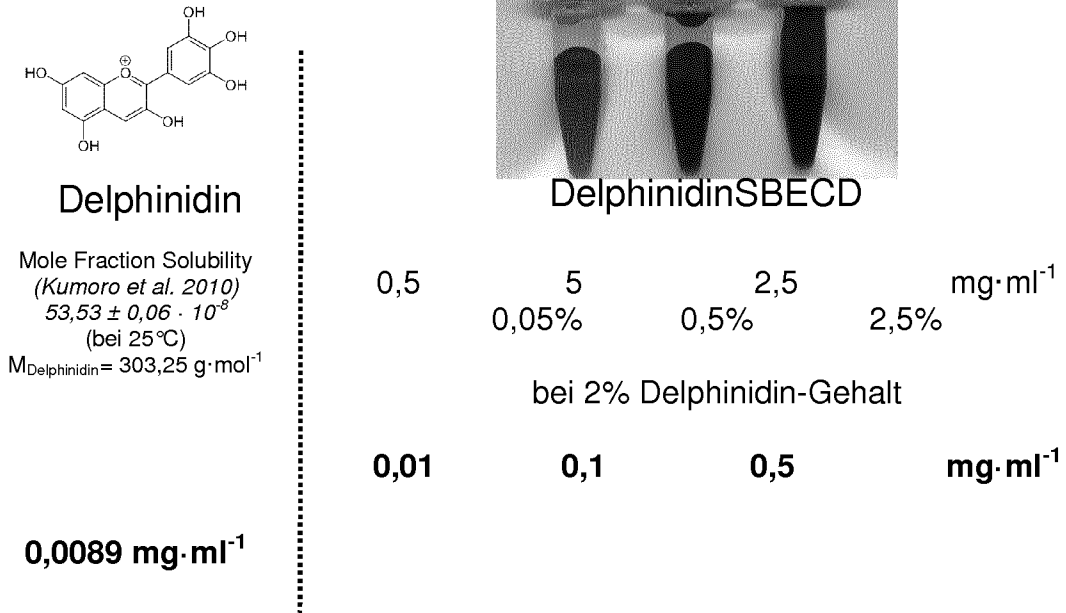


**FIG. 6**



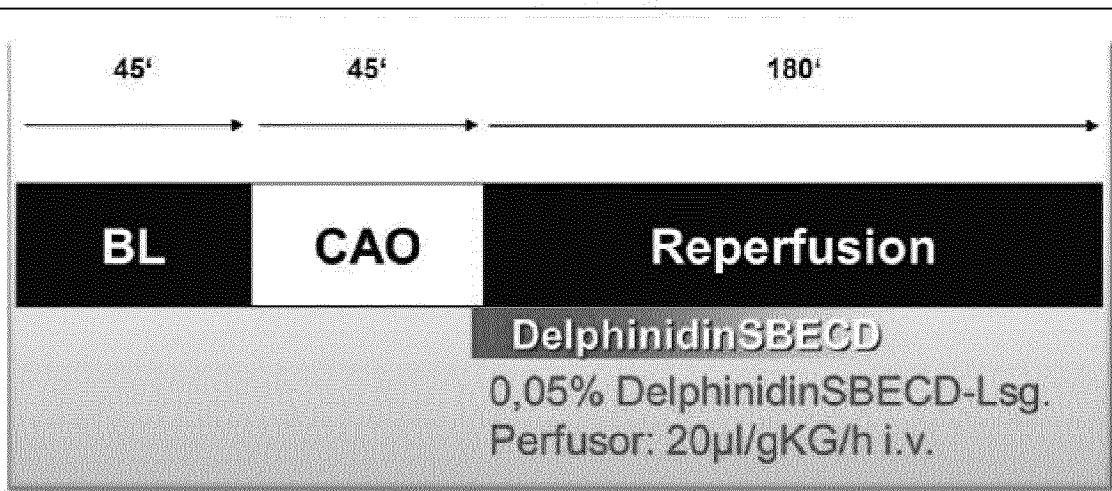
**FIG. 7**

Löslichkeit von DelphinidinSBECD



**FIG. 8**

Versuchsprotokoll DelphinidinSBECD



**FIG. 9**

### Infarktgrößenreduktion durch DelphinidinSBECD

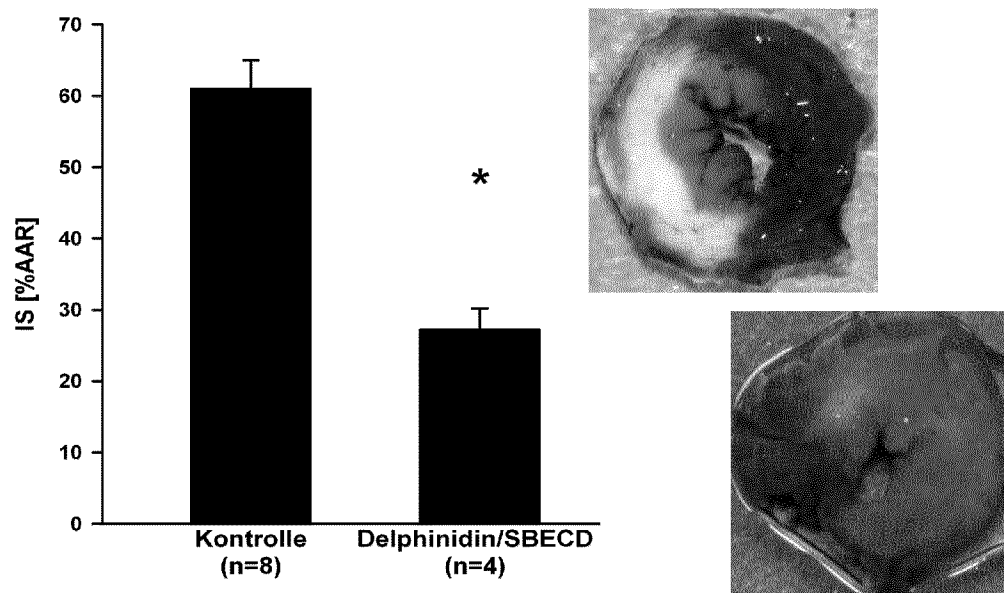


FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/072856

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K31/7042 A61K47/40 A61P29/00 A61P37/06  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K A61P  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/126979 A1 (IND ACADEMIC COOP [KR]; CHOI TAE HYUN [KR]; CHANG KI CHURL [KR]; SHIN) 23 October 2008 (2008-10-23) claims 1-4	1-17
Y	----- KR 2007 0026284 A (KOREA RES INST CHEM TECH [KR]) 8 March 2007 (2007-03-08) abstract	1-17
Y	----- KR 2007 0028640 A (KOREA RES INST CHEM TECH [KR]) 13 March 2007 (2007-03-13) abstract	1-17
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  26 November 2013	Date of mailing of the international search report  06/12/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Economou, Dimitrios

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/072856

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009 167174 A (NIPPON SEIYAKU KOGYO KK) 30 July 2009 (2009-07-30) paragraph [0001] paragraph [0009] paragraph [0028] claims 1-10	1-17
Y	----- WO 2011/048479 A2 (MAQUI NEW LIFE S A [CL]; HANCKE JUAN [CL]; BURGOS RAFAEL [CL]; HIDALGO) 28 April 2011 (2011-04-28) page 5, paragraph 4 - page 6, paragraph 1 page 8, paragraph 2 claims 1-20	1-17
Y	----- BERTUGLIA S ET AL: "Microvascular effects of a natural flavonoid (IdB 1056) during ischemia-reperfusion injury", PHARMACOLOGICAL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 22, 1 September 1990 (1990-09-01), page 52, XP025956653, ISSN: 1043-6618, DOI: 10.1016/S1043-6618(09)80104-7 [retrieved on 1990-09-01] abstract	1-17
Y	----- SCARABELLI T M ET AL: "Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 583, no. 3, 4 February 2009 (2009-02-04), pages 531-541, XP025923237, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2008.12.037 [retrieved on 2008-12-29] page 9	1-17
Y	----- US 2009/270348 A1 (ANTLE VINCENT [US]) 29 October 2009 (2009-10-29) page 12, paragraph 139	1-17
Y	----- UEDA H ET AL: "EVALUATION OF A SULFOBUTYL ETHER BETA-CYCLODEXTRIN AS A SOLUBILIZING/STABILIZING AGENT FOR SEVERAL DRUGS", DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, NEW YORK, NY, US, vol. 24, no. 9, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 863-867, XP009040590, ISSN: 0363-9045, DOI: 10.3109/03639049809088532 cited in the application page 867, right-hand column	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2013/072856
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008126979 A1	23-10-2008	KR 20080092060 A WO 2008126979 A1	15-10-2008 23-10-2008
-----			
KR 20070026284 A	08-03-2007	NONE	
-----			
KR 20070028640 A	13-03-2007	NONE	
-----			
JP 2009167174 A	30-07-2009	NONE	
-----			
WO 2011048479 A2	28-04-2011	CA 2735343 A1 EP 2344154 A1 JP 2013508347 A KR 20120090089 A US 2011268825 A1 WO 2011048479 A2	21-04-2011 20-07-2011 07-03-2013 16-08-2012 03-11-2011 28-04-2011
-----			
US 2009270348 A1	29-10-2009	AU 2009241858 A1 CA 2702603 A1 CA 2771879 A1 CN 101959508 A EA 201000828 A1 EP 2268269 A2 JP 4923144 B2 JP 2010539193 A JP 2012072160 A KR 20110010742 A NZ 589290 A US 2009270348 A1 US 2010093663 A1 US 2013184357 A1 WO 2009134347 A2	05-11-2009 05-11-2009 05-11-2009 26-01-2011 31-10-2011 05-01-2011 25-04-2012 16-12-2010 12-04-2012 07-02-2011 21-12-2012 29-10-2009 15-04-2010 18-07-2013 05-11-2009
-----			

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A61K31/7042 A61K47/40 A61P29/00 A61P37/06 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A61K A61P		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 2008/126979 A1 (IND ACADEMIC COOP [KR]; CHOI TAE HYUN [KR]; CHANG KI CHURL [KR]; SHIN) 23. Oktober 2008 (2008-10-23) Ansprüche 1-4 -----	1-17
Y	KR 2007 0026284 A (KOREA RES INST CHEM TECH [KR]) 8. März 2007 (2007-03-08) Zusammenfassung -----	1-17
Y	KR 2007 0028640 A (KOREA RES INST CHEM TECH [KR]) 13. März 2007 (2007-03-13) Zusammenfassung -----	1-17
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
26. November 2013		06/12/2013
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Economou, Dimitrios

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JP 2009 167174 A (NIPPON SEIYAKU KOGYO KK) 30. Juli 2009 (2009-07-30) Absatz [0001] Absatz [0009] Absatz [0028] Ansprüche 1-10	1-17
	-----	
Y	WO 2011/048479 A2 (MAQUI NEW LIFE S A [CL]; HANCKE JUAN [CL]; BURGOS RAFAEL [CL]; HIDALGO) 28. April 2011 (2011-04-28) Seite 5, Absatz 4 - Seite 6, Absatz 1 Seite 8, Absatz 2 Ansprüche 1-20	1-17
	-----	
Y	BERTUGLIA S ET AL: "Microvascular effects of a natural flavonoid (IdB 1056) during ischemia-reperfusion injury", PHARMACOLOGICAL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, Bd. 22, 1. September 1990 (1990-09-01), Seite 52, XP025956653, ISSN: 1043-6618, DOI: 10.1016/S1043-6618(09)80104-7 [gefunden am 1990-09-01] Zusammenfassung	1-17
	-----	
Y	SCARABELLI T M ET AL: "Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 583, Nr. 3, 4. Februar 2009 (2009-02-04), Seiten 531-541, XP025923237, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2008.12.037 [gefunden am 2008-12-29] Seite 9	1-17
	-----	
Y	US 2009/270348 A1 (ANTLE VINCENT [US]) 29. Oktober 2009 (2009-10-29) Seite 12, Absatz 139	1-17
	-----	
Y	UEDA H ET AL: "EVALUATION OF A SULFOBUTYL ETHER BETA-CYCLODEXTRIN AS A SOLUBILIZING/STABILIZING AGENT FOR SEVERAL DRUGS", DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, NEW YORK, NY, US, Bd. 24, Nr. 9, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 863-867, XP009040590, ISSN: 0363-9045, DOI: 10.3109/03639049809088532 in der Anmeldung erwähnt Seite 867, rechte Spalte	1-17
	-----	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/072856

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008126979 A1	23-10-2008	KR 20080092060 A WO 2008126979 A1	15-10-2008 23-10-2008
-----			
KR 20070026284 A	08-03-2007	KEINE	
-----			
KR 20070028640 A	13-03-2007	KEINE	
-----			
JP 2009167174 A	30-07-2009	KEINE	
-----			
WO 2011048479 A2	28-04-2011	CA 2735343 A1 EP 2344154 A1 JP 2013508347 A KR 20120090089 A US 2011268825 A1 WO 2011048479 A2	21-04-2011 20-07-2011 07-03-2013 16-08-2012 03-11-2011 28-04-2011
-----			
US 2009270348 A1	29-10-2009	AU 2009241858 A1 CA 2702603 A1 CA 2771879 A1 CN 101959508 A EA 201000828 A1 EP 2268269 A2 JP 4923144 B2 JP 2010539193 A JP 2012072160 A KR 20110010742 A NZ 589290 A US 2009270348 A1 US 2010093663 A1 US 2013184357 A1 WO 2009134347 A2	05-11-2009 05-11-2009 05-11-2009 26-01-2011 31-10-2011 05-01-2011 25-04-2012 16-12-2010 12-04-2012 07-02-2011 21-12-2012 29-10-2009 15-04-2010 18-07-2013 05-11-2009
-----			