

(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

3. Oktober 2013 (03.10.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2013/144303 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A01N 25/22 (2006.01) A01P 1/00 (2006.01)

A01N 43/16 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/056722

(22) Internationales Anmeldedatum:

28. März 2013 (28.03.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

12002352.8 30. März 2012 (30.03.2012) EP

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

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

(74) Anwalt: GLAWÉ DELFS MOLLPARTNERSCHAFT
VON PATENT- UND RECHTSANWÄLTEN; Postfach
13 03 91, 20103 Hamburg, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

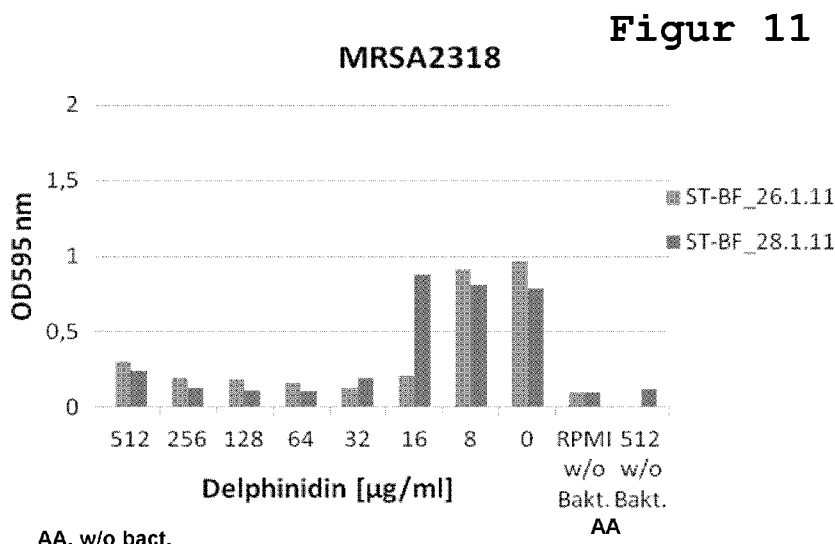
— hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i)

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ANTIBACTERIAL ACTIVE INGREDIENTS BASED ON ANTHOCYANIDIN-CYCLODEXTRIN COMPLEXES

(54) Bezeichnung : ANTIBAKTERIELLE WIRKSTOFFE AUF DER BASIS ANTHOCYANIDIN- CYCLODEXTRIN-
KOMPLEXEN



(57) Abstract: The invention relates to a composition or a complex comprising at least one anthocyanidin or salts thereof, which is aimed at bacteria selected from the group comprising antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and antibiotic-sensitive *Staphylococcus aureus* and at least partially neutralizes said bacteria, and methods for treating objects with said composition according to the invention or said complex.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist eine Zusammensetzung oder ein Komplex umfassend mindestens ein Anthocyanidin oder dessen Salze, das auf Bakterien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antibiotika-resistenten *Staphylococcus aureus* und Antibiotika-sensitiven *Staphylococcus aureus* zielt und diese Bakterien zumindest teilweise neutralisiert, sowie Verfahren zur Behandlung von Objekten mit dieser erfindungsgemäßen Zusammensetzung oder diesen Komplex.



WO 2013/144303 A1



— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

5

**ANTIBAKTERIELLE WIRKSTOFFE AUF DER BASIS
ANTHOCYANIDIN- CYCLODEXTRIN- KOMPLEXEN**

10 Die Erfindung betrifft eine Zusammensetzung oder Komplex umfassend mindestens ein Anthocyanidin oder dessen Salze zur Bekämpfung von Antibiotika-resistenten und Antibiotika-sensitiven Bakterien.

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

Antibiotika-resistente und Antibiotika-sensitive Bakterien finden sich häufig dort, wo ständig Antibiotika eingesetzt werden. Antibiotika-resistente und Antibiotika-sensitive
25 Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* zählen zu den gefährlichsten Erregern von im Krankenhaus erworbenen, sogenannten nosokomialen Infektionen, die sowohl über die Haut und Schleimhäute, aber auch durch kontaminierte medizinische Geräte oder Lebensmittel aufgenommen werden.

30

Insbesondere aufgrund des vermehrten Verbrauchs von Breitbandspektrum-Antibiotika in der Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten, ist eine Zunahme von multiresistenten Bakterien zu verzeichnen, so dass bei der Behandlung
35 von mit diesen Bakterien infizierten Patienten oder Tieren kein wirksames Antibiotikum mehr zur Verfügung steht. Anti-

Antibiotika-resistente Bakterien können bei Mensch und Tier schwere Allgemeininfektionen auslösen. Dies trifft insbesondere bei immunsupprimierten Patienten zu.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein wirksames Mittel zur Prophylaxe und Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten zur Verfügung zu stellen.

Der Erfindung liegt die weitere Aufgabe zu Grunde, ein
10 wirksames Mittel zur Bekämpfung von Antibiotika-resistenten und Antibiotika-sensitiven Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* zur Verfügung zu stellen.

Gelöst werden diese Aufgaben durch eine Zusammensetzung
15 oder einen Komplex umfassend mindestens ein Anthocyanidin oder dessen Salze gemäß Anspruch 1, eine wässrige Lösung oder Feststoff gemäß Anspruch 8, ein Verfahren gemäß Anspruch 10 und den Verwendungen gemäß den Ansprüchen 16 und 17. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in
20 den Unteransprüchen offenbart.

Zunächst seien einige im Rahmen der Erfindung verwendete Begriffe erläutert.

25 „Antibiotika“ sind Arzneistoffe zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten. Die Gruppe der Antibiotika umfasst insbesondere die β -Lactam Antibiotika (einschließlich Penicillin, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame), Chinolone, Tetracycline, Aminoglykoside, Erythromycin, Sulfonamide und Vancomycin. „Antibiotika-resistentes Bakterium“
30 und „Antibiotika-sensitives Bakterium“ bedeutet, dass das Bakterium gegen mindestens ein Antibiotikum resistent bzw. gegenüber mindestens einem Antibiotikum nur noch verminder-

te Empfindlichkeit aufweist. Multiresistente *Staphylococcus aureus* Stämme, die gegen alle derzeit marktverfügbaren β -Lactam Antibiotika resistent sind und meist auch Resistenzen gegenüber anderen Antibiotikaklassen verfügen, so gegen
5 Chinolone, Tetracycline, Aminoglykoside, Erythromycin und Sulfonamide, werden im Gebrauch unter der Bezeichnung „MRSA“ (multi-resistenter Staphyloccocus aureus bzw. Methi-cillin-resistenter Staphyloccocus aureus) zusammengefasst. Eine Therapie von MRSA Patienten erfolgt üblicherweise mit
10 dem Reserveantibiotikum Vancomycin, wobei auch dagegen schon Resistenzen verbreitet sind („VRSA“ - Vancomycin-resistenter Staphyloccocus aureus) und folglich ein erheblicher Bedarf an alternativen Arzneistoffen zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten besteht.

15 Erfindungsgemäß wird die Zusammensetzung oder der Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder die wässrige Lösung oder der Feststoff nach Anspruch 8 zur Behandlung eines Objekts oder Individuums eingesetzt, das verdächtigt wird mit
20 Bakterien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antibiotika-resistenten *Staphylococcus aureus* und Antibiotika-sensitiven *Staphylococcus aureus* kontaminiert zu sein. Der Zweck dieser Behandlung ist die zumindest teilweise Neutralisierung der Bakterien. Die Neutralisierung umfassend je-
25 der Art Neutralisierung umfassend z.B. bakteriostatische Neutralisierung, bakterizidische Neutralisierung, gemischte bakteriostatische-bakterizidische Neutralisierung. Der Begriff „Zusammensetzung oder Komplex umfassend mindestens ein Anthocyanidin“ schließt ein Anthocyanidin als solches ohne
30 weiteren Komponenten ein.

Mit Blick auf die Anwendung im Gesundheitssektor dient die erfindungsgemäße Zusammensetzung oder der Komplex nach ei-

nem der Ansprüche 1 bis 7 oder die wässrige Lösung oder der Feststoff nach Anspruch 8 zur Verwendung in der Behandlung oder Prophylaxe von Menschen oder Tieren, die verdächtig sind, mit Antibiotika-resistenten oder Antibiotika-sensitiven Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* infiziert zu sein. Die bakterielle Infektion bedingt insbesondere Krankheiten mit Symptomen wie Hautinfektionen, einschließlich Furunkel und Karbunkel, Pyomyositis, Lungenentzündung, Endokarditis, Toxisches Schock-Syndrom, Sepsis und Mastitis. Vor allem bei immunsupprimierten Patienten können durch Antibiotika-resistente oder Antibiotika-sensitive Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* schwere Allgemeininfektionen ausgelöst werden.

Mit Blick auf den Nahrungs-, Futtermittel und Desinfektionssektor umfasst der Begriff „Objekt“ keine lebenden Tiere, Vorrichtungen und/oder Einrichtungen und/oder Ausrüstungen und/oder Geräte für medizinische Anwendungen, die Lebensmittelverarbeitung, das Militär, Schutzausrüstungen, häusliche Objekte, Gebäudeeinrichtungen und Bauwerke. „Keine lebenden Tiere“ sind insbesondere getötete geschlachtete Tiere oder Teile dieser Tiere, beispielsweise der Körper eines Rindes oder ein Teil davon, der Körper eines Schweins oder ein Teil davon, ein Geflügelkörper oder ein Teil davon und der Körper eines im Wasser lebenden Tieres oder ein Teil davon. Das „Objekt“ kann insbesondere ein Nahrungs- und/oder Futtermittel sein, beispielsweise ein Fleischprodukt, ein verarbeitetes Fleischprodukt, ein Molkereiprodukt, Gemüse und deren Teile und Obst und deren Teile.

30

„Neutralisation“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung die Zerstörung oder Auflösung (Lysis) oder Inaktivierung (z.B. der Verlust des Infektionspotentials) oder Ver-

hinderung der Vermehrung eines Pathogens oder die Verhinderung der Pathogen-vermittelten Biofilm-Bildung, insbesondere Antibiotika-resistenter oder Antibiotika-sensitiver Bakterien der Art *Staphylococcus aureus*. Die Verabreichung
5 oder Applikation der erfindungsgemäßen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Komplexes kann derart erfolgen, dass ein Aufsprühen, Pudern, eine Injektion, eine Beschichtung mittels eines Gels, eines Verbandes, Pflasters oder ähnlichem auf den verdächtigerweise infizierten Bereich erfolgt.
10 Bei der Behandlung von Menschen oder Tieren kann in Abhängigkeit von dem Krankheitsbild eine systemische oder lokale Verabreichung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Komplexes erfolgen. Entsprechende Techniken für die Formulierung und Verabreichung sind aus
15 dem Stand der Technik bekannt, siehe beispielsweise „Remington's Pharmaceutical 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
20 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
25 der intravenösen, subkutanen, intramuskulären und intraperitonealen Verabreichung, kommt ebenfalls eine wässrige oder ölige Lösung oder eine Feststoffformulierung in Betracht.

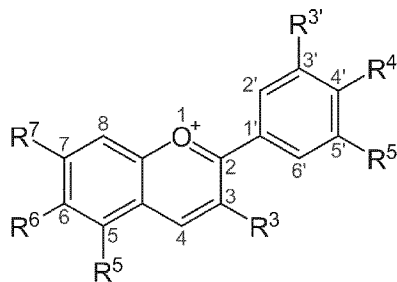
30 „Biofilm“ ist eine Ansammlung von Mikroorganismen (z.B. Bakterien), eingebettet in einer von den Mikroorganismen produzierten extrazellulären Polysaccharid- oder Protein-Matrix auf einer Oberfläche. Die Organisation von Bakterien

in einem Biofilm führt zu einer deutlich erhöhten Widerstandsfähigkeit der gesamten Population gegenüber verschiedensten Einflüssen. Durch Bakterien verursachte Biofilme auf Zähnen, dem Zahnfleisch, den Harnwegen, dem Verdauungstrakt oder medizinischen Geräten wie Katheter und Prothesen führen häufig zu schwerwiegenden Infektionen (Costerton *et al.*, Annu Rev. Microbiol 1995; 49: 711-45).

„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.

Das Anthocyanidin, 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.

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. Die Erfindung hat erkannt, dass die Sulfoalkylethergruppen in besonderem Maße zur Erhöhung der Stabilität des Komplexes aus Anthocyanidinen und dementsprechend substituierten β -Cyclodextrin beitragen und so die Lagerstabilität und Formulierbarkeit der besonders oxidationsempfindlichen Anthocyanidine wesentlich verbessern. 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 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.

Bevorzugt beträgt der Substitutionsgrad des Cyclodextrins mit Sulfoalkylethergruppen 3-8, weiter vorzugsweise 4-8, weiter vorzugsweise 5 bis 8, weiter vorzugsweise 6 bis 7. Geeignete Sulfobutylether- β -Cyclodextrine mit einem 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 4-5, beispielsweise 4,2.

10

Die erfindungsgemäß in reiner, Salz- oder komplexierten Form verwendeten Anthocyanidine sind bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aurantinidin, Cyanidin, Delphinidin, Europinidin, Luteolinidin, Pelargonidin, Malvidin, Peonidin, Petunidin und Rosinidin. Die chemische Struktur entspricht der oben wiedergegebenen Formel I mit dem folgenden Substitutionsmuster

15

	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

20

Besonders bevorzugt ist im Rahmen der Erfindung Delphinidin.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine wässrige Lösung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Komplexes.

- 5 Der erfindungsgemäße Komplex sowie eine entsprechende wässrige Lösung umfasst die folgenden Schritte:
- a) Herstellen einer wässrigen Lösung des Sufoalkylether- β -Cyclodextrins,
 - b) Zugabe des Anthocyanidins und Vermischen zur Herstellung des Komplexes.
- 10

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 Anthocyanidins, bevorzugt 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.

15

20

Die Konzentration des Anthocyanidins 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 beträgt. 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.

25

30

Im Rahmen der erfindungsgemäßen 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
5 lichtinduzierte Oxidation zu vermeiden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Feststoff enthaltend einen erfindungsgemäßen Komplex, der erfindungsgemäß erhältlich ist durch Entfernen des Lösungsmittels aus
10 einer erfindungsgemäßen wässrigen Lösung. Das Entfernen kann bevorzugt durch Gefriertrocknung (Lyophilisation) erfolgen. Sowohl die erfindungsgemäße wässrige Lösung als auch der Feststoff besitzen eine hohe Lagerstabilität.

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

I. Herstellung eines Komplexes aus dem Anthocyanidin 20 Delphinidin und Cyclodextrinen

1. Eingesetzte Materialien:

Die nachfolgenden Cyclodextrine werden verwendet:
25

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
Sulfbutylether- β -CD	ID No: 47K010111

Delphinidinchlorid wurde von der Firma Extrasynthese erworben.

2. Bestimmung des Delphinidingehalts

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

Gereinigtes Wasser

10 Methanol für die Chromatographie

Armeisensäure, p. a.

1 M Salzsäure als volumetrische Lösung.

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

Die mobilen Phasen waren wie folgt:

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

20 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

25 Stoppzeit: 35 min

Nachlaufzeit (posttime): 8 min

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

30 Säulentemperatur: 30°C +/- 2°C

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

Integrator: Fläche

Lösungen und Probenvorbereitung:

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

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

10

- 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-
15 nungslösung 2 zur Herstellung einer ungefähren Konzentrati-
on von 0,1 mg/ml.

- Die Kontrollkalibrierungslösung wurde auf die gleiche Art
und Weise hergestellt. Die Kalibrierungslösungen wurden so-
20 fort mittels HPLC analysiert, da Delphinidinchlorid in Lö-
sung instabil ist.

Herstellung der Prüflösungen:

- 25 Zur Bestimmung des Delphinidingehalts erfindungsgemäß her-
gestellter Feststoffe (Herstellung siehe weiter unten) wur-
de etwa 50 mg dieser Zusammensetzung in einem 10 ml Kolben
eingewogen. Anschließend wurde in Verdünnungslösung 2 ge-
löst und mit der gleichen Verdünnungslösung 2 weiter ver-
30 dünnt bis zur Einstellung einer ungefähren Delphinidinkon-
zentration von 0,1 mg/ml.

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

5

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.

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

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.

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

Die erzielbaren Löslichkeiten sind in der nachfolgenden Tabelle 1 wiedergegeben.

30

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 Löslichkeitserhöhung für SBE- β -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- β -CD in wässriger Lösung untersucht. Nach der Vorschrift von Beispiel 1 wurden wässrige Lösungen von SBE- β -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.

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.

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- β -CD

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 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.

Beispiel 3.3 Delphinidin/Stärkeformulierung

5 g Stärke wurde in 40 ml destilliertem Wasser suspendiert. Man erhielt eine weiße Suspension. Der pH 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 Dun-

keln 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
5 und 3.3 handelt es sich um Vergleichsbeispiele.

Beispiel 4: Stabilitätsversuche

Die Feststoffe gemäß den Beispielen 3.1 bis 3.3 wurden un-
10 ter folgenden Bedingungen gelagert:

- 8 Tage bei Raumtemperatur in braunen, verschraubten Glasbehältern,
- Anschließend 22 Tage bei Raumtemperatur in Glasbehäl-
15 tern unter Sauerstoffatmosphäre im Dunkeln.

Die letzten 22 Tage der oben beschriebenen Lagerung wurden in Glasviolen mit einem Volumen von 20 ml durchgeführt. Je-
weils 250 mg der vorher bereits für 8 Tage gelagerten Pro-
20 ben 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 Dun-
keln gelagert.

25

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.

30

	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, so dass 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. Dabei wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

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

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

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:

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

5 Stoppzeit: 25 min

Nachlaufzeit (posttime): 8 min

Flussrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

10 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 50 %igem 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.

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

Herstellung der Prüflösungen:

Zur Bestimmung des Delphinidingehalts einer erfindungsgemäßen wässrigen Lösung wurden Delphinidin/SBE- β -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 Violon 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.

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%

Die Bestimmung des Delphinidingehalts in den Proben wurde berechnet unter Zuhilfenahme der Agilent ChemStation Soft-

ware unter Verwendung der Kalibrierung mit den beschriebenen externen Standard.

II. Wirkung des Anthocyanidin Delphinidin auf Bakterien

5

1. Teststämme und Versuchsaufbau

Es wurden die folgenden Stämme ausgewählt:

- 10 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, Biofilm-positives klinisches Isolat aus einer Außenohr-Infektion (Referenzstamm);
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 Biofilm-positives klinisches Isolat aus Urin von einem ESBL+(Extended Spectrum Beta-Lactamase) -Krankenhauspatienten (Referenzstamm);
- 15 - *Staphylococcus aureus* MRSA2318 Biofilm-positives klinisches Isolat aus Trachealsekret vom 22.04.2009 (Uniklinik Würzburg, Neurochirurgische Klinik und Poliklinik I, Intensivstation);
- *Staphylococcus aureus* MRSA2855 Biofilm-positives klinisches Isolat aus Blutkultur vom 22.04.2009 (Uniklinik Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik I, ITS);
- 20 - *Staphylococcus aureus* MSSA1155 Biofilm-positives klinisches Isolat vom 27.04.2004 aus Bauchraumabstrich (Uniklinik Würzburg, Urologie, Station B).

25

Die vorgenannten Stämme wurden aufgrund ihrer ausgeprägten Biofilmbildung als besonders geeignet für die Untersuchung der Wirkung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen auf Bakterien ausgewählt, wie sich aus Figur 1 ergibt.

30

Figur 1 zeigt die Ergebnisse einer statischen Biofilmbildung nach 48 Stunden für verschiedene Stämme der Arten *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* sowie

MRSA- und MSSA-Stämme in zwei unabhängigen Experimenten.

Das Wachstum und die Analyse des Biofilms wurde in einem statischen Modell mittels des Kristallviolett-Tests gemäß dem Basisprotokoll 1 in Current Protocols in Microbiology 1B.1.2 -1B.1.4 „MICROTITER PLATE BIOFILM ASSAY“ [publiziert online August 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/9780471729259.mc01b01s22] bestimmt.

2. Wirkstoffanalyse

Die Untersuchung des Einflusses von Delphinidin auf das bakterielle Wachstum und die bakterielle Biofilmbildung erfolgte mittels

- a) der visuellen Bewertung des bakteriellen Wachstums (statisches Modell),
- b) Vitalitätstest (Ausstrich auf Blutagarplatten)
- c) Analyse des Biofilms in einem statischen Modell mittels des Kristallviolett-Tests wie oben unter Ziffer 1 beschrieben.

Zuerst wurden 1×10^6 Bakterien/Well in 100 μ l RPMI-1640 Zellmedium mit Phenolrot als Indikator für den pH-Wert (und damit als indirekter Indikator für das bakterielle Wachstum) in einer 96-Well-Polystyrol-Zellkulturschale vorgelegt. Als Kontrolle diente steriles RPMI-1640. Anschließend wurde in RPMI-1640 gelöstes Delphinidin aus einer zuvor erstellten Verdünnungsreihe hinzugefügt und die Zellkulturschale für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, dessen visuelles Ergebnis in Figur 2 dargestellt ist. Der Farbumschlag von (Phenol-)Rot zu Gelb korreliert mit der Stärke des bakteriellen Wachstums.

Ausstriche der Bakterien aus der Kulturschale sind in den Figuren 3 (*P. aeruginosa* ATCC9027), 4 (*K. pneumoniae* ATCC700603), 5 (MRSA2318), 6 (MRSA2855) und 7 (MSSA1155) dargestellt. „ST_26.1.11“ und „ST_28.1.11“ bei den Aus-
5 strichen auf den Agarplatten verweist auf das jeweilige Ausstrichdatum der duplizierten Versuche.

Mit gleichem Versuchsaufbau erfolgte die Analyse des Biofilms mittels des Kristallviolett-Tests wie oben unter Ziffer 1 beschrieben, dessen Ergebnis nach 48 Stunden Inkubation und Kristallviolett-Test in Figur 8 insgesamt, und in den Figuren 9-13 jeweils nach Messung der optischen Dichte graphisch aufbereitet für die jeweiligen Delphinidin-Konzentrationen bei den einzelnen Bakterienstämmen dargestellt sind (Figur 9: *P. aeruginosa* ATCC9027, Figur 10: *K. pneumoniae* ATCC700603, Figur 11: MRSA2318, Figur 12: MRSA2855, Figur 13: MSSA1155).
10
15

Die Versuchsergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
20

- Delphinidin besitzt keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum und die Biofilm-Bildung der gram-positiven Bakterien *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae*. Die Biofilm-Bildung scheint im Fall von *K. pneumoniae* sogar noch stimuliert zu werden.
25
- Dagegen besitzt Delphinidin einen hemmenden Effekt sowohl auf das Wachstum als auch die Biofilm-Bildung von *S. aureus* (sowohl MSSA als auch MRSA). Diese Wirkung nimmt dosisabhängig ab.
30

Patentansprüche

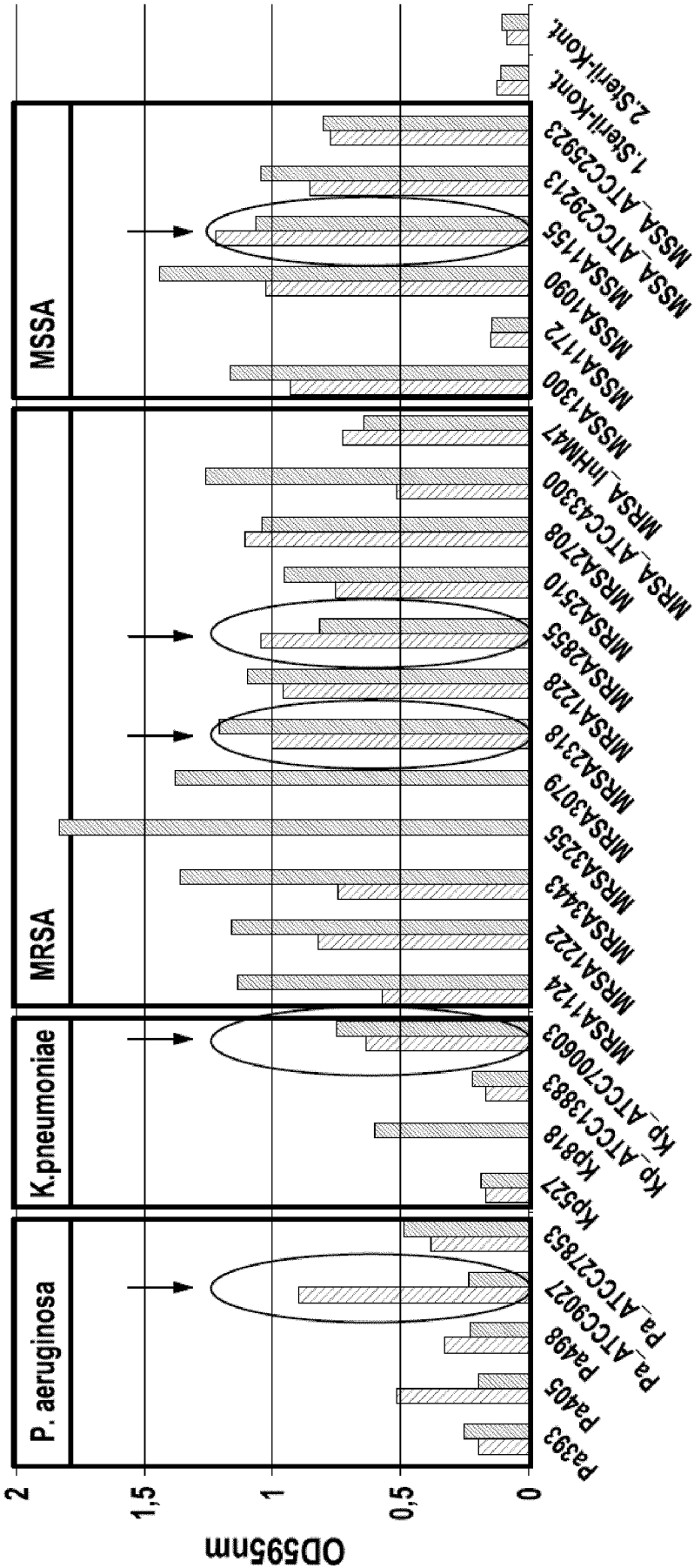
1. Komplex umfassend mindestens ein Anthocyanidin oder dessen Salze zur zumindest teilweisen Neutralisation von Bakterien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antibiotika-resistenten *Staphylococcus aureus* und Antibiotika-sensitiven *Staphylococcus aureus*.
2. Komplex nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Komplex Anthocyanidin und Sulfoalkylether- β -Cyclodextrin umfasst.
3. Komplex nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Sulfoalkylether- β -Cyclodextrin ein Sulfobutylether- β -Cyclodextrin ist.
4. Komplex nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Substitutionsgrad des Cyclodextrins mit Sulfoalkylethergruppen 3-8, vorzugsweise 4-8, weiter vorzugsweise 5 bis 8, weiter vorzugsweise 6 bis 7 beträgt.
5. Komplex nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Anthocyanidine ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Aurantinidin, Cyanidin, Delphinidin, Europinidin, Luteolinidin, Pelargonidin, Malvidin, Peonidin, Petunidin und Rosinidin.
6. Komplex nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Anthocyanidin Delphinidin ist.

7. Komplex nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Antibiotika ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus
- β -Lactam Antibiotika, einschließlich Penicillin,
 - 5 Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame,
 - Chinolone
 - Tetracycline,
 - Aminoglykoside,
 - Erythromycin,
 - 10 - Sulfonamide und
 - Vancomycin.
8. Wässrige Lösung eines Komplexes nach einem der vorangehenden Ansprüche oder Feststoff enthaltend einen
- 15 Komplex nach einem der vorangehenden Ansprüche.
9. Wässrige Lösung oder Feststoff nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung oder der Feststoff Bestandteil eines Arzneimittels, ein Zusatz von Werkstoffen oder einer Spüllösung sind.
- 20
10. Verfahren zur Behandlung eines Objekts, wobei das Objekt kein lebendes Tier ist, umfassend:
- a) die Bereitstellung
 - 25 i) eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einer wässrigen Lösung oder Feststoffes nach Anspruch 8 oder 9 und
 - ii) eines nicht lebenden Objekts, das verdächtig wird, mit Bakterien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Antibiotika-resistenten
 - 30 *Staphylococcus aureus* und Antibiotika-sensitiven *Staphylococcus aureus* kontaminiert zu sein, und

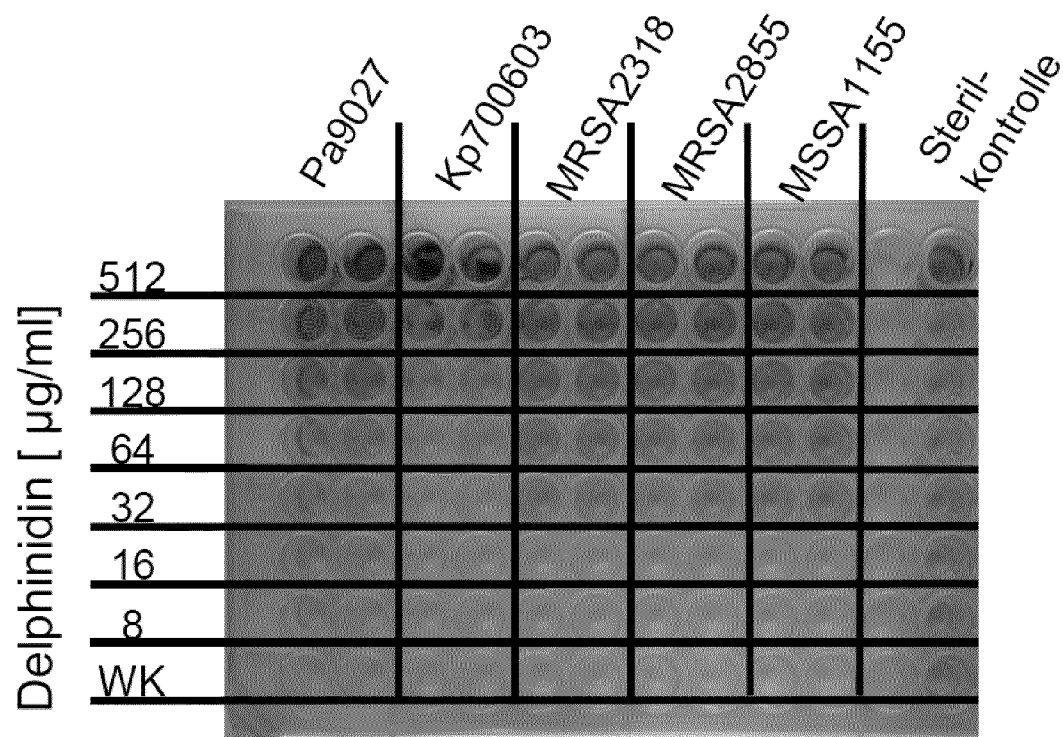
- 5 b) die Behandlung des Objekts mit dem Komplex oder
 der wässrigen Lösung oder dem Feststoff unter
 solchen Bedingungen, dass die Bakterien, die ver-
 dächtigerweise das Objekt kontaminieren, zumin-
 dest teilweise neutralisiert werden.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet,
 dass das Objekt ein Tierkörper oder ein Teil davon
 ist.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,
 dass die Tierkörper oder Teile davon ausgewählt sind
 aus der Gruppe bestehend aus
- Körper eines Rindes oder ein Teil davon,
 - Körper eines Schweins oder ein Teil davon,
 - Geflügelkörper oder ein Teil davon und
 - Körper eines im Wasser lebenden Tieres oder ein Teil
 davon.
- 20 13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet,
 dass das Objekt ein Nahrungs- und/oder Futtermittel
 ist.
- 25 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet,
 dass das Nahrungs- und/oder Futtermittel ausgewählt
 ist aus der Gruppe bestehend aus
- 30 - einem Fleischprodukt,
 - einem verarbeiteten Fleischprodukt,
 - einem Molkereiprodukt,
 - Gemüse und deren Teilen und
 - Obst und deren Teilen.

15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Objekte ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus
- 5 a) Vorrichtungen und/oder Einrichtungen und/oder Ausrüstungen und/oder Geräten für
- medizinische Anwendungen,
 - die Lebensmittelverarbeitung,
 - das Militär,
- 10 b) Schutzausrüstungen,
- c) häusliche Objekte,
- d) Gebäudeeinrichtungen und
- e) Bauwerke.
- 15 16. Komplex nach einem der Ansprüche 1-7 oder wässrige Lösung oder Feststoff nach Anspruch 8 oder 9 zur Verwendung in der Behandlung eines Objekts das verdächtigt wird, mit Antibiotika-resistenten oder Antibiotika-sensitiven Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* infiziert zu sein.
- 20 17. Komplex nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder wässrige Lösung oder Feststoff nach Anspruch 8 oder 9 zur Verwendung in der Behandlung oder Prophylaxe von Menschen oder Tieren, die verdächtig sind, mit Antibiotika-resistenten oder Antibiotika-sensitiven Bakterien der
- 25 Art *Staphylococcus aureus* infiziert zu sein.
- 30 18. Komplex oder wässrige Lösung oder Feststoff zur Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Infektion Krankheiten mit Symptomen bedingt, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
- Hautinfektionen, einschließlich Furunkel und Karbunkel,

- 5
- Pyomyositis,
 - Lungenentzündung,
 - Endokarditis,
 - Toxisches Schock-Syndrom,
 - Sepsis und
 - Mastitis.

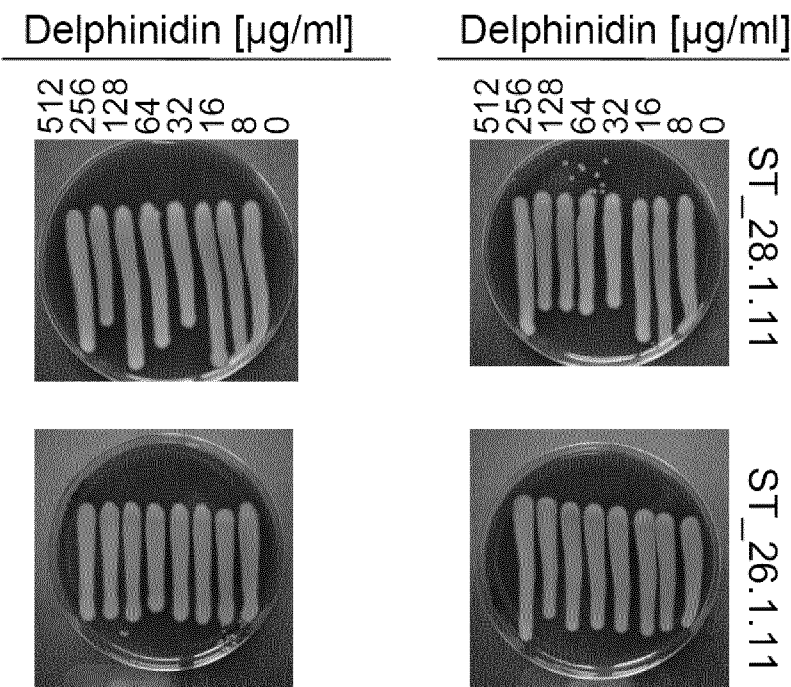


Figur 1



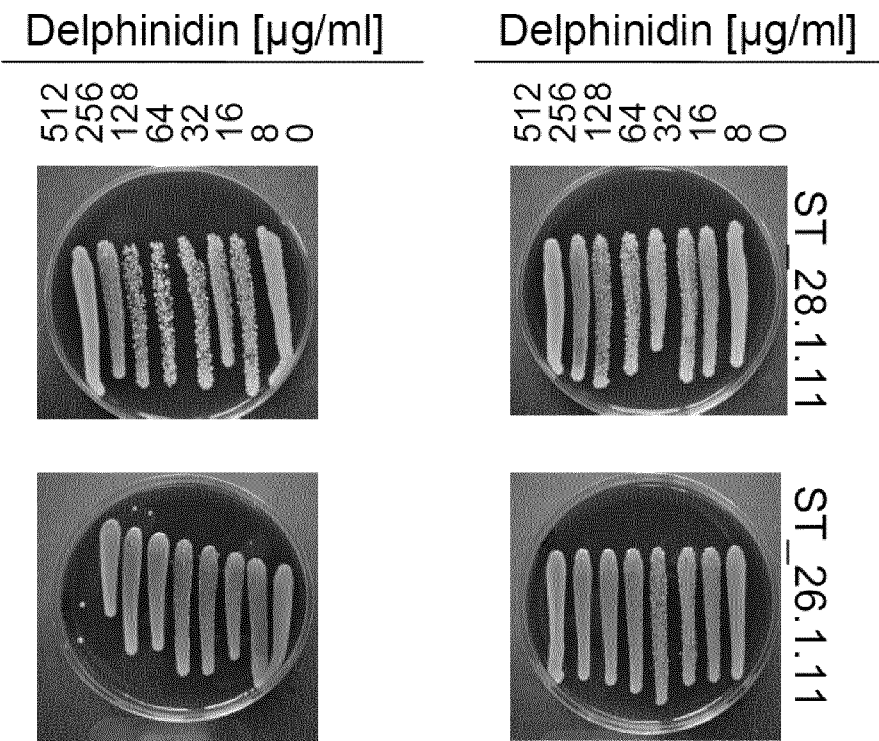
Figur 2

P. aeruginosa ATCC9027



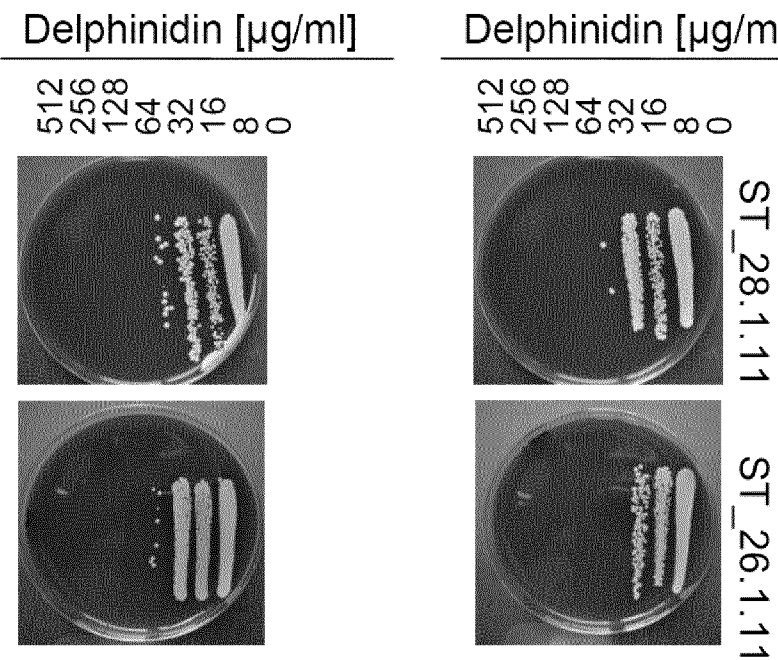
Figur 3

K. pneumoniae ATCC700603



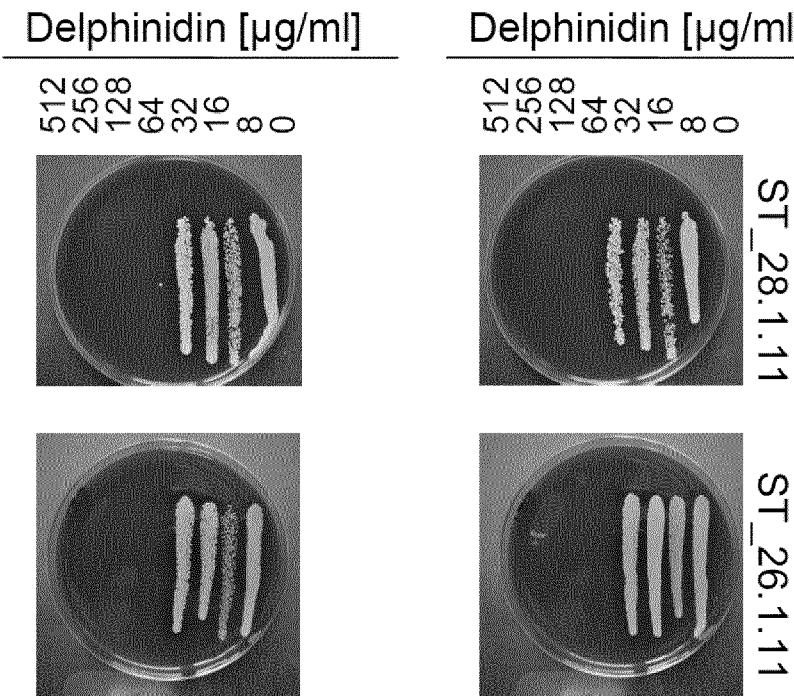
Figur 4

MRSA2318



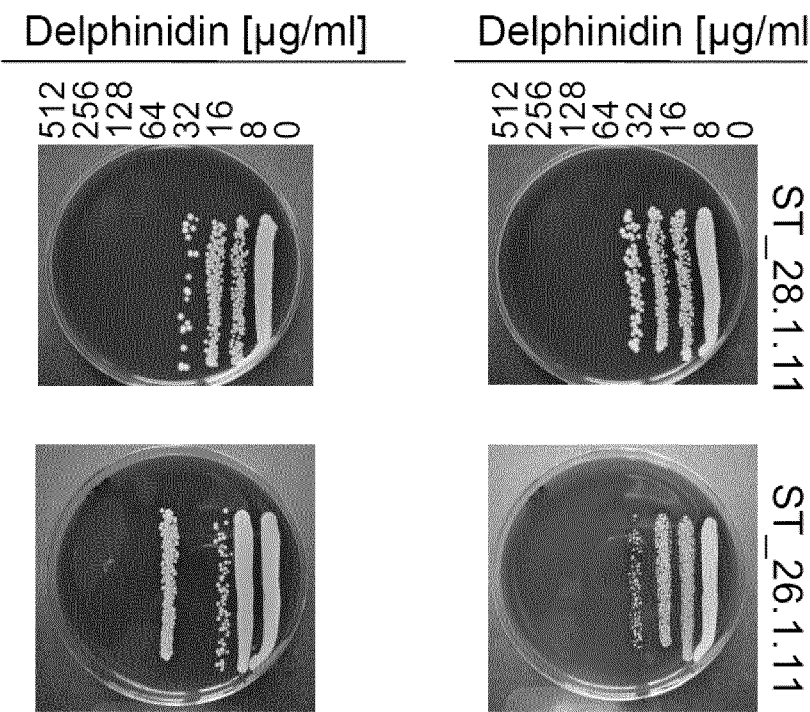
Figur 5

MRSA2855

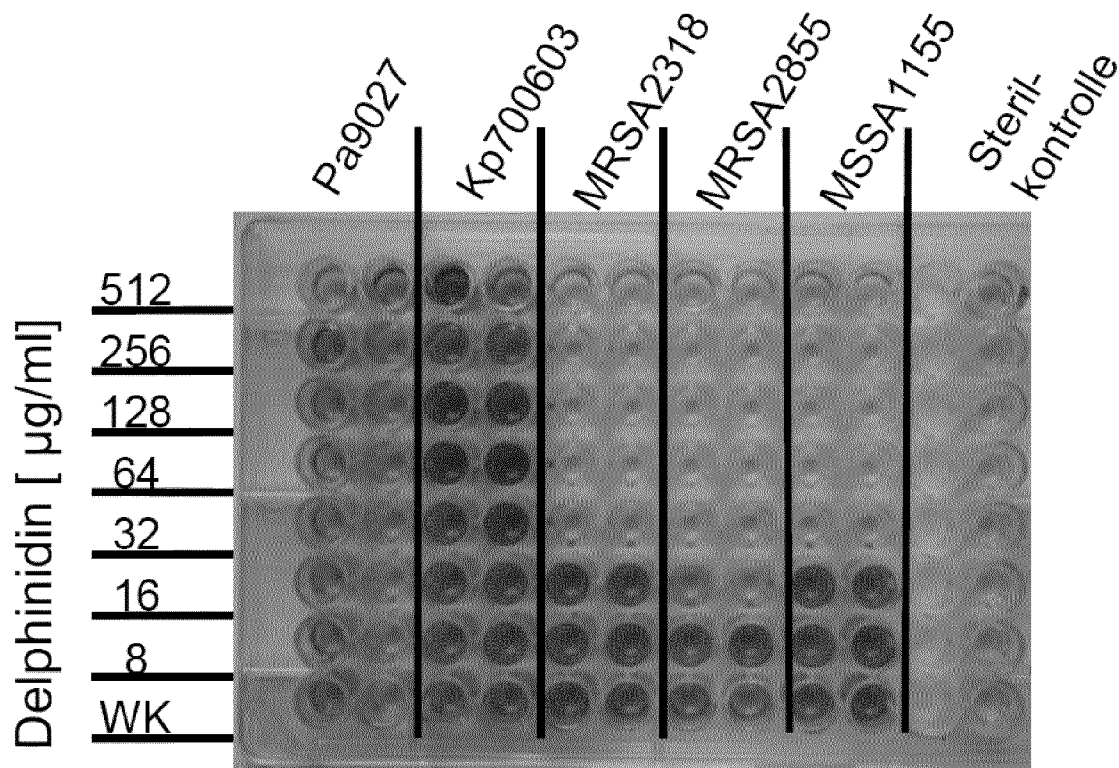


Figur 6

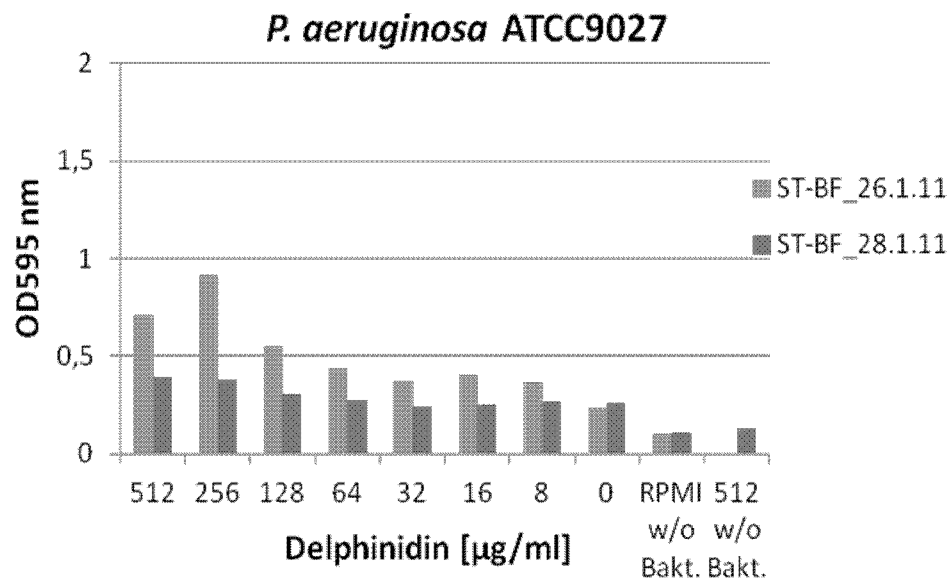
MSSA1155



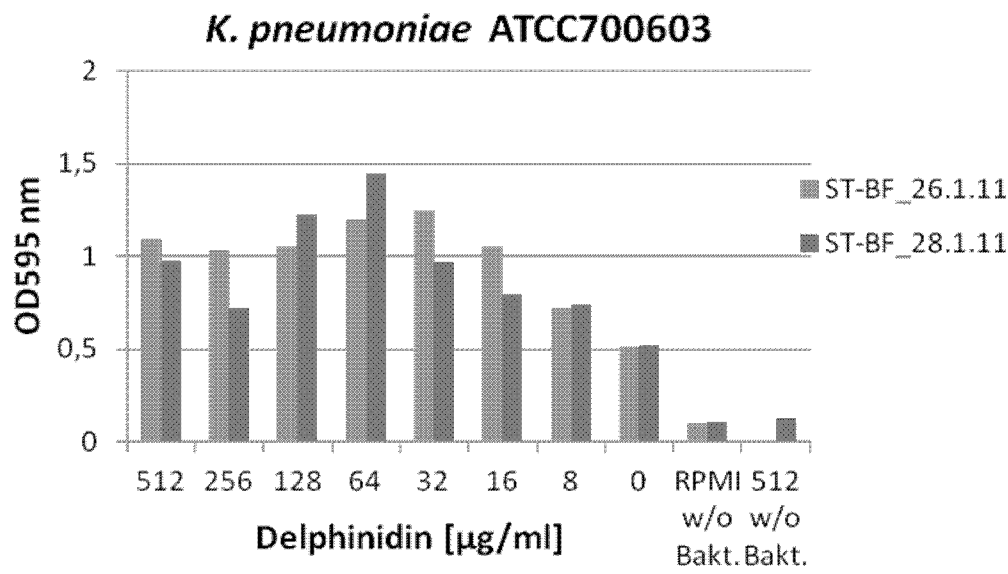
Figur 7



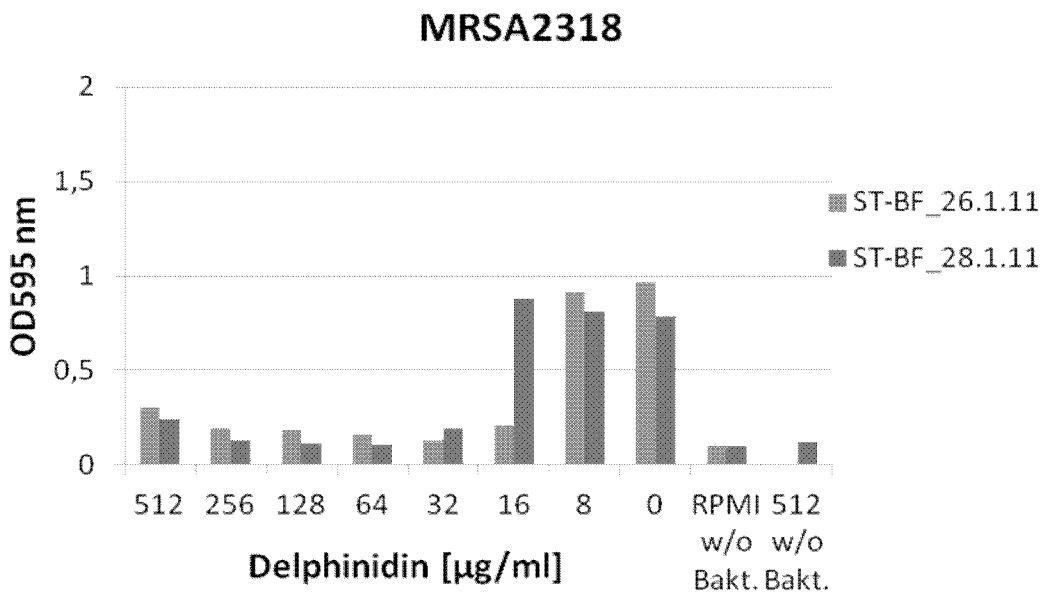
Figur 8



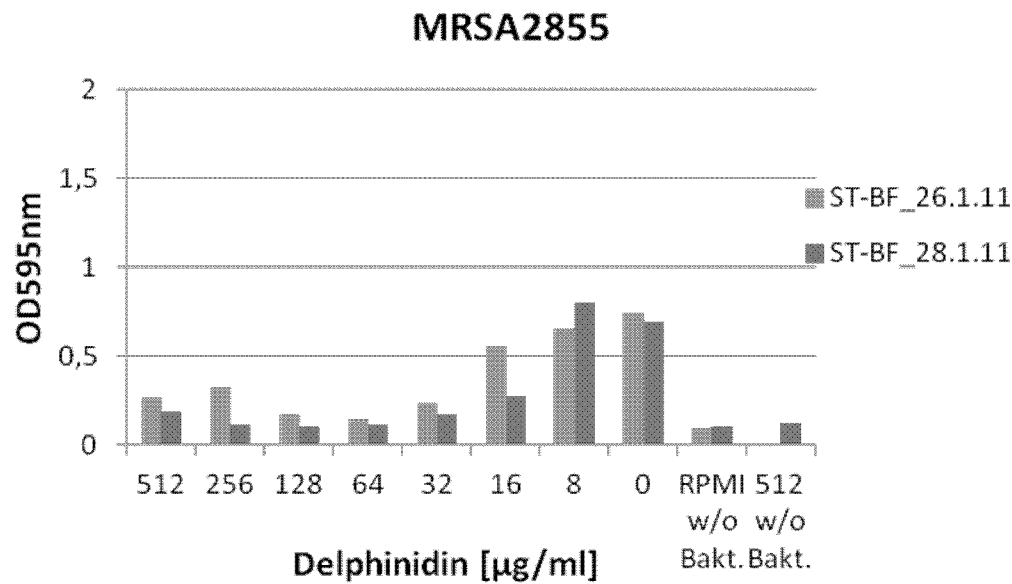
Figur 9



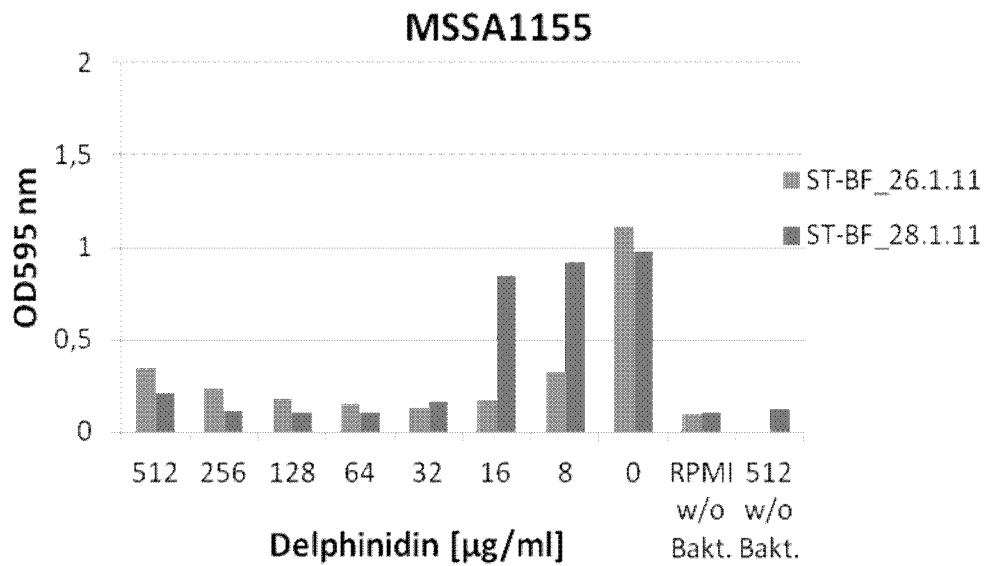
Figur 10



Figur 11



Figur 12



Figur 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/056722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N25/22 A01N43/16 A01P1/00
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)
A01N

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, 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.
X	DATABASE WPI Week 200612 Thomson Scientific, London, GB; AN 2006-111412 XP002697752, -& CN 1 672 534 A (WU C) 28 September 2005 (2005-09-28) abstract	1,5,8,16
X	US 2011/224168 A1 (SZENTE LAJOS [HU]) 15 September 2011 (2011-09-15) paragraphs [0025], [0028], [0029], [0036], [0038], [0044] ----- -/-	1,5,6,8, 16



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

5 June 2013

Date of mailing of the international search report

14/06/2013

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

Habermann, Jörg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/056722

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEIVIDAS BURDULIS ET AL: "COMPARATIVE STUDY OF ANTHOCYANIN COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BILBERRY (VACCINIUM MYRTILLUS L.) AND BLUEBERRY (VACCINIUM CORYMBOSUM L.) FRUITS", ACTA POLONIAE PHARMACEUTICA, vol. 66, no. 4, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 399-408, XP055041258, ISSN: 0001-6837 tables 1-5 page 403, column 2, line 7 - line 9 page 404, column 1, line 3 - page 405, column 1, line 3 -----	1-5,7-18
Y	DATABASE WPI Week 200377 Thomson Scientific, London, GB; AN 2003-819104 XP002685441, -& JP 2003 171274 A (ALPS YAKUHIN KOGYO KK) 17 June 2003 (2003-06-17) abstract paragraph [0012] table 1 claim 2 -----	1-5,7-18
Y	DATABASE WPI Week 200055 Thomson Scientific, London, GB; AN 2000-582017 XP002685442, -& JP 2000 212092 A (TANIUCHI Y) 2 August 2000 (2000-08-02) abstract paragraphs [0008], [0013] claim 4 -----	1-5,7-18
Y	KALOGEROPOULOS N ET AL: "Polyphenol characterization and encapsulation in <2>-cyclodextrin of a flavonoid-rich Hypericum perforatum (St John's wort) extract", LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 43, no. 6, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 882-889, XP026984673, ISSN: 0023-6438 [retrieved on 2010-01-28] table 1 ----- -/--	1-5,7-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/056722

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Raymond Brouillard ET AL: "Mechanism of the Structural Transformations of Anthocyanins in Acidic Media", Journal of the American Chemical Society, 1 January 1977 (1977-01-01), pages 1359-1364, XP055041350, Retrieved from the Internet: URL:http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00447a012 [retrieved on 2012-10-17] Fussnote 20 -----	1-5,7-18
Y	FEI HE ET AL: "Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes", MOLECULES, vol. 15, no. 12, 9 December 2010 (2010-12-09), pages 9057-9091, XP055041352, DOI: 10.3390/molecules15129057 page 9059, line 24 - line 39 page 9060, line 20 - line 22 -----	1-5,7-18
Y	STELLA VALENTINO J ET AL: "Cyclodextrins: Their Future in Drug Formulation and Delivery", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 5, 1 May 1997 (1997-05-01), pages 556-567, XP002080397, ISSN: 0724-8741, DOI: 10.1023/A:1012136608249 page 556, column 2, line 10 - line 12 page 557, column 1, line 12 - line 16 page 559, column 1, line 13 - line 54 -----	1-5,7-18
Y	E.M.MARTIN DEL VALLE: "Cyclodextrins and their uses: a review", PROCESS BIOCHEMISTRY, vol. 39, no. 9, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 1033-1046, XP055039063, ISSN: 1359-5113, DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9 page 1037, column 2, line 37 - line 40 page 1041, column 2, line 23 - line 42 ----- -/--	1-5,7-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/056722

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RASHEED ARUN RASHEED ET AL: "Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review", SCIENTIA PHARMACEUTICA, vol. 76, no. 4, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 567-598, XP055041332, ISSN: 0036-8709, DOI: 10.3797/scipharm.0808-05 page 572, line 9 - line 10 page 573, line 2 - line 5 page 575, line 16 - line 24 -----	1-5,7-18
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 table 1 figures 1-5 -----	1-5,7-18
Y	US 2009/270348 A1 (ANTLE VINCENT [US]) 29 October 2009 (2009-10-29) paragraphs [0139], [0140], [0147] -----	1-5,7-18
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 8, line 8 - line 23 page 10, line 28 - line 31 examples 1-3 claims 6, 12 -----	1-5,7-18
A	Tiurlan F Hutajalu ET AL: "Identification of Phenol and Delphinidine in the Telangs flower (Clitoria ternatea L.) and its Effectivity to Staphylococcus aureus as Eyes Bacterial Disease", Journal of Agro-Based Industry (Warta IHP Nalai Besar Industri Agro), 1 December 2008 (2008-12-01), page 1, XP55064065, Indonesia Retrieved from the Internet: URL:http://bbia.go.id/files/WartaIHPvol%2025%20no.2-2008.pdf [retrieved on 2013-05-24] abstract -----	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/056722

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 1672534	A	28-09-2005	NONE
US 2011224168	A1	15-09-2011	AU 2011228758 A1 08-11-2012 CA 2792733 A1 22-09-2011 CN 102892310 A 23-01-2013 EP 2547221 A2 23-01-2013 US 2011224168 A1 15-09-2011 WO 2011114239 A2 22-09-2011
JP 2003171274	A	17-06-2003	NONE
JP 2000212092	A	02-08-2000	NONE
US 2009270348	A1	29-10-2009	AU 2009241858 A1 05-11-2009 CA 2702603 A1 05-11-2009 CA 2771879 A1 05-11-2009 CN 101959508 A 26-01-2011 EA 201000828 A1 31-10-2011 EP 2268269 A2 05-01-2011 JP 4923144 B2 25-04-2012 JP 2010539193 A 16-12-2010 JP 2012072160 A 12-04-2012 KR 20110010742 A 07-02-2011 US 2009270348 A1 29-10-2009 US 2010093663 A1 15-04-2010 WO 2009134347 A2 05-11-2009
WO 2011048479	A2	28-04-2011	CA 2735343 A1 21-04-2011 EP 2344154 A1 20-07-2011 JP 2013508347 A 07-03-2013 KR 20120090089 A 16-08-2012 US 2011268825 A1 03-11-2011 WO 2011048479 A2 28-04-2011

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A01N25/22 A01N43/16 A01P1/00 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A01N		
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, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Week 200612 Thomson Scientific, London, GB; AN 2006-111412 XP002697752, -& CN 1 672 534 A (WU C) 28. September 2005 (2005-09-28) Zusammenfassung	1,5,8,16
X	----- US 2011/224168 A1 (SZENTE LAJOS [HU]) 15. September 2011 (2011-09-15) Absätze [0025], [0028], [0029], [0036], [0038], [0044] ----- -/-	1,5,6,8, 16
☒ 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 5. Juni 2013		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 14/06/2013
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 Habermann, Jörg

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DEIVIDAS BURDULIS ET AL: "COMPARATIVE STUDY OF ANTHOCYANIN COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BILBERRY (VACCINIUM MYRTILLUS L.) AND BLUEBERRY (VACCINIUM CORYMBOSUM L.) FRUITS", ACTA POLONIAE PHARMACEUTICA, Bd. 66, Nr. 4, 1. April 2009 (2009-04-01), Seiten 399-408, XP055041258, ISSN: 0001-6837 Tabellen 1-5 Seite 403, Spalte 2, Zeile 7 - Zeile 9 Seite 404, Spalte 1, Zeile 3 - Seite 405, Spalte 1, Zeile 3 -----	1-5,7-18
Y	DATABASE WPI Week 200377 Thomson Scientific, London, GB; AN 2003-819104 XP002685441, -& JP 2003 171274 A (ALPS YAKUHI KOGYO KK) 17. Juni 2003 (2003-06-17) Zusammenfassung Absatz [0012] Tabelle 1 Anspruch 2 -----	1-5,7-18
Y	DATABASE WPI Week 200055 Thomson Scientific, London, GB; AN 2000-582017 XP002685442, -& JP 2000 212092 A (TANIUCHI Y) 2. August 2000 (2000-08-02) Zusammenfassung Absätze [0008], [0013] Anspruch 4 -----	1-5,7-18
Y	KALOGEROPOULOS N ET AL: "Polyphenol characterization and encapsulation in <2>-cyclodextrin of a flavonoid-rich Hypericum perforatum (St John's wort) extract", LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, Bd. 43, Nr. 6, 1. Juli 2010 (2010-07-01), Seiten 882-889, XP026984673, ISSN: 0023-6438 [gefunden am 2010-01-28] Tabelle 1 ----- -/--	1-5,7-18

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	Raymond Brouillard ET AL: "Mechanism of the Structural Transformations of Anthocyanins in Acidic Media", Journal of the American Chemical Society, 1. Januar 1977 (1977-01-01), Seiten 1359-1364, XP055041350, Gefunden im Internet: URL: http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00447a012 [gefunden am 2012-10-17] Fussnote 20 -----	1-5,7-18
Y	FEI HE ET AL: "Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes", MOLECULES, Bd. 15, Nr. 12, 9. Dezember 2010 (2010-12-09), Seiten 9057-9091, XP055041352, DOI: 10.3390/molecules15129057 Seite 9059, Zeile 24 - Zeile 39 Seite 9060, Zeile 20 - Zeile 22 -----	1-5,7-18
Y	STELLA VALENTINO J ET AL: "Cyclodextrins: Their Future in Drug Formulation and Delivery", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NEW YORK, NY, US, Bd. 14, Nr. 5, 1. Mai 1997 (1997-05-01), Seiten 556-567, XP002080397, ISSN: 0724-8741, DOI: 10.1023/A:1012136608249 Seite 556, Spalte 2, Zeile 10 - Zeile 12 Seite 557, Spalte 1, Zeile 12 - Zeile 16 Seite 559, Spalte 1, Zeile 13 - Zeile 54 -----	1-5,7-18
Y	E.M.MARTIN DEL VALLE: "Cyclodextrins and their uses: a review", PROCESS BIOCHEMISTRY, Bd. 39, Nr. 9, 1. Mai 2004 (2004-05-01), Seiten 1033-1046, XP055039063, ISSN: 1359-5113, DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9 Seite 1037, Spalte 2, Zeile 37 - Zeile 40 Seite 1041, Spalte 2, Zeile 23 - Zeile 42 ----- -/--	1-5,7-18

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	RASHEED ARUN RASHEED ET AL: "Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review", SCIENTIA PHARMACEUTICA, Bd. 76, Nr. 4, 1. Januar 2008 (2008-01-01) , Seiten 567-598, XP055041332, ISSN: 0036-8709, DOI: 10.3797/scipharm.0808-05 Seite 572, Zeile 9 - Zeile 10 Seite 573, Zeile 2 - Zeile 5 Seite 575, Zeile 16 - Zeile 24 -----	1-5,7-18
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 Tabelle 1 Abbildungen 1-5 -----	1-5,7-18
Y	US 2009/270348 A1 (ANTLE VINCENT [US]) 29. Oktober 2009 (2009-10-29) Absätze [0139], [0140], [0147] -----	1-5,7-18
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 8, Zeile 8 - Zeile 23 Seite 10, Zeile 28 - Zeile 31 Beispiele 1-3 Ansprüche 6, 12 -----	1-5,7-18
A	Tiurlan F Hutajalu ET AL: "Identification of Phenol and Delphinidine in the Telangs flower (Clitoria ternatea L.) and its Effectivity to Staphylococcus aureus as Eyes Bacterial Disease", Journal of Agro-Based Industry (Warta IHP Nalai Besar Industri Agro), 1. Dezember 2008 (2008-12-01), Seite 1, XP55064065, Indonesia Gefunden im Internet: URL:http://bbia.go.id/files/WartaIHPvol%2025%20no.2-2008.pdf [gefunden am 2013-05-24] Zusammenfassung -----	6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/056722

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
CN 1672534	A	28-09-2005	KEINE
US 2011224168	A1	15-09-2011	AU 2011228758 A1 08-11-2012 CA 2792733 A1 22-09-2011 CN 102892310 A 23-01-2013 EP 2547221 A2 23-01-2013 US 2011224168 A1 15-09-2011 WO 2011114239 A2 22-09-2011
JP 2003171274	A	17-06-2003	KEINE
JP 2000212092	A	02-08-2000	KEINE
US 2009270348	A1	29-10-2009	AU 2009241858 A1 05-11-2009 CA 2702603 A1 05-11-2009 CA 2771879 A1 05-11-2009 CN 101959508 A 26-01-2011 EA 201000828 A1 31-10-2011 EP 2268269 A2 05-01-2011 JP 4923144 B2 25-04-2012 JP 2010539193 A 16-12-2010 JP 2012072160 A 12-04-2012 KR 20110010742 A 07-02-2011 US 2009270348 A1 29-10-2009 US 2010093663 A1 15-04-2010 WO 2009134347 A2 05-11-2009
WO 2011048479	A2	28-04-2011	CA 2735343 A1 21-04-2011 EP 2344154 A1 20-07-2011 JP 2013508347 A 07-03-2013 KR 20120090089 A 16-08-2012 US 2011268825 A1 03-11-2011 WO 2011048479 A2 28-04-2011