

(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

24. April 2014 (24.04.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2014/060548 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 31/7042 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/071779

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. Oktober 2013 (17.10.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

12188789.7 17. Oktober 2012 (17.10.2012) 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: GLAWE DELFS MOLL PARTNERSCHAFT
VON PATENT- UND RECHTSANWÄLTEN; Postfach
13 03 91, 20103 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)

(54) Title: ANTHOCYANIDIN COMPLEX FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE MYELOMA

(54) Bezeichnung : ANTHOCYANIDIN-KOMPLEX ZUR BEHANDLUNG VON MULTIPLEM MYELOM

(57) Abstract: The subject matter of the invention is a complex of delphinidin and a sulfoalkyl ether β -cyclodextrin for use as a medicinal drug, in particular in the treatment of multiple myeloma.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist ein Komplex aus Delphinidin und einem Sulfoalkylether- β -Cyclodextrin zur Verwendung als Medikament, insbesondere bei der Behandlung von multiplem Myelom.



WO 2014/060548 A1

5

10 **Anthocyanidin-Komplex zur Behandlung von multiplem Myelom**

Die Erfindung betrifft einen Komplex aus einem Anthocyanidin und einem Sulfoalkylether- β -Cyclodextrin sowie Zusammensetzungen umfassend Anthocyanidin oder dessen Salze als
15 Medikament zur Behandlung von Krebs.

Anthocyanidine sind zymochrome Farbstoffe mit antioxidativen Eigenschaften, die in den meisten höheren Landpflanzen vorkommen. Anthocyanidine sind zuckerfrei (Aglycone) und
20 eng verwandt mit den zuckerhaltigen Anthocyanen (Glycoside), die beide unter den Oberbegriff der Anthocyane fallen.

Multiples Myelom ist eine Entartung von Plasmazellen. Plasmazellen sind Zellen des Immunsystems, die Antikörper für
25 den Kampf mit Krankheiten und Infektionen produzieren. Diese Zellen werden durch den Blutkreislauf unter anderem in das Knochenmark transportiert, sammeln sich dort an und verursachen im gesunden Gewebe permanenten Schaden, der sich symptomatisch durch Knochenbrüche, erhöhten Kalziumspiegel (Hyperkalzämie) oder auch Nierenversagen bemerkbar
30 macht. Die Ursache der Knochenschädigungen liegt in der schnellen Proliferation der Myelomzellen und Freisetzung des Osteoklastenaktivators IL-6, der die für die Knochen-
substanzresorption verantwortlichen Osteoklasten aktiviert,
35 was im Ergebnis zu einer Schädigung der Knochensubstanz und damit zu Knochenbrüchen führt. Da die Myelomzellen im Kno-

chenmark die normalen Zellen verdrängen, wird ebenfalls die Produktion normaler Blutzellen, insbesondere auch der weißen und roten Blutkörperchen beeinträchtigt, was zum einen das Infektionsrisiko erhöht und zum anderen zu Anämie führen kann. Auch die sinkende Zahl an Blutplättchen führt zu einer schlechteren Blutgerinnung. Die durchschnittliche Überlebenserwartung ist mit 6 Monaten bei betroffenen Patienten nach Feststellung der Krankheit schlecht, auch wenn sie mittels Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzellentransplantation um einige wenige Jahre verlängert werden kann. Es besteht somit akuter Bedarf an alternativen und wirksamen Mitteln und Behandlungsmethoden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein wirksames Medikament zur Behandlung von multiplem Myelom zur Verfügung zu stellen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch einen Komplex aus einem Anthocyanidin und einem Sulfoalkylether- β -Cyclodextrin gemäß den Ansprüchen 1-2. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen offenbart.

Zunächst seien einige im Rahmen der Erfindung verwendete Begriffe erläutert.

25

Der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammensetzung werden zur Behandlung eines Objekts oder Individuums eingesetzt, das am multiplen Myelom leidet. Der Begriff „Objekt“ umfasst lebende Tiere und Menschen. Der Begriff „Zusammensetzung umfassend mindestens ein Anthocyanidin“ schließt ein Anthocyanidin als solches ohne weitere Komponenten ein. Der Zweck dieser Behandlung ist die zumindest teilweise Abtötung oder Neutralisierung der Myelomzel-

len. „Neutralisation“ und „Abtötung“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung die zumindest teilweise Zerstörung oder Auflösung oder Inaktivierung oder Verhinderung der Vermehrung von Myelomzellen. „Multiples Myelom“ ist ein

5 Krebs von Plasmazellen. Die Stadien des multiplen Myeloms können mittels des Internationalen Systems der Stadien (International Staging System, ISS) ermittelt werden. Dem ISS liegen die Beurteilung von Bluttestergebnissen in Bezug auf β_2 -Mikroglobulin (β_2 -M) und Albumin zugrunde, welche beide

10 in Kombination miteinander die zuverlässigste Prognosesicherheit für das multiple Myelom im Vergleich zu anderen Testfaktoren gewähren. Die Kriterien für die Festlegung der verschiedenen Stadien entsprechend dem ISS für Myelom sind für das Stadium I: β_2 -M < 3,5 mg/dL und Albumin \geq 3,5 g/dL,

15 für das Stadium II: β_2 -M < 3,5 mg/dL oder β_2 -M 3,5–5,5 mg/dL und Albumin < 3,5 g/dL und für das Stadium III: β_2 -M > 5,5 mg/dL. Die Stadien des multiplen Myeloms werden üblicherweise in eine der verschiedenen Myelomkategorien klassifiziert. Das multiple Myelom kann asymptomatisch oder

20 symptomatisch sein. Bei asymptomatischen Myelompatienten sind keine Beeinträchtigungen oder Symptome der Organe und Gewebe erkennbar. Durch Myelom verursachte Beeinträchtigungen der Organe oder Gewebe schließen Hyperkalzämie, beeinträchtigte Nierenfunktion, Anämie und Knochenverletzungen

25 ein. Das asymptomatische Myelom schließt das schwelende multiple Myelom (smoldering multiple myeloma, SMM) und Stadium I des multiplen Myeloms ein. SMM ist durch monoklonales Protein und eine leichte Erhöhung von Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert. Das indolente multiple Myelom

30 (indolent multiple myeloma, IMM) ist durch geringe Mengen an monoklonalem Protein und eine erhöhte Zahl an Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert. Patienten mit multiplem Myelom werden ebenfalls durch Ihren Krankheitsstatus cha-

rakterisiert. Der Krankheitsstatus wird basierend auf der Frage, ob der Patient bereits eine Therapie erhalten hat, und wenn ja, mit welchem Ergebnis, determiniert. Patienten mit erneuter oder wiederholter Diagnose der Krankheit sind
5 Individuen im Sinne vorliegender Erfindung, die am Myelom leiden und bereits behandelt wurden. Patienten, die bereits eine Therapie erhalten haben, fallen in verschiedene nachfolgend genannte Klassen. Ansprechende Krankheit (responsive disease): bezieht sich auf Myelom, das auf die Therapie
10 derart anspricht, dass der M-Proteinlevel um mindestens 50% absinkt; Stabile Krankheit (stable disease): bezieht sich auf Myelom, das auf die Behandlung nicht anspricht (d.h. es wird keine Absenkung des M-Proteinlevels um 50% erreicht), aber nicht weiter fortschreitet, d.h. keine Verschlimmerung
15 eintritt; Fortschreitende Krankheit (progressive disease): bezieht sich auf aktives Myelom das sich verschlimmert, d.h. ein Anstieg des M-Proteinlevels und stärkere Beeinträchtigungen der Organe und Gewebe. In den meisten Fällen können die nachfolgend genannte Rückfallkrankheit und/oder
20 unempfindliche Krankheit ebenfalls als progressive Krankheit eingeordnet werden. Rückfallkrankheit (relapsed disease): bezieht sich auf Myelom, das zunächst auf eine Therapie anspricht aber danach erneut in das Progressionsstadium zurückfällt. Unempfindliche Krankheit (refractory disease):
25 bezieht sich sowohl auf Myelom, das auf die Erstbehandlungstherapie nicht anspricht als auch auf Rückfallmyelom, das nicht mehr auf nachfolgende Behandlungen anspricht. Bei letzterem kann man ebenfalls von einer Rückfallkrankheit sprechen.

30

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf Verfahren zur Behandlung eines an multiplem Myelom leidenden Objekts, wobei dem Objekt eine therapeutisch wirksame Menge des er-

findungsgemäßen Komplexes oder der erfindungsgemäßen Zusammensetzung verabreicht wird. Das multiple Myelom kann in allen der oben beschriebenen Stadien, Kategorien oder Krankheitsstatus behandelt werden. Der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammensetzung können allein oder in Kombination mit mindestens einem anderen therapeutischen Mittel zur Verringerung eines oder mehrerer Symptome des multiplen Myeloms verabreicht werden. Der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammensetzung können gleichzeitig mit dem anderen therapeutischen Mittel, welches Bestandteil derselben Zusammensetzung sein kann oder in einer anderen Zusammensetzung bereitgestellt wird, verabreicht werden. Alternativ kann der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammensetzung vor oder nach der Verabreichung des anderen therapeutischen Mittels verabreicht werden. Der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann über den gleichen oder einen anderen Verabreichungsweg wie das andere therapeutische Mittel verabreicht werden. Die therapeutischen Mittel können chemotherapeutische Mittel, unterstützende therapeutische Mittel, oder eine Kombination davon sein. „Chemotherapeutisches Mittel“ ist ein Mittel, dass für Krebszellen toxisch ist. Beispiele für chemotherapeutische Mittel, welche im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verwendung finden können, schließen Bortezomib (Velcade®, Millennium), Melphatan, Prednison, Vincristin, Carmustin, Cyclophosphamid, Dexamethason, Thalidomid, Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Cytarabin ein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammensetzung in Kombination mit Bortezomib (Velcade®) verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der erfindungsgemäße Komplex oder die erfin-

zungsgemäße Zusammensetzung in Kombination mit Melphalan verwendet. Ein „unterstützendes therapeutisches Mittel“ ist ein Mittel, das verwendet wird, um die Symptome und Komplikationen des multiplen Myeloms zu mindern. Beispiele für

5 unterstützende therapeutische Mittel sind Bisphosphonate, Wachstumsfaktoren, Antibiotika, Diuretika und Analgetika. Beispiele für Antibiotika schließen schwefelhaltige Drogen, Penicilline (z.B. Benzylpenicillin, P-Hydroxybenzylpenicillin, 2-Pentenylpenicillin, N-Heptylpenicillin, Phenoxymethylpenicillin, Phenethicillin, Methicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Flucloxacillin, Nafcillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cyclacillin, Carbenicillin, Ticarcillin, Piperacillin, Azlocillin, Meclocillin, Mecillinam, Amdinocillin), Cephalosporin und deren Derivate (z.B. Cephalothin, Cephapirin, Cephacetrile, Cephazolin, Cephalexin, Cephandine, Cefadroxil, Cefamandol, Cefuroxime, Ceforanide, Cefoxitin, Cefotetan, Cefaclor, Cefotaxime, Ceftizoxime, Ceftriaxone, Ceftazidime, Moxalactam, Cefoperazone, Cefixime, Ceftibuten und Cefprozil),

20 Oxolinsäure, Amifloxacin, Temafloxacin, Nalidixsäure, Piro-midsäure, Ciprofloxacin, Cinoxacin, Norfloxacin, Perfloxacin, Rosaxacin, Ofloxacin, Enoxacin, Pipemidsäure, Sulbactam, Clavulinsäure, β -Bromopenicillansäure, β -Chloropenicillansäure, 6-Acetylmethylen-Penicillansäure, Cephoxazol, Sultampicillin, Formaldehydhudratester des Adinocillins und Sulbactams, Tazobactam, Aztreonam, Sulfazethin, Isosulfazethin, Norcardicins, m-Carboxyphenylphenylacetamidomethylphosphonat, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, Demeclocyclin, Doxycyclin, Methacyclin and Minocyclin ein. Beispiele für Bisphosphonate schließen Etidronat (Didronel), Pamidronat (Aredia), Alendronat (Fosamax), Risedronat (Actonel), Zoledronat (Zometa), Ibandronat und (Boniva) ein. Beispiele für Diuretika

30

schließen Thiazidderivative wie Amilorid, Chlorothiazid, Hydrochlorothiazid, Methylchlorothiazid und Chlorothalidon ein. Beispiele für Wachstumsfaktoren schließen Granulozytenkolonien-stimulierende Faktoren (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), Granulozythen-Makrophagenkolonien-stimulierende Faktoren (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), Makrophagenkolonien-stimulierende Faktoren (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), Multikolonien-stimulierende Faktoren, Erythropoietin, Thrombopoietin, Oncostatin M und Interleukine ein. Beispiele für Analgetika schließen Opiate (z.B. Morphin), COX-2 Inhibitoren (z.B. Rofecoxib, Valdecoxib und Celecoxib), Salicylate (z.B. ASPIRIN, Cholinmagnesiumtrisalicylat, Salsalat, Dirunisal und Natriumalicylat), Propionsäurederivate (z.B. Fenopropfenacalcium, Ibuprofen, Ketoprofen, Naproxen und Naproxennatrium), Indoleacensäurederivate (z.B. Indomethacin, Sulfindac, Etodalac und Tolmetin), Fenamate (z.B. Mefenamsäure und Meclofenamat), Benzothiazinderivate oder Oxicame (z.B. Mobic oder Piroxicam) oder Pyrromilchsäure (z.B. Ketorolac) ein.

Der Begriff „Behandlung“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass 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).

In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Objekt, das
5 mit dem erfindungsgemäßen Komplex oder der erfindungsgemä-
ßen Zusammensetzung und gegebenenfalls weiteren therapeuti-
schen Mitteln behandelt wird, einer Strahlentherapie unter-
zogen und/oder für eine Stammzellentherapie vorbereitet.
Der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zu-
10 sammensetzung kann vorzugsweise in Kombination mit optiona-
len weiteren therapeutischen Mitteln im Rahmen einer Induk-
tionstherapie verwendet werden, um die Tumorbeltung im
Vorfeld der Stammzellentransplantation zu verringern, aber
auch im Rahmen der Stammzellentransplantation und/oder nach
15 einer Stammzellentransplantation.

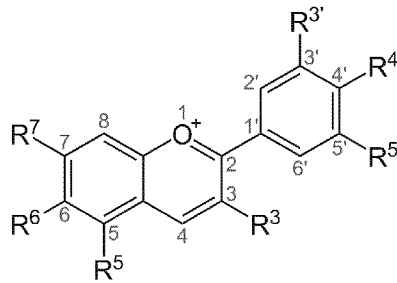
Der erfindungsgemäße Komplex oder die erfindungsgemäße Zu-
sammensetzung werden vorzugsweise als pharmazeutische Zu-
sammensetzung bereitgestellt und verabreicht. Der Begriff
20 „pharmazeutische Zusammensetzung“ umfasst ein oder mehrere
Wirkstoffe und ein oder mehrere inerte Inhaltstoffe, die
als Träger für den Wirkstoff bzw. die Wirkstoffe fungieren.
Die pharmazeutischen Zusammensetzungen erlauben es, den er-
findungsgemäßen Komplex oder die erfindungsgemäße Zusammen-
25 setzung oral, parenteral, einschließlich subkutan, intra-
muskulär und intravenös, ophthalmisch, pulmonal oder nasal
zu verabreichen. Eine parenterale Verabreichungsform kann
beispielsweise eine Lösung, Suspension oder Dispersion
sein. Eine ophthalmische, pulmonale oder nasale Verabrei-
30 chungsform kann beispielsweise ein Aerosol, Lösung, Suspen-
sion oder Dispersion sein. Entsprechende Techniken für die
Formulierung und Verabreichung sind aus dem Stand der Tech-
nik bekannt, siehe beispielsweise „Remington's Pharmaceuti-

cal Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Zum Beispiel können die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Komplexe einem Subjekt intravenös mittels eines pharmazeutisch akzeptablen Trägers (z.B. physiologische Salzlösung) verabreicht werden. Für die Injektion 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, einschließlich der intravenösen, subkutanen, intramuskulären und intraperitonealen Verabreichung, kommt ebenfalls eine wässrige oder ölige Lösung oder eine Feststoffformulierung in Betracht. Der Anteil des aktiven Wirkstoffs in der pharmazeutischen 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.

„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 freigeben kann. Salze der Zusammensetzungen und Komplexe der vorliegenden Erfindung können von anorganischen oder organischen Säuren und Basen abgeleitet sein.

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

„Anthocyanidine“ weisen die nachfolgend wiedergegebene Grundstruktur auf.



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

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

Sulfoalkyethergruppen werden bei Cyclodextrinen im Stand der Technik zur Erhöhung der Hydrophilie beziehungsweise Wasserlöslichkeit eingesetzt. Sulfoalkylethergruppen tragen in besonderem Maße zur Erhöhung der Stabilität des Komplexes aus Anthocyanidinen und dementsprechend substituierten β -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 Feststoff formuliert werden, wie unten noch näher gezeigt werden wird.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Komplexierung mit einem Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SEB- β -CD). Ein den Schutzbereich nicht beschränkender Erklärungsversuch

5 hierfür ist, dass die negativ geladenen Sulfobutyleinheiten mit den positiv geladenen Anthocyanidinen elektrostatisch wechselwirken und unter den Alkylgruppen die Butylgruppe die optimale Länge besitzt, um sterisch eine entsprechende Wechselwirkung zu ermöglichen.

10

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. Geeignete Sulfobutylether- β -Cyclodextrine mit einem

15 mittleren Substitutionsgrad von 6 bis 7 sind 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.

20

Die erfindungsgemäß in reiner, Salz- oder komplexierter Form verwendeten Anthocyanidine sind bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aurantinidin, Cyanidin, Delphinidin, Europinidin, Luteolinidin, Pelargonidin, Mal-

25 vidin, Peonidin, Petunidin und Rosinidin. Die chemische Struktur entspricht der oben wiedergegebenen Formel I mit dem folgenden Substitutionsmuster

	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷
Aurantidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Cyanidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidin	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH

Luteolinidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃

Besonders bevorzugt ist im Rahmen der Erfindung Delphinidin.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ferner eine wässrige Lösung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Komplexes zur Verwendung als Medikament, insbesondere zur Behandlung von multiplem Myelom.
- 10 Die Herstellung des erfindungsgemäßen Komplexes sowie einer entsprechend wässrigen Lösung umfasst die folgenden Schritte:
- a) Herstellen einer wässrigen Lösung des Sufoalkylether- β -Cyclodextrins,
 - 15 b) Zugabe des Anthocyanidins und Vermischen zur Herstellung des Komplexes.

In Schritt a) wird bevorzugt eine wässrige Lösung hergestellt, die 5 bis 10 Gew.-% des verwendeten Cyclodextrins

20 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 Anthocyanidins, bevorzugt Delphinidins, auf einen pH-Wert von 7 oder weniger, vorzugsweise 6 oder weniger, weiter vorzugsweise 5

25 oder weniger, weiter vorzugsweise 4 bis 5, eingestellt wird. Es hat sich gezeigt, dass bei diesem pH-Wert sich ei-

ne höhere Konzentration des Komplexes in wässriger Lösung einstellen lässt.

Die Konzentration des Anthocyanidins berechnet als Chlorid,
5 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
10 pH-Wert zwischen 4 und 5.

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, insbesondere zur Behandlung von
20 multiplem Myelom, der erfindungsgemäß erhältlich ist durch Entfernen des Lösungsmittels aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen wässrigen Lösung. Das Entfernen kann bevorzugt durch Gefriertrocknung (Lyophilisation) erfolgen.
25 Sowohl die erfindungsgemäße wässrige medikamentöse Lösung als auch der medikamentöse Feststoff besitzen eine hohe Lagerstabilität.

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

I. Herstellung eines Komplexes aus dem Anthocyanidin Delphinidin und Cyclodextrinen

1. Eingesetzte Materialien:

5

Die nachfolgenden Cyclodextrine werden verwendet:

α -CD	ID No: CYL-2322
β -CD	ID No: CYL-3190
γ -CD	ID No: CYL-2323
(2-Hydroxypropyl)- β -CD	ID No: L-043/07
Sulfobutylether- β -CD	ID No: 47K010111

10 Delphinidinchlorid wurde von der Firma Extrasynthese erworben.

2. Bestimmung des Delphinidingehalts

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

Gereinigtes Wasser
20 Methanol für die Chromatographie
Ameisensäure, p. a.
1 M Salzsäure als volumetrische Lösung.

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

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:

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

5

Stoppzeit: 35 min

Nachlaufzeit (posttime): 8 min

Flussrate: 1 ml/min

10

Injektionsvolumen: 20 µl

Säulentemperatur: 30°C +/- 2°C

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

Integrator: Fläche

15

Lösungen und Probenvorbereitung:

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

20

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.

30

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 erfindungsgemäß hergestellter Feststoffe (Herstellung siehe weiter unten) wurde 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.

15

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

20

Beispiel 1: Komplexierung von Delphinidin mit SBE- β -CD

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

25

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

30

Je 5 ml der wässrigen Cyclodextrinlösungen und von reinem Wasser wurden in Glaskolben gefüllt. Anschließend wurde ein

Überschuss Delphinidinchlorid zugegeben. Die erforderliche Überschussmenge war 10 mg für die Lösungen von α -, β - und γ -Cyclodextrin und 15 mg für die Lösungen von HPBCD (2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin) und SBE- β -CD.

5

Die Suspensionen wurden für 20 h bei 30° C im Dunkeln gerührt. Anschließend wurde filtriert durch einen Membranfilter mit 0,22 μ m Porengröße.

10 Die erzielbaren Löslichkeiten sind in der nachfolgenden Tabelle 1 wiedergegeben.

Cyclodextrin	Cyclodextrin-Konzentration	Delphinidinchlorid
–	0	0.07 mg/ml
α -CD	10 %	0.14 mg/ml
β -CD	2 %	0.05 mg/ml
γ -CD	10 %	0.21 mg/ml
HPBCD	10 %	0.19 mg/ml
SBE- β -CD	10 %	0.66 mg/ml

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

Beispiel 2: Einfluss des pH-Wertes

20 In diesem Beispiel wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Löslichkeit eines Delphinidin-SBE- β -CD in wässriger Lösung untersucht. Nach der Vorschrift von Beispiel 1 wurden wässrige Lösungen von SEB- β -CD hergestellt, diese Lösungen jedoch mit 1 M HCL auf die in Tabelle 2 genannten sauren pH-
 25 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.

5

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 Delphinidinschlorids sich etwa um den Faktor 3 gegenüber einem neutralen pH-Wert erhöht.

10

Beispiel 3 Herstellung eines erfindungsgemäßen Feststoffs

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

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

Beispiel 3.1: Delphinidin/SBE- β -CD

20 5 g SBE- β -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 μ m
25 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- β -CD gemäß Beispiel 3.1.

10 **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 15 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.

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

Beispiel 4: Stabilitätsversuche

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

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

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

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

- 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

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

5 Dabei wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

Gereinigtes Wasser

Methanol für die Chromatographie

Armeisensäure, p. a.

10 1 M Salzsäure als volumetrische Lösung.

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 770 ml, Methanol 230 ml, Armeisensäure 10 ml

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

Folgendes Gradientenprogramm wurde verwendet:

20

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

Stoppzeit: 25 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

Integrator: Fläche

5 Lösungen und Probenvorbereitung:

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

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

Kalibrierungslösung: Eine Referenzlösung von Delphinidin wurde durch Einwiegen von 10 mg Delphinidinchlorid in einen
15 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.

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

25 Herstellung der Prüflösungen:

Zur Bestimmung des Delphinidingehalts einer erfindungsgemäßen wässrigen Lösung wurden Delphinidin/SBE- β -CD des Beispiels 3.1 (erfindungsgemäß) und Delphinidin (Vergleichs-
30 beispiel 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 Raum-

temperatur hergestellt und anschließend bei 37°C im Dunkeln in verschlossenen Violen gelagert.

Nach 1, 2, 3 und 4 h wurde der Delphinidingehalt bestimmt.

- 5 Die nachfolgende Tabelle gibt den ermittelten Gehalt als Prozentanteil der oben genannten Startkonzentration an.

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

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

15 **II. Wirkung des Anthocyanidin Delphinidin und des Delphinidin-SBE- β -CD Komplexes auf Myelomzellen *in-vitro***

1. Testlinie und Versuchsaufbau

- 20 In den *in-vitro* Versuchen nachfolgend beschriebener BLI(= biolumineszenz imaging)-Messung und FACS (= fluorescence activated cell sorting)-Analyse wurde die Wirkung des Delphinidin+Sulfobutylether- β -Cyclodextrin Komplexes (nachfolgend Delphinidin+SBEBCD) und Delphinidin
- 25 auf die Maus-Myelomzelllinie MOPC-315 (ATTC Katalog-Nr. TIB-23) untersucht. Die verwendeten Verfahren (BLI-Messung und FACS-Analyse) sind dem Fachmann aus Patent-

und Fachliteratur bekannt, beispielsweise aus dem FACS-Basispatent DE 1815352 C1.

2. BLI-Messung

5

Die Ergebnisse der BLI-Messung sind in den Figuren 1 bis 11 dargestellt und geben Aufschluss über die Anzahl der die Behandlung überlebenden Zellen.

10

In einem ersten Versuch wurde die Wirkung von Delphinidin+SBEB CD und SBEB CD untersucht. Zuerst wurden sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Zellen in 100 µl RPMI-1640 Zellmedium in einer 24-Well-Polystyrol-Zellkulturschale vorgelegt (4000 Zellen/Well). Als Kontrolle diente steriles RPMI-1640. Anschließend wurde in 100 µl RPMI-1640 gelöstes Delphinidin+SBEB CD bzw. SBEB CD aus einer zuvor erstellten Verdünnungsreihe gemäß Figur 3 (jeder Messwert tripliziert) hinzugefügt und die Zellkulturschale für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, das Medium im Anschluss durch reines RPMI-1640 (d.h. frisches Medium ohne SBEB CD oder Delphinidin+SBEB CD) ausgetauscht und erneut für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, dessen visuelle Ergebnis in den Figuren 1 (Delphindin+SBEB CD), 2 (SBEB CD) und 5 (Kontrolle) dargestellt ist.

25

Die Anzahl der lebenden Zellen im Well korreliert mit der pro Well gemessenen Zahl emittierter Photonen bei der BLI-Messung, was sich in den BLI-Figuren 1, 2 und 5 durch entsprechende Farben (rot = viel Signal/wenig emittierte Photonen; blau = viel Signal/viel emittierte Photonen) ausdrückt. Figur 1 zeigt, dass mit zunehmender Dosisstärke von Delphinidin+SBEB CD die Toxizität zunimmt, bis hin zur vollständigen Tötung aller Zellen,

30

während SBEB CD auch in hohen Dosen kaum toxisch ist, wie sich aus Figur 2 ergibt (Die mit „X“ gekennzeichnete Well in letzter Reihe in Figur 2 ist mit Blick auf die benachbarten Wells mit gleichen Konzentrationen als offensichtlicher Fehlversuch ausgeschlossen worden). Figur 6 fasst die in den Figuren 1 (Delphinidin+SBEB CD) und 2 (SBEB CD) visuell dargestellten Versuchsergebnisse noch einmal prozentual in Bezug gesetzt auf die Kontrolle (Fig. 5: nur Medium) zusammen.

Mit gleichem Versuchsaufbau wurde die Wirkung von Delphinidin als solches untersucht. Dafür wurden ebenfalls sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Zellen in 100 µl RPMI-1640 Zellmedium in einer 24-Well-Polysterol-Zellkulturschale vorgelegt (4000 Zellen/Well). Anschließend wurden 100 µl gelöstes Delphindinchlorid (gelöst in 10% DMSO und 90% H₂O) in Konzentrationen gemäß Figur 9 (jeder Messwert tripliziert) hinzugefügt und die Zellkulturschale für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, das Medium im Anschluss durch reines RPMI-1640 (d.h. frisches Medium ohne Delphinidin) ausgetauscht und erneut für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, dessen visuelles Ergebnis in den Figuren 8 (Delphindinchlorid) und 10 (Kontrolle: steriles RPMI-1640) dargestellt ist. Um die Wirkung von DMSO auf die Zellen kontrollieren zu können, wurden zwei ergänzende Kontrollen hinzugefügt und ebenfalls mitanalysiert [Figur 8 und 9 jeweils letzte Well-Reihe nach Zugabe von 100 µl „DMSO hoch“ (100 µg/ml DMSO) und von 100 µl „DMSO gering“ (50 µg/ml DMSO)]. Figur 11 fasst die in Figur 8 (Delphindinchlorid) visuell dargestellten Versuchsergebnisse noch einmal prozentual in Bezug gesetzt auf die Kontrolle (Fig. 10: nur Medium) zusammen.

3. FACS-Analyse

Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in den Figuren 12 (Delphinidin+SBEBCD), 13 (SBEBCD), 14 (Delphinidinchlorid), 15 (Delphinidin+SBEBCD und SBEBCD in Bezug gesetzt zur Kontrolle) und 16 (Delphinidinchlorid, „DMSO hoch“ und „DMSO gering“ jeweils in Bezug gesetzt zur Kontrolle) zusammenfassend dargestellt und geben Aufschluss über die Anzahl der toten Zellen, die für die FACS-Analyse zuvor mit Propidiumiodid angefärbt wurden.

Die Versuchsergebnisse aus der BLI-Messung und der FACS-Analyse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Delphinidin+SBEBCD und Delphinidin (Delphinidinchlorid) töten humane Myelomzellen *in-vitro*.
- Diese Wirkung nimmt dosisabhängig zu, wobei in höheren Dosen nahezu alle Zellen getötet werden.

Patentansprüche

1. Komplex aus Delphinidin und einem Sulfoalkylether- β -Cyclodextrin zur Verwendung als Medikament.
5
2. Komplex nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung von multiplem Myelom.
3. Komplex zur Verwendung nach einem der vorangehenden
10 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Sulfoalkylether- β -Cyclodextrin ein Sulfobutylether- β -Cyclodextrin ist.
4. Komplex zur Verwendung nach einem der vorangehenden
15 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.
- 20 5. Komplex zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, dass das multiple Myelom ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus multiples Myelom Stadium I, multiples Myelom Stadium II, multiples Myelom Stadium III, asymptomatisches multiples Myelom, symptomatisches Myelom, vor
25 kurzem diagnostiziertes multiples Myelom, ansprechendes multiples Myelom, stabiles multiples Myelom, fortschreitendes multiples Myelom, rezidives multiples Myelom und refraktäres multiples Myelom.
- 30 6. Komplex zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche weiter umfassend eine effektive Menge mindestens eines Therapeutikums ausgewählt aus der Gruppe

bestehend aus Bortezomib, Melphalan, Prednison, Vincristin, Carmustin, Cyclophosphamid, Dexamethason, Thalidomid, Doxorubicin, Cisplatin, Etoposid und Cytarabin.

5

7. Komplex zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Verwendung bei der Behandlung von multiplem Myelom in einem Objekt, das einer Strahlentherapie und/oder einer Stammzellentransplantation unterzogen oder darauf vorbereitet wird.

10

8. Komplex zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche weiter umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

15

9. Komplex zur Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche in einer Formulierungsform zur Verabreichung in einer Form ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus oral, parenteral, einschließlich subkutan, intramuskulär und intravenös, ophthalmisch, pulmonal und nasal.

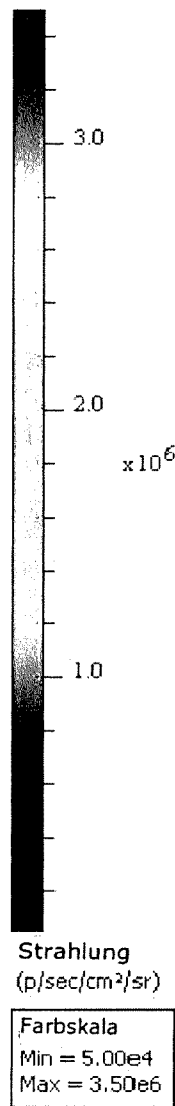
20

10. Komplex zur Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die orale Verabreichungsform eine Tablette oder Kapsel ist.

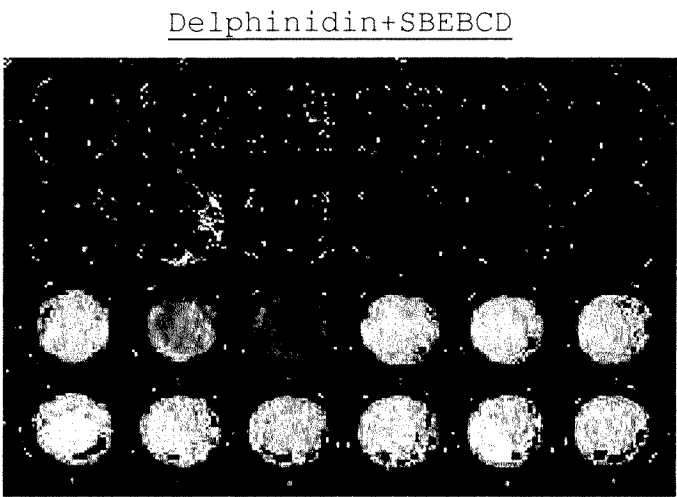
25

11. Komplex zur Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die parenterale Verabreichungsform eine Lösung, Suspension oder Dispersion ist.

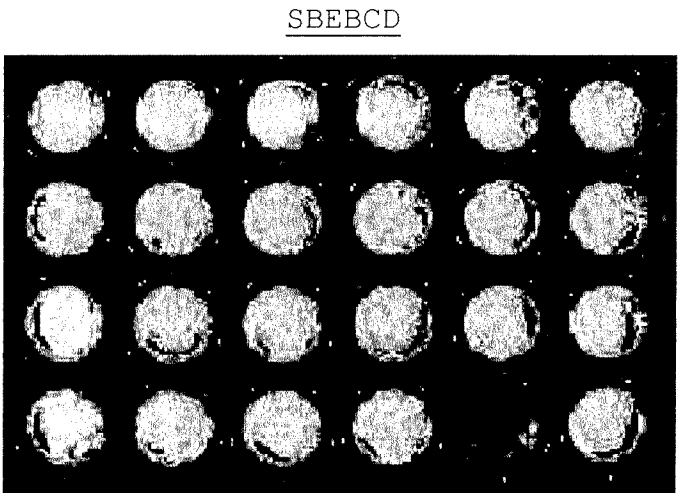
30 12. Komplex zur Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die ophthalmische, pulmonale oder nasale Verabreichungsform ein Aerosol, Lösung, Suspension oder Dispersion ist.



Figur 4



Figur 1



Figur 2

Plattenbelegung Delphinidin+SBEB CD (Fig. 1) und SBEB CD (Fig. 2) mit mg/ml

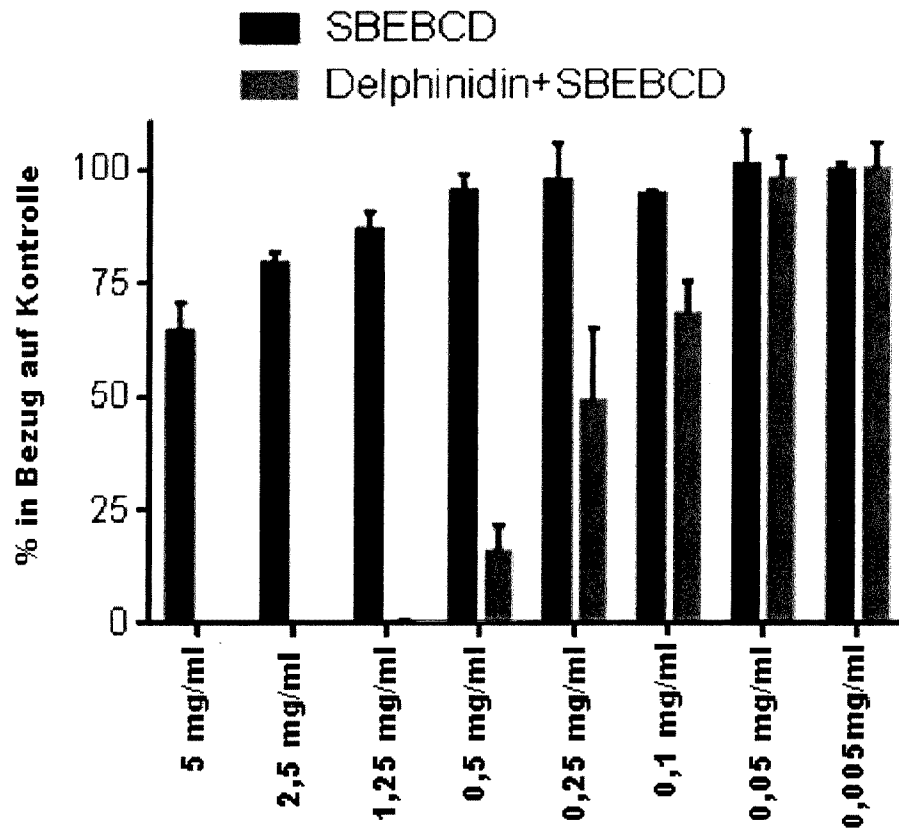
5	5	5	2,5	2,5	2,5
1,25	1,25	1,25	0,5	0,5	0,5
0,25	0,25	0,25	0,1	0,1	0,1
0,05	0,05	0,05	0,005	0,005	0,005

Figur 3

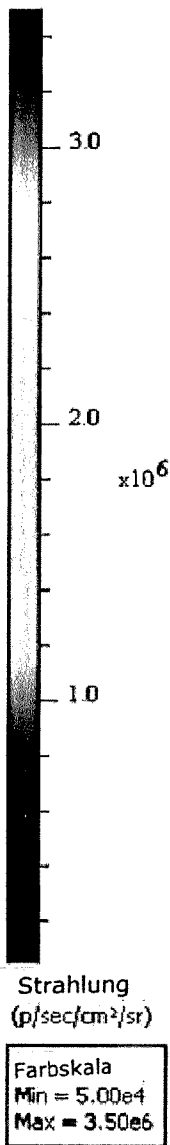
Kontrolle



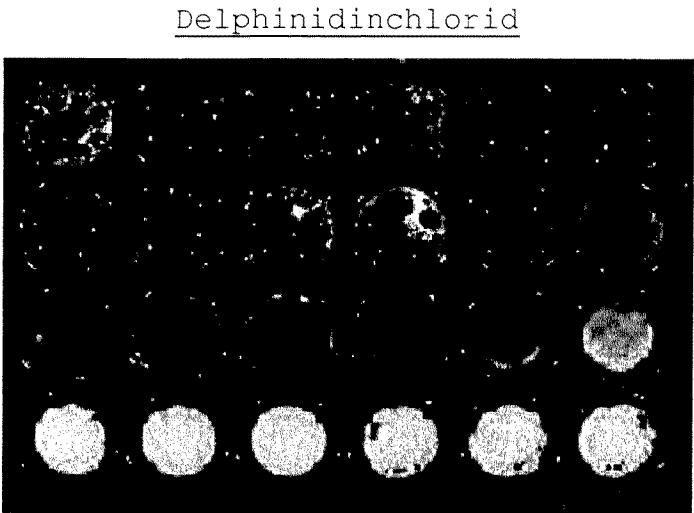
Figur 5



Figur 6



Figur 7

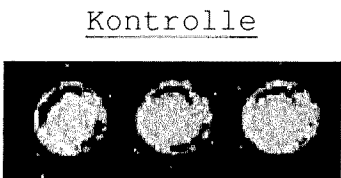


Figur 8

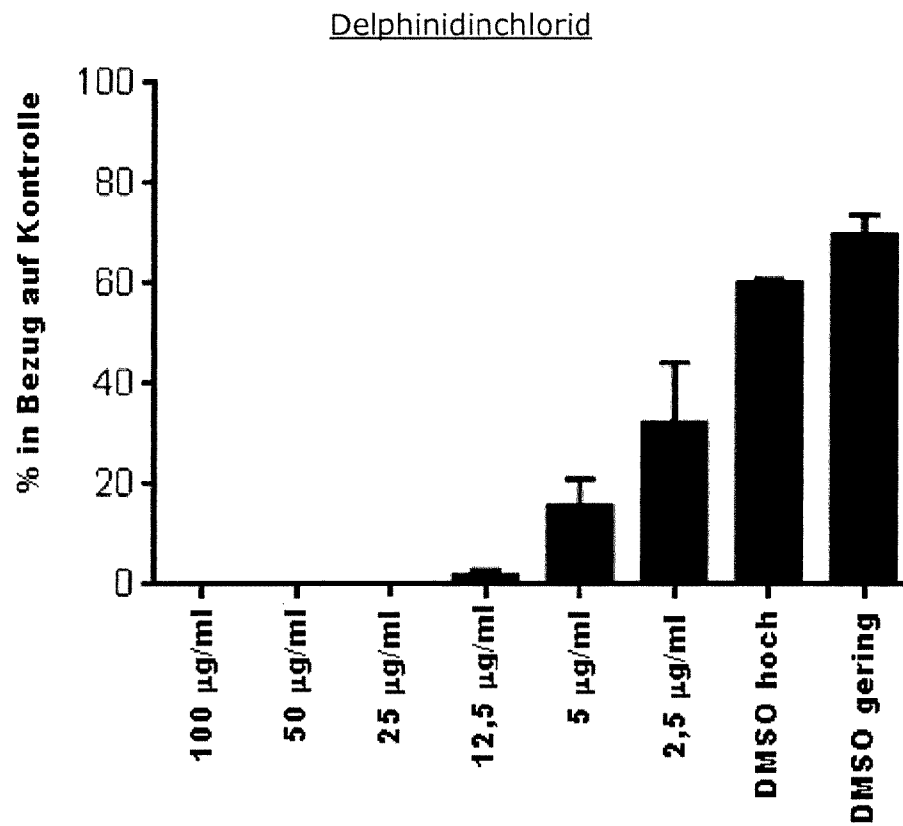
Plattenbelegung Delphinidinchlorid (Fig. 8)
mit mg/ml

100	100	100	50	50	50
25	25	25	12,5	12,5	12,5
5	5	5	2,5	2,5	2,5
DMSO hoch	DMSO hoch	DMSO hoch	DMSO gering	DMSO gering	DMSO gering

Figur 9

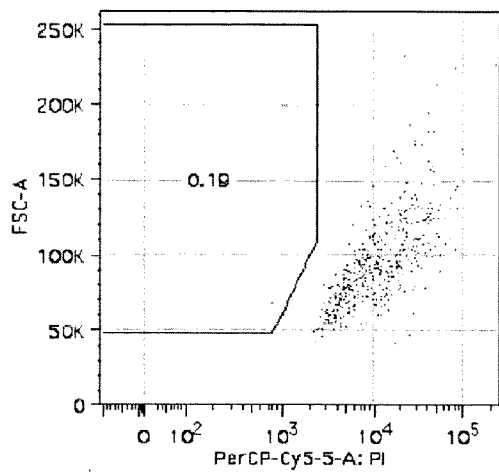
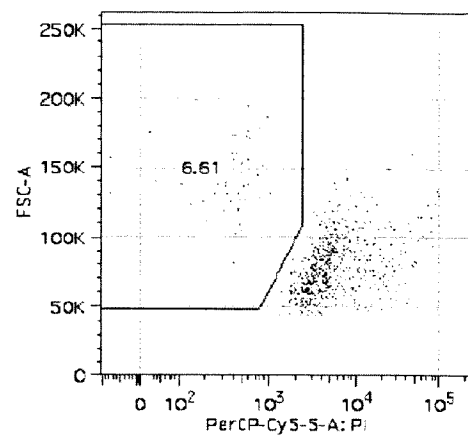
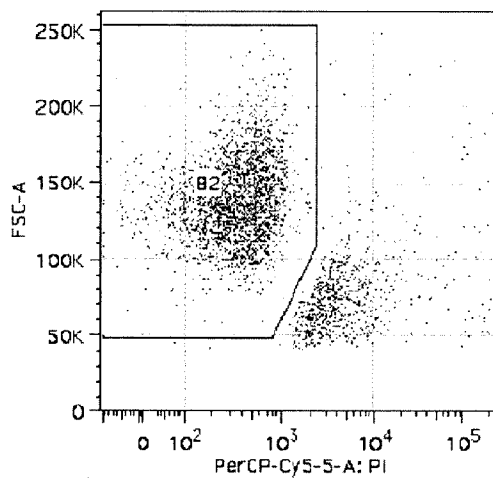
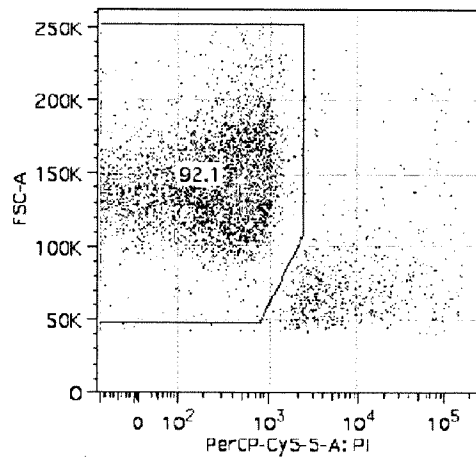
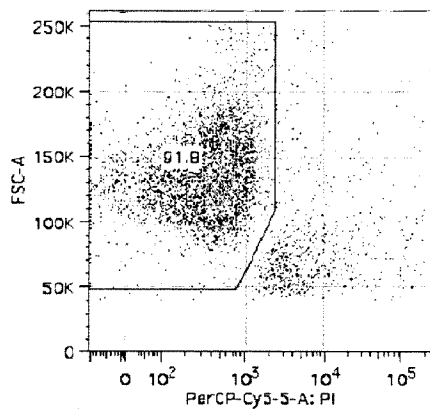


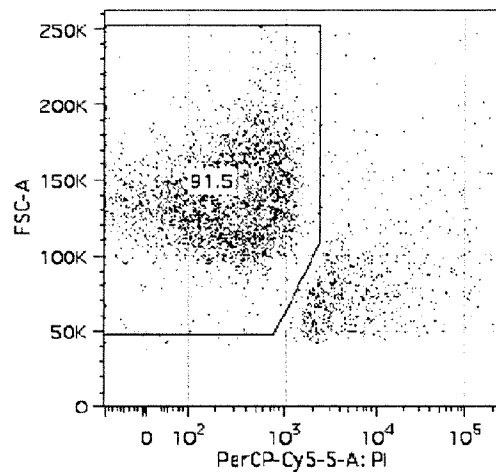
Figur 10



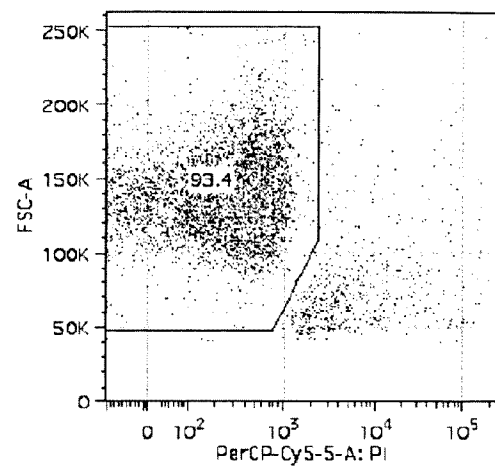
Figur 11

5/8

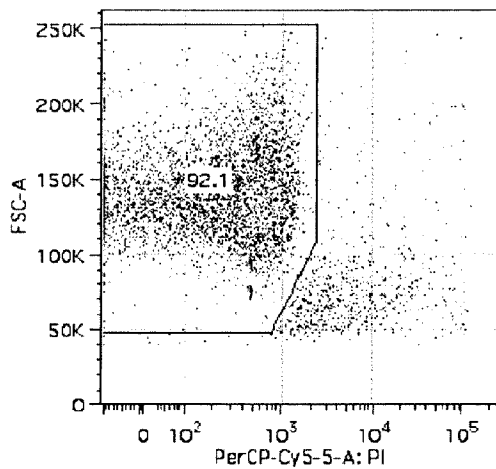
**5 mg/ml Delphinidin+SBEB CD****1,25 mg/ml****Delphinidin+SBEB CD****0,5 mg/ml Delphinidin+SBEB CD****0,005 mg/ml****Delphinidin+SBEB CD****Kontrolle****Figur 12**



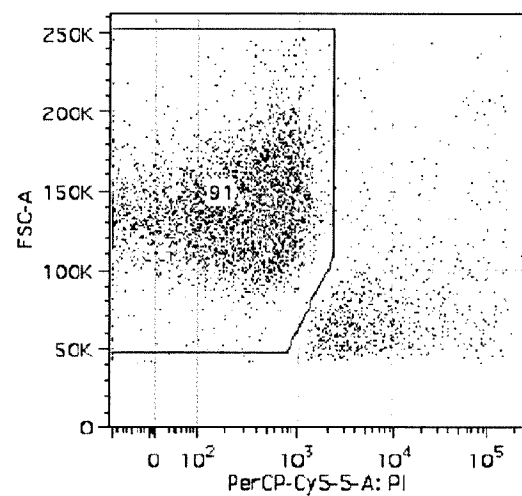
5 mg/ml SBEBCD



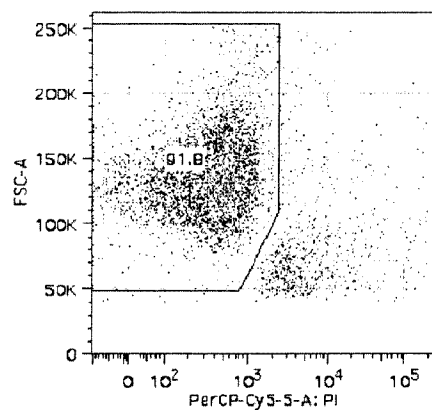
1,25 mg/ml SBEBCD



0,5 mg/ml SBEBCD

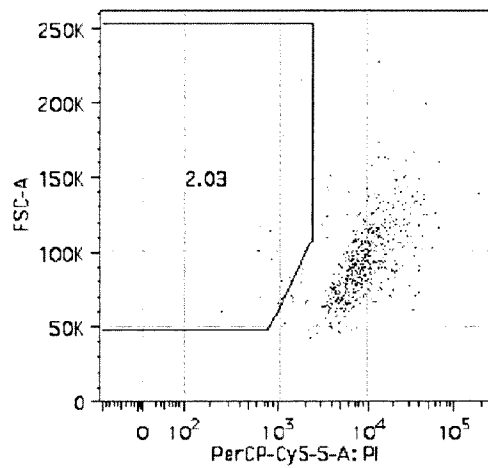


0,005 mg/ml SBEBCD

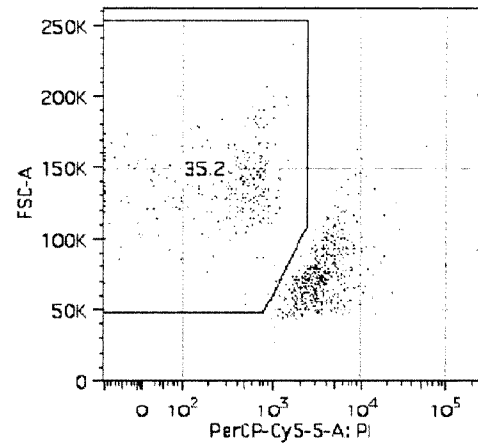


Kontrolle

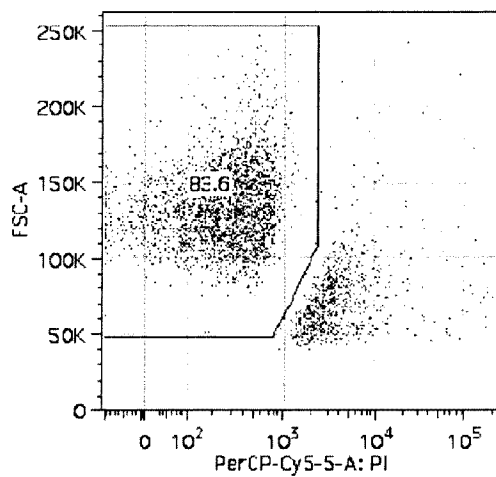
Figur 13



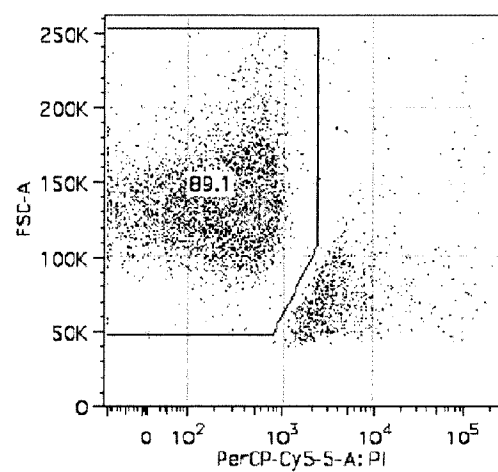
100 µg/ml Delphinidinchlorid



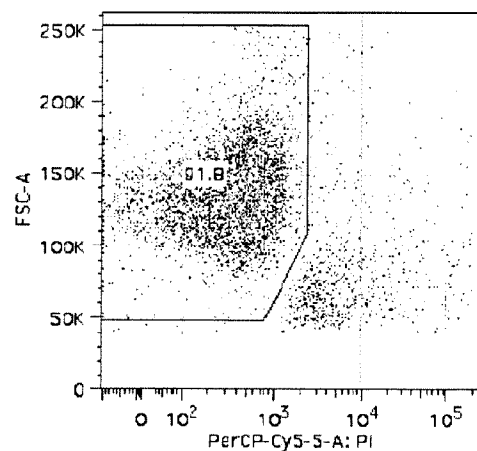
12,5 µg/ml
Delphinidinchlorid



5 µg/ml Delphinidinchlorid

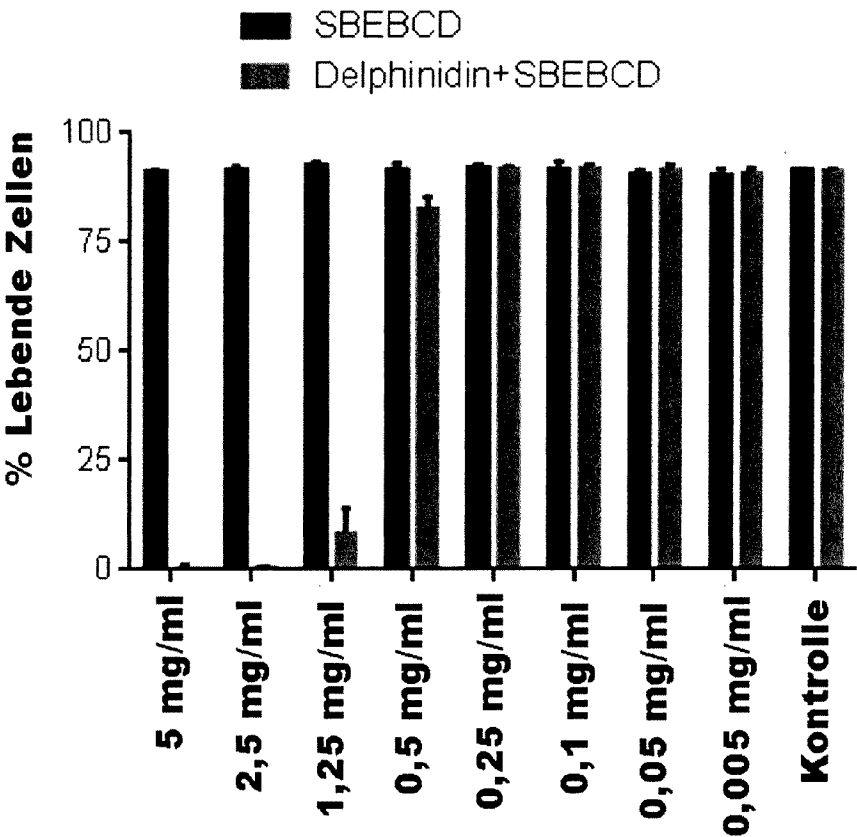


2,5 µg/ml Delphinidinchlorid



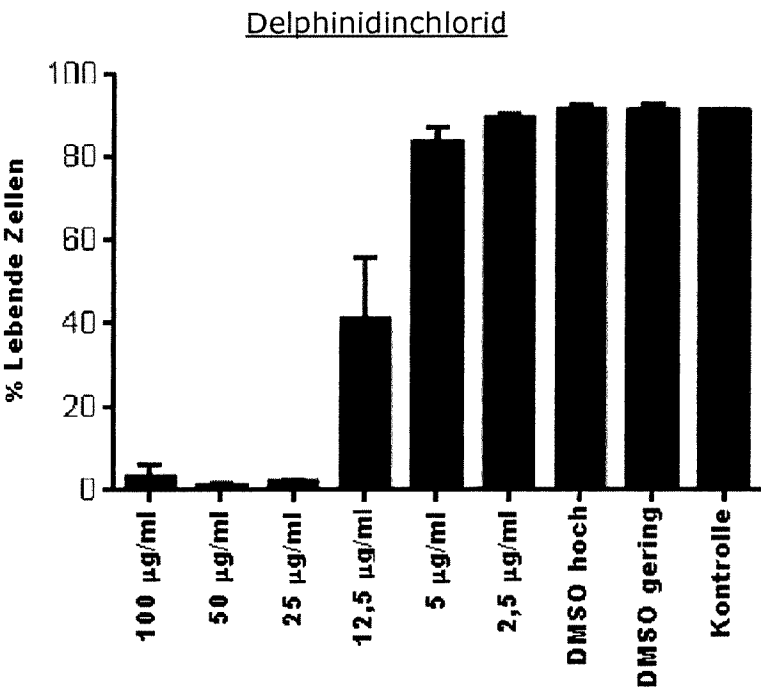
Kontrolle

Figur 14



Figur 15

5



Figur 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/071779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/7042 A61K47/40 A61P35/00
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/013880 A1 (MAGNUSON BERNADENE ANN [US] ET AL) 20 January 2005 (2005-01-20) page 1, paragraph 2 page 2, paragraphs 20, 24 page 3, paragraph 31 page 12, paragraph 134	1-12
A	----- KAMEI H ET AL: "SUPPRESSION OF TUMOR CELL GROWTH BY ANTHOCYANINS IN VITRO", CANCER INVESTIGATION, MARCEL DEKKER INC, US, vol. 13, no. 6, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 590-594, XP000995356, ISSN: 0735-7907 page 593; table 3 page 590, left-hand column, line 1 - right-hand column, line 6 ----- -/--	1-12



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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 2013

Date of mailing of the international search report

10/12/2013

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/EP2013/071779

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	WO 2013/144297 A1 (SAPIOTEC GMBH [DE]) 3 October 2013 (2013-10-03) the whole document examples 1,3.1, claims 1,2,3,5 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/071779

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005013880 A1	20-01-2005	US 2005013880 A1	20-01-2005
		US 2006159781 A1	20-07-2006

WO 2013144297 A1	03-10-2013	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. A61K31/7042 A61K47/40 A61P35/00
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2005/013880 A1 (MAGNUSON BERNADENE ANN [US] ET AL) 20. Januar 2005 (2005-01-20) Seite 1, Absatz 2 Seite 2, Absätze 20, 24 Seite 3, Absatz 31 Seite 12, Absatz 134 -----	1-12
A	KAMEI H ET AL: "SUPPRESSION OF TUMOR CELL GROWTH BY ANTHOCYANINS IN VITRO", CANCER INVESTIGATION, MARCEL DEKKER INC, US, Bd. 13, Nr. 6, 1. Januar 1995 (1995-01-01) , Seiten 590-594, XP000995356, ISSN: 0735-7907 Seite 593; Tabelle 3 Seite 590, linke Spalte, Zeile 1 - rechte Spalte, Zeile 6 ----- -/-	1-12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



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

2. Dezember 2013

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/12/2013

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.
A,P	WO 2013/144297 A1 (SAPIOTEC GMBH [DE]) 3. Oktober 2013 (2013-10-03) das ganze Dokument Beispiele 1,3.1, Ansprüche 1,2,3,5 -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/071779

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2005013880	A1	20-01-2005	US	2005013880 A1	20-01-2005
			US	2006159781 A1	20-07-2006

WO 2013144297	A1	03-10-2013	KEINE		
