

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 080**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16	(2006.01)
A01N 25/02	(2006.01)
A01N 25/22	(2006.01)
A61K 8/49	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01)
A61Q 17/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013 PCT/EP2013/056725**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO2013144306**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013 E 13719034 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2854553**

54 Título: **Uso de delfinidina contra Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

30.03.2012 EP 12002352

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2017

73 Titular/es:

**SAPIOTEC GMBH (100.0%)
Nikolausstrasse 18
97082 Würzburg, DE**

72 Inventor/es:

**ROEWER, NORBERT y
BROSCHKEIT, JENS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 620 080 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de delfinidina contra *Staphylococcus aureus*

La invención se refiere al uso de la antocianidina delfinidina o sus sales para combatir bacterias resistentes a antibióticos y sensibles a antibióticos.

5 Las antocianidinas son colorantes zimocrómicos que aparecen en la mayoría de las plantas terrestres superiores. Las antocianidinas están exentas de azúcar (agliconas) y están estrechamente relacionadas con los antocianos que contienen azúcar (glicósidos), que se incluyen ambos en el término general de los antocianos. Las antocianidinas son colorantes y poseen propiedades antioxidantes.

10 Las bacterias resistentes a antibióticos y sensibles a antibióticos se encuentran con frecuencia allí donde se emplean constantemente antibióticos. Las bacterias resistentes a antibióticos y sensibles a antibióticos de la especie *Staphylococcus aureus* pertenecen a los patógenos más peligrosos de infecciones adquiridas en el hospital, las denominadas infecciones nosocomiales, que se adquieren tanto a través de la piel y las mucosas como a través de aparatos médicos o alimentos contaminados.

15 En particular a causa del mayor consumo de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas se registra un aumento de bacterias multi-resistentes, de tal manera que en el tratamiento de pacientes o animales infectados por estas bacterias ya no está disponible ningún antibiótico eficaz. Las bacterias resistentes a antibióticos pueden desencadenar infecciones generalizadas graves en el ser humano y en el animal. Esto se cumple en particular en pacientes inmunosuprimidos.

20 El objetivo de la presente invención es poner a disposición un agente eficaz para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.

La invención tiene el objetivo adicional de poner a disposición un agente eficaz para combatir bacterias resistentes a antibióticos y sensibles a antibióticos de la especie *Staphylococcus aureus*.

25 Estos objetivos se resuelven mediante las formas de realización de la invención reivindicadas en las reivindicaciones adjuntas. Las formas de realización de la presente invención que no se incluyen en las reivindicaciones adjuntas sirven únicamente a fines ilustrativos y no son objeto de la presente invención.

En relación con el estado de la técnica en cuanto a la presente solicitud se señala lo siguiente:

30 Higuchi y colaboradores (Higuchi y col., "Pharmaceutical composition for treating drug resistant bacterial infectious disease caused by methicillin-resistant staphylococcus aureus, contains flavonoid, benzal coumaranone and anthocyanidin as active ingredient", WPI/THOMSON, tomo 2003, n.º 77, 17 junio 2003) describen el uso de cianidina o pelargonidina para combatir al menos parcialmente *Staphylococcus aureus* sobre un objeto que no es ningún animal vivo. A diferencia de esto, en la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas se usa la antocianidina delfinidina. Por el estado de la técnica, el experto en la materia sabe qué extractos de distintos frutos que muestran un efecto contra *Staphylococcus aureus* contienen, aparte de otras antocianidinas, también delfinidina. Para esto véase por ejemplo Deividas Burdulis y colaboradores (Deividas Burdulis y col., "COMPARATIVE STUDY OF ANTHOCYANIN COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BILBERRY (VACCINIUM MYRTILLUS L.) AND BLUEBERRY (VACCINIUM CORYMBOSUM L.) FRUITS", ACTA POLONIAE PHARMACEUTICA, tomo 66, n.º 4, 1 abril 2009, páginas 399-408), Ibrahim (M I Ibrahim, "Efficiency of Pomegranate Peel Extract as Antimicrobial, Antioxidant and Protective Agents", World Journal of Agricultural Sciences, 1 abril 2010, páginas 338-344), Abdollahzadeh y colaboradores (Sh Abdollahzadeh y col., "Antibacterial and Antifungal Activities of Punica Granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens", Journal of Dentistry, 1 abril 2011, páginas 1-6) y Ukoha y colaboradores (Pius O Ukoha y col., "Tannins and other phytochemical of the Samanaea saman pods and their antimicrobial activities", African Journal of Pure and Applied Chemistry, 1 agosto 2011, páginas 237-244). Sin embargo, el hecho de que la antocianidina delfinidina causa un efecto contra *Staphylococcus aureus* no era de esperar por el experto en la materia en vista de la publicación de Hutajalu y colaboradores (Tiurlan F Hutajalu y col., "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 diciembre 2008, página 1) en la que se informa de que la delfinidina actuó únicamente como pigmento azul, aunque no que contribuye a un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*.

50 En primer lugar se explican algunos términos usados en el marco de la invención.

Los "antibióticos" son medicamentos para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas. El grupo de los antibióticos comprende en particular los antibióticos β -lactámicos (incluyendo penicilina, cefalosporinas, carbapenemo y monobactamo), quinolonas, tetraciclinas, aminoglicósidos, eritromicina, sulfonamidas y vancomicina. "Bacteria resistente a antibióticos" y "bacteria sensible a antibióticos" significa que la bacteria es resistente frente a al menos un antibiótico o que presenta frente a al menos un antibiótico ya solo una sensibilidad menor. Las cepas multi-resistentes de *Staphylococcus aureus* que son resistentes frente a los antibióticos β -lactámicos disponibles

actualmente en el mercado y que la mayoría de las veces también presenta resistencias frente a otras clases de antibióticos así frente a quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, eritromicina y sulfonamidas, se resumen en el uso con la denominación "MRSA" (por sus siglas en inglés de *Staphylococcus aureus* multi-resistente o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Una terapia de pacientes con MRSA habitualmente se realiza con el antibiótico de reserva vancomicina, estando propagadas también contra el mismo ya resistencias ("VRSA" - *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina) y como consecuencia existe una considerable necesidad de medicamentos alternativos para el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas.

De acuerdo con la invención se emplea la composición definida en las reivindicaciones o el complejo o la solución acuosa definida en las reivindicaciones o el sólido para el tratamiento de un objeto o individuo del que se sospecha que está contaminado con bacterias seleccionadas del grupo compuesto por *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos o *Staphylococcus aureus* sensibles a antibióticos. El fin de este tratamiento es la neutralización al menos parcial de las bacterias. La neutralización comprende por ejemplo la neutralización bacteriostática, neutralización bactericida, neutralización mixta bacteriostática-bactericida. La expresión "composición o complejo que comprende al menos una antocianidina" incluye una antocianidina como tal sin otros componentes.

En vista de la aplicación en el sector sanitario, la composición de acuerdo con la invención definida en las reivindicaciones o el complejo o la solución acuosa definida en las reivindicaciones o el sólido sirve para el uso en el tratamiento o la profilaxis de seres humanos o animales de los cuales se sospecha que están infectados por bacterias resistentes a antibióticos o sensibles a antibióticos de la especie *Staphylococcus aureus*. La infección bacteriana causa en particular enfermedades con síntomas tales como infecciones cutáneas, incluyendo furúnculos y carbúnculos, piomiositis, neumonía, endocarditis, síndrome de choque tóxico, septicemia y mastitis. Sobre todo en el caso de pacientes inmunosuprimidos se pueden desencadenar infecciones generalizadas graves por bacterias resistentes a antibióticos o sensibles a antibióticos de la especie *Staphylococcus aureus*.

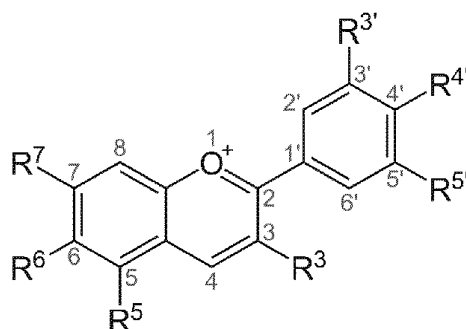
En vista del sector alimentario, de los piensos y de la desinfección, el término "objeto" comprende animales no vivos, dispositivos y/o equipos y/o equipamientos y/o aparatos para aplicaciones médicas, el procesamiento de alimentos, el sector militar, equipamientos protectores, objetos domésticos, equipos de edificios y obras. Los "animales no vivos" son en particular animales sacrificados en matadero o partes de estos animales, por ejemplo el cuerpo de un bovino o una parte del mismo, el cuerpo de un cerdo o una parte del mismo, un cuerpo de ave o una parte del mismo y el cuerpo de un animal de vida acuática o una parte del mismo. El "objeto" puede ser en particular un alimento y/o pienso, por ejemplo un producto cárnico, un producto cárnico procesado, un producto lácteo, hortalizas o sus partes y frutas y sus partes.

"Neutralización" significa en el sentido de la presente invención la destrucción o degradación (lisis) o inactivación (por ejemplo, la pérdida del potencial infeccioso) o la evitación de la propagación de un patógeno o la evitación de la formación de biopelícula mediada por patógeno, en particular de bacterias resistentes a antibióticos o sensibles a antibióticos de la especie *Staphylococcus aureus*. La administración o aplicación de la composición de acuerdo con la invención o del complejo de acuerdo con la invención se puede realizar de tal manera que se realiza una pulverización, espolvoreo, una inyección, un revestimiento mediante un gel, un vendaje, parche o similares sobre la zona de la que se sospecha que está infectada. En el caso de tratamiento de seres humanos o animales, dependiendo del cuadro clínico se puede realizar una administración sistémica o local de la composición de acuerdo con la invención o del complejo de acuerdo con la invención. Se conocen técnicas correspondientes para la formulación y la administración por el estado de la técnica, véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Por ejemplo, las composiciones y los complejos de acuerdo con la invención se pueden administrar a un sujeto por vía intravenosa mediante un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina fisiológica). Para la inyección es razonable una formulación en solución acuosa, preferentemente en tampones fisiológicamente aceptables (por ejemplo, solución de Hanks, solución de Ringer o solución salina fisiológica tamponada). Para la administración parenteral, inclusive la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal se considera asimismo una solución acuosa u oleosa o una formulación sólida.

Una "biopelícula" es una acumulación de microorganismos (por ejemplo, bacterias), incluida en una matriz de polisacárido o proteína extracelular producida por los microorganismos sobre una superficie. La organización de bacterias en una biopelícula conduce a una capacidad de resistencia claramente mayor de toda la población frente a las más diversas influencias. Las biopelículas causadas por bacterias sobre dientes, la encía, las vías urinarias, el tracto digestivo o aparatos médicos tales como catéteres y prótesis conducen con frecuencia a graves infecciones (Costerton y col., Annu Rev. Microbiol 1995; 49: 711-45).

"Sal" o "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal aceptable desde puntos de vista farmacéuticos de un compuesto de la presente invención que puede liberar el principio activo farmacéuticamente eficaz o su metabolito activo después de la administración. Las sales de las composiciones y complejos de la presente invención se pueden derivar de ácidos y bases inorgánicas u orgánicas.

La antocianidina se puede usar en "forma pura" o "purificada", lo que significa que se han retirado los componentes indeseados. Las "antocianidinas" presentan la estructura básica reproducida a continuación.



Los sustituyentes en esta fórmula están seleccionados del grupo compuesto por hidrógeno, grupo hidroxilo y grupo metoxi.

5 La antocianidina usada de acuerdo con la invención es delfinidina. Las ciclodextrinas que pueden estar complejadas de acuerdo con la invención con la antocianidina delfinidina son oligosacáridos cíclicos de moléculas de glucosa con enlace α -1,4-glicosídico. La β -ciclodextrina posee siete unidades de glucosa. En una sulfoalquiler- β -ciclodextrina están eterificados los grupos hidroxilo de la unidad de glucosa en un alcohol sulfoalquílico. Por norma general, de acuerdo con la invención está eterificada únicamente una parte de los 21 grupos hidroxilo de una β -ciclodextrina. La preparación de sulfoalquileterciclodextrinas se conoce por el experto en la materia y se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.134.127 o WO 2009/134347 A2.

15 Se emplean grupos sulfoalquílicos en ciclodextrinas en el estado de la técnica para aumentar la hidrofilia o solubilidad en agua. La invención ha reconocido que los grupos sulfoalquílicos contribuyen en una medida particular a aumentar la estabilidad del complejo de antocianidinas y β -ciclodextrina sustituidas correspondientemente y mejora así sustancialmente la estabilidad en almacenamiento y capacidad de formulación de las antocianidinas particularmente sensibles a oxidación. El complejo de acuerdo con la invención se puede formular como solución acuosa o sólido estable en almacenamiento, como se mostrará todavía con más detalle más adelante.

20 De acuerdo con la invención se prefiere en particular la complejación con una sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SEB- β -CD). Un intento de explicación no limitante del alcance de protección para esto es que las unidades de sulfobutilo cargadas negativamente interactúan electrostáticamente con las antocianidinas cargadas positivamente y entre los grupos alquilo el grupo butilo posee la longitud óptima para posibilitar estéricamente una interacción correspondiente.

25 Con preferencia, el grado de sustitución de la ciclodextrina con grupos sulfoalquílicos asciende a 3-8, más preferentemente a 4-8, más preferentemente 5 a 8, más preferentemente 6 a 7. Las sulfobutiléter- β -ciclodextrinas adecuadas con un grado de sustitución medio de 6 a 7 están descritas, por ejemplo, en el documento mencionado WO 2009/134347 A2 y están disponibles en el mercado con el nombre comercial Captisol[®]. Se pueden usar asimismo las correspondientes ciclodextrinas con un grado de sustitución de 4-5, por ejemplo 4,2.

30 Se pueden usar las antocianidinas del grupo compuesto por aurantinidina, cianidina, delfinidina, europinidina, luteolinidina, pelargonidina, malvidina, peonidina, petunidina y rosinidina en forma de sal pura o complejada. La estructura química se corresponde con la fórmula I que se ha reproducido anteriormente con el siguiente patrón de sustitución

	R ³	R ⁴	R ⁵	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷
aurantinidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
delfinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
europinidina	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
luteolinidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
pelargonidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
malvidina	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
peonidina	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
petunidina	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
rosinidina	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃

En el marco de la invención se usa delfinidina. Además, es objeto de la invención el uso de acuerdo con la reivindicación de una solución acuosa de la composición de acuerdo con la invención o del complejo de acuerdo con la invención.

5 El complejo de acuerdo con la invención así como una solución acuosa correspondiente comprende las siguientes etapas:

- a) preparación de una solución acuosa de la sulfoalquiléter- β -ciclodextrina,
- b) adición de la antocianidina delfinidina y mezcla para la preparación del complejo.

10 En la etapa a) se prepara preferentemente una solución acuosa que contiene del 5 al 10 % en peso de la ciclodextrina usada. En el marco de la invención se prefiere en particular que el valor de pH de la solución acuosa se ajuste durante o después; sin embargo, preferentemente antes de la adición de antocianidina (delfinidina), a un valor de pH de 7 o menos, preferentemente 6 o menos, más preferentemente 5 o menos, más preferentemente 4 a 5. Está demostrado que a este valor de pH se puede ajustar una mayor concentración del complejo en solución acuosa.

15 La concentración de la antocianidina calculada como cloruro asciende preferentemente al menos a 0,5 mg/ml, más preferentemente al menos a 1,0 mg/ml, más preferentemente al menos a 1,5 mg/ml, más preferentemente a 2,0 mg/ml. El intervalo de concentración particularmente preferente de al menos 2,0 mg/ml se puede ajustar en el marco de una forma de realización preferente en particular en una solución acuosa con un valor de pH entre 4 y 5.

20 En el marco de la preparación de acuerdo con la invención, la mezcla de los constituyentes de la solución acuosa se puede producir mediante agitación; son intervalos de tiempo preferentes para la mezcla de 2 a 20 h. Preferentemente se trabaja en oscuridad para evitar una oxidación fotoinducida.

25 Otro objeto de la invención es el uso de acuerdo con la reivindicación de un sólido que contiene un complejo de acuerdo con la invención que se puede obtener de acuerdo con la invención mediante retirada del disolvente de una solución acuosa de acuerdo con la invención. La retirada se puede realizar preferentemente en el medio ante secado por congelación (liofilización). Tanto la solución acuosa de acuerdo con la invención como el sólido poseen una alta estabilidad del almacenamiento.

Ahora se va a describir la invención en lo sucesivo adicionalmente en los ejemplos con referencia a las figuras adjuntas.

I. Preparación de un complejo a partir de la antocianidina delfinidina y ciclodextrinas

1. Materiales empleados:

30 Se usan las siguientes ciclodextrinas:

α -CD	ID n.º: CYL-2322
β -CD	ID n.º: CYL-3190
γ -CD	ID n.º: CYL-2323
(2-hidroxipropil)- β -CD	ID n.º: L-043/07
sulfobutiléter- β -CD	ID n.º: 47K010111

El cloruro delfinidina se adquirió en la empresa Extrasynthese.

2. Determinación del contenido de delfinidina

Para la determinación del contenido de cloruro delfinidina en las composiciones que contienen delfinidinas se usó un procedimiento de HPLC de fase inversa. A este respecto se emplearon los siguientes reactivos:

35 agua purificada
metanol para la cromatografía
ácido fórmico, p.a.
ácido clorhídrico 1 M como solución volumétrica.

Como columna se usó una Waters X Bridge™ C18,35 μ l, 150 mm x 4,6 mm.

40 Las fases móviles eran las siguientes:

Canal A: agua 950 ml, metanol 50 ml, ácido fórmico 10 ml
Canal B: agua 50 ml, metanol 950 ml, ácido fórmico 10 ml

Se usó el siguiente programa de gradientes:

Tiempo [min]	Porcentaje canal B
0	0
5	0
25	60
30	100

tiempo de detección: 35 min
 tiempo posterior (posttime): 8 min
 caudal: 1 ml/min

- 5 volumen de inyección: 20 µl
 temperatura de columna: 30 °C +/- 2 °C
 detector UV-Vis: 530 µm para el ensayo, 275 µm para la detección de impurezas
 integrador: área

Soluciones y preparación de muestras:

- 10 solución de dilución 1: mezcla de 100 ml de metanol y 2,6 ml de HCL 1 M
 solución de dilución 2: mezcla de 100 ml de metanol al 40 por ciento y 2,6 ml de HCL 1 M

Solución de calibración: se preparó una solución de referencia de delfinidina pesando 10 mg de cloruro de delfinidina en un matraz de 10 ml y mediante disolución en la solución de dilución 1. Después de la solución se diluyó aproximadamente 10 veces con solución de dilución 2 para establecer una concentración aproximada de 0,1 mg/ml.

- 15 Se preparó del mismo modo la solución de calibración de control. Las soluciones de calibración se analizaron inmediatamente mediante HPLC, ya que en solución el cloruro de delfinidina es inestable.

Preparación de las soluciones de ensayo:

- 20 Para determinar el contenido de delfinidina de sólidos preparados de acuerdo con la invención (preparación véase más adelante) se pesaron aproximadamente 50 mg de esta composición en un matraz de 10 ml. A continuación se disolvió en la solución de dilución 2 y se continuó diluyendo con la misma solución de dilución 2 hasta ajustar una concentración aproximada de delfinidina de 0,1 mg/ml.

La determinación del contenido de delfinidina en las muestras se calculó recurriendo al software Agilent Chem-Station y usando la calibración con el patrón externo descrito.

Ejemplo 1: Complejación de delfinidina con SBE-β-CD

- 25 En este ejemplo se examina la complejación de delfinidina por distintas ciclodextrinas y la solubilidad del complejo en solución acuosa.

Se prepararon soluciones acuosas neutras que contenían el 10 % en peso de la respectiva ciclodextrina. En el caso de β-CD se eligió a causa de la escasa solubilidad una concentración de únicamente el 2 % en peso.

- 30 Se cargaron en cada caso 5 ml de las soluciones acuosas de ciclodextrina y de agua pura en matraces de vidrio. A continuación se añadió un exceso de cloruro de delfinidina. La cantidad en exceso requerida era 10 mg para las soluciones de α-, β- y γ-ciclodextrina y 15 mg para las soluciones de HPBCD (2-hidroxipropil-β-ciclodextrina) y SBE-β-CD.

Las suspensiones se agitaron en la oscuridad durante 20 h a 30 °C. A continuación se filtró a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm.

- 35 En la siguiente Tabla 1 están reproducidas las solubilidades que se pueden alcanzar.

Ciclodextrina	Concentración de ciclodextrina	Cloruro de delfinidina
-	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

Se reconoce que la complejación y el aumento causado por ello de la solubilidad para SBE- β -CD es bastante mejor que para las demás ciclodextrinas.

Ejemplo 2: Influencia del valor de pH

5 En este ejemplo se examinó la influencia del valor de pH sobre la solubilidad de una delfinidina-SBE- β -CD en solución acuosa. Según la instrucción del ejemplo 1 se prepararon soluciones acuosas de SBE- β -CD; sin embargo, estas soluciones se ajustaron con HCL 1 M a los valores de pH ácidos mencionados en la Tabla 2. A continuación se añadió cloruro de delfinidina según la instrucción del ejemplo 1 y se continuó procesando, como única divergencia se limitó el tiempo de agitación a 2,5 h. En la siguiente Tabla 2 están reproducidos los resultados

pH	Cloruro de delfinidina
6,0	0,60 mg/ml
4,8	2,12 mg/ml
4,1	2,03 mg/ml

10 Se reconoce que a valores de pH entre 4 y 5 aumenta la solubilidad del cloruro de delfinidina complejado a aproximadamente en el factor 3 con respecto al valor de pH neutro.

Ejemplo 3 Preparación de un sólido de acuerdo con la invención

En este ejemplo se formula un complejo de acuerdo con la invención como sólido. Con fines comparativos se preparan un complejo de delfinidina/HPBCD así como una formulación de delfinidina/almidón como sólido.

15 Ejemplo 3.1: Delfinidina/SBE- β -CD

Se disolvieron 5 g de SBE- β -CD en 40 ml de agua destilada hasta dar una solución clara. El valor de pH de la solución se ajustó mediante HCL 1 M a 4,8. A continuación se añadieron 0,11 g de cloruro de delfinidina y se agitaron en oscuridad durante 2 h a 27 °C. El líquido homogéneo se filtró al vacío a través de un filtro de membrana de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 μ m. La solución se congeló y a continuación se liofilizó a -48 °C y una presión de aproximadamente 10,3 Pa (77 mTorr). El liofilizado se molió y se tamizó a través de un tamiz de ancho de malla 0,3 mm.

20 Ejemplo 3.2: Delfinidina/HPBCD

Se trabajó del mismo modo que en el Ejemplo 3.1, sin embargo se retiró mediante filtración durante la filtración una cantidad significativa de material, lo que indica que la solubilización fue claramente menos eficaz que en el caso del uso de SBE- β -CD de acuerdo con el ejemplo 3.1.

30 Ejemplo 3.3 Formulación de delfinidina/almidón

Se suspendieron 5 g de almidón en 40 ml de agua destilada. Se obtuvo una solución blanca. Se ajustó el pH de la solución con HCL 1 M a 4,6. A continuación se añadieron 0,11 g de cloruro de delfinidina y se agitó en oscuridad durante 2 h a 27 °C. El líquido homogéneo obtenido se liofilizó como en el Ejemplo 3.1, se molió y se tamizó. El ejemplo 3.1 es de acuerdo con la invención, en el caso de los ejemplos 3.2 y 3.3 se trata de ejemplos comparativos.

Ejemplo 4: Ensayos de estabilidad

Los sólidos de acuerdo con los ejemplos 3.1 a 3.3 se almacenaron en las siguientes condiciones:

- 8 días a temperatura ambiente en recipientes de vidrio ambarinos roscados,
- a continuación durante 22 días a temperatura ambiente en recipientes de vidrio con atmósfera de oxígeno en oscuridad.

Los últimos 22 días del almacenamiento que se ha descrito anteriormente se llevaron a cabo en viales de vidrio con un volumen de 20 ml. Respectivamente 250 mg de las muestras almacenadas ya previamente durante 8 días se cargaron allí, los viales se cerraron con un tapón de goma y se obturaron. Mediante dos agujas de inyección se lavó el espacio de cabeza de los viales con oxígeno puro. Las muestras se almacenaron a continuación en oscuridad.

40 Se determinó el contenido de delfinidina de los sólidos (calculado como cloruro de delfinidina e indicado en % en peso) mediante el procedimiento de HPLC descrito anteriormente. En la siguiente Tabla 3 se encuentran los resultados.

	Evolución en el tiempo [días]				
	Inicio	2	8	19	30
Ejemplo 3.1	1,69	1,52	1,55	1,40	0,93
Ejemplo 3.2	1,30	1,20	1,14	1,03	0,68
Ejemplo 3.3	1,60	1,59	1,56	1,53	1,15

5 Los resultados muestran que de acuerdo con la invención se puede preparar un complejo de delfinidina que posee incluso con una atmósfera de oxígeno puro una alta estabilidad y, por lo tanto, buena capacidad de almacenamiento. Además, el complejo posee una buena solubilidad en soluciones acuosas, en particular ligeramente ácidos, de tal manera que se puede formular delfinidina de acuerdo con la invención de forma diversa. La estabilidad del sólido de acuerdo con la invención es similarmente buena a una formulación con almidón (ejemplo 3.3), este ejemplo comparativo no se puede formular, no obstante, en una solución acuosa.

Ejemplo 5: Ensayos de estabilidad en solución acuosa

10 Para la determinación del contenido de cloruro de delfinidina en soluciones que contienen delfinidina se usó un procedimiento de HPLC en fase inversa de manera similar al que ya se ha descrito anteriormente. A este respecto se emplearon los siguientes reactivos:

15 agua purificada
metanol para cromatografía
ácido fórmico, p.a.
ácido clorhídrico 1 M como solución volumétrica

Como columna se usó una Waters X Bridge™ C18,35 µl, 150 mm x 4,6 mm.

Las fases móviles eran las siguientes:

20 Canal A: agua 770 ml, metanol 230 ml, ácido fórmico 10 ml
Canal B: agua 50 ml, metanol 950 ml, ácido fórmico 10 ml

Se usó el siguiente programa de gradientes:

Tiempo [min]	Porcentaje canal B
0	0
5	0
20	20
25	100

25 tiempo de detección: 25 min
tiempo posterior (posttime): 8 min
caudal: 1 ml/min
volumen de inyección: 20 µl
temperatura de columna: 30 °C +/- 2 °C
detector UV-Vis: 530 µm para el ensayo, 275 µm para la detección de impurezas
integrador: área

30 Soluciones y preparación de muestras:

solución de dilución 1: mezcla de 100 ml de metanol y 2,6 ml de HCL 1 M

solución de dilución 2: mezcla de 100 ml de metanol al 50 % y 2,6 ml de HCL 1 M

35 Solución de calibración: se preparó una solución de referencia de delfinidina mediante pesada de 10 mg de cloruro de delfinidina en un matraz de 10 ml y mediante solución en la solución de dilución 1. Después de la solución se diluyó aproximadamente 10 veces con solución de dilución 2 para establecer una concentración aproximada de 0,1 mg/ml.

Se preparó del mismo modo la solución de calibración de control. Las soluciones de calibración se analizaron inmediatamente mediante HPLC, ya que el cloruro de delfinidina es inestable en solución.

Preparación de las soluciones de ensayo:

5 Para la determinación del contenido de delfinidina de una solución acuosa de acuerdo con la invención se disolvió delfinidina/SBE- β -CD del ejemplo 3.1 (de acuerdo con la invención) y delfinidina (ejemplo comparativo en solución al 0,9 % de NaCl hasta ajustar una concentración inicial (con respecto a la delfinidina) de 1,584 mg/ml (ejemplo de acuerdo con la invención) o 0,0216 mg/ml (ejemplo comparativo). Las soluciones se prepararon a temperatura ambiente y a continuación se almacenaron a 37 °C en oscuridad en viales cerrados.

Se determinó el contenido de delfinidina después de 1, 2, 3 y 4 h. La siguiente tabla indica el contenido establecido como porcentaje de la concentración inicial que se ha mencionado anteriormente.

Tiempo [h]	Delfinidina no complejada	Delfinidina/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 La determinación del contenido de delfinidina en las muestras se calculó recurriendo al software Agilent Chem-Station usando la calibración con el patrón externo descrito.

II. Efecto de la antocianidina delfinidina sobre bacterias

1. Cepas de ensayo y estructura del ensayo

Se seleccionaron las siguientes cepas:

- 15 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, aislado clínico positivo a biopelícula de una infección de oído externo (cepa de referencia);
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 aislado clínico positivo a biopelícula de orina de un paciente hospitalario ESBL+(por sus siglas en inglés de beta-lactamasa de espectro extendido) (cepa de referencia);
- 20 - *Staphylococcus aureus* MRSA2318 aislado clínico positivo a biopelícula de secreto traqueal de 22.04.2009 (hospital universitario de Würzburg, hospital y policlínica de neurocirugía I, estación de cuidados intensivos);
- *Staphylococcus aureus* MRSA2855 aislado clínico positivo a biopelícula de cultivo de sangre de 22.04.2009 (hospital universitario de Würzburg, hospital médico y policlínica I, ITS);
- *Staphylococcus aureus* MSSA1155 aislado clínico positivo a biopelícula del 27.04.2004 de frotis de cavidad abdominal (hospital universitario de Würzburg, urología, planta B).

25 Las cepas que se han mencionado anteriormente se seleccionaron a causa de su marcada formación de biopelícula como particularmente adecuadas para examinar el efecto de las composiciones de acuerdo con la invención sobre bacterias, como se desprende de la Figura 1.

30 La Figura 1 muestra los resultados de una formación de biopelícula estática después de 48 horas para distintas cepas de las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* así como cepas de MRSA y MSSA en los experimentos independientes. Se determinó el crecimiento y el análisis de la biopelícula en un modelo estático mediante el ensayo de violeta cristal de acuerdo con el protocolo básico 1 en Current Protocols in Microbiology 1B.1.2 -1B.1.4 "MICROTITER PLATE BIOFILM ASSAY" [publicado en línea en agosto 2011 en Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/9780471729259.mc01b01s22].

2. Análisis de principios activos

35 El examen de la influencia del delfinidina sobre el crecimiento bacteriano y la formación de biopelícula bacteriana se realizó mediante

- 40 a) la valoración visual del crecimiento bacteriano (modelo estático),
 b) ensayo de vitalidad (siembra sobre placas de agar sangre),
 c) análisis de la biopelícula en un modelo estático mediante el ensayo de violeta cristal tal como se ha descrito anteriormente en el apartado 1.

45 En primer lugar se dispusieron 1×10^6 bacterias/pocillo en 100 μ l de medio celular RPMI-1640 con rojo fenol como indicador del valor de pH (y, por tanto, como indicador indirecto del crecimiento bacteriano) en una placa de cultivo celular de poliestireno de 96 pocillos. Como control sirvió RPMI-1640 estéril. A continuación se añadió delfinidina disuelta en RPMI-1640 de una serie de dilución creada previamente y la placa de cultivo celular se incubó durante 48 horas a 37 °C, cuyo resultado visual está representado en la Figura 2. El cambio de color de rojo (fenol) a amarillo está correlacionado con la intensidad del crecimiento bacteriano.

Están representadas siembras de las bacterias de la placa de cultivo en las Figuras 3 (*P. aeruginosa* ATCC9027), 4 (*K. pneumoniae* ATCC700603), 5 (MRSA2318), 6 (MRSA2855) y 7 (MSSA1155). “ST_26.1.11” y “ST_28.1.11” en las siembras en las placas de agar indica la respectiva fecha de siembra de los ensayos por duplicado.

5 Con la misma estructura de ensayo se realizó el análisis de la biopelícula mediante el ensayo de violeta cristal tal como se ha descrito anteriormente en el apartado 1, cuyo resultado después de 48 horas de incubación y ensayo de violeta cristal en la Figura 8 en su totalidad y en las Figuras 9-13 en cada caso después de la medición de la densidad óptica se ha representado tratados gráficamente para las respectivas concentraciones de delfinidina en las cepas bacterianas individuales (Figura 9: *P. aeruginosa* ATCC9027, Figura 10: *K. pneumoniae* ATCC700603, Figura 11: MRSA2318, Figura 12: MRSA2855, Figura 13: MSSA1155).

10 Los resultados de ensayo se pueden resumir del siguiente modo:

- La delfinidina no posee ninguna influencia inhibitora sobre el crecimiento y la formación de biopelícula de las bacterias gram positivas *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. En el caso de *K. pneumoniae* incluso parece simularse todavía la formación de biopelícula.
 - Por el contrario, la delfinidina posee un efecto inhibitor tanto sobre el crecimiento como sobre la formación de biopelícula de *S. aureus* (tanto MSSA como MRSA). Este efecto disminuye dependiendo de la dosis.
- 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de delfinidina o sus sales o de un complejo que comprende delfinidina para la neutralización al menos parcial de un objeto contaminado con bacterias seleccionadas del grupo compuesto por *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos y *Staphylococcus aureus* sensibles a antibióticos, no siendo el objeto un animal vivo y no siendo un ser humano vivo y conduciendo dicha neutralización al menos parcial a una destrucción o una disfunción al menos parciales o a la inactivación o la limitación de la multiplicación de las bacterias *Staphylococcus aureus* o a una limitación de la formación de biopelícula mediada por *Staphylococcus aureus*.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** los antibióticos están seleccionados del grupo compuesto por
- antibióticos β-lactámicos, incluyendo penicilina, cefalosporinas, carbapenemos y monobactamos,
 - quinolonas,
 - tetraciclinas,
 - aminoglucósidos,
 - 15 - eritromicina,
 - sulfonamidas y
 - vancomicina.
- 20 3. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la delfinidina o sus sales o el complejo que comprende delfinidina están contenidos en una solución acuosa o un sólido.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** la solución acuosa o el sólido son una adición de materiales o una solución de enjuague.
5. Procedimiento para el tratamiento de un objeto, no siendo el objeto un animal vivo y no siendo un ser humano vivo, que comprende
- a) la facilitación
 - 25 i) de delfinidina o sus sales o de un complejo que comprende delfinidina o una solución acuosa o un sólido que contienen delfinidina o sus sales o un complejo que comprende delfinidina y
 - ii) un objeto no vivo del que se sospecha que está contaminado con bacterias seleccionadas del grupo compuesto por *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos y *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos, y
 - 30 b) el tratamiento del objeto con delfinidina o sus sales o el complejo que comprende delfinidina o la solución acuosa o el sólido en tales condiciones que las bacterias de las que se sospecha que contaminan el objeto se destruyen o disuelven o inactivan al menos parcialmente o se evita una formación de biopelícula mediada por *Staphylococcus aureus*.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el objeto es un cuerpo animal o una parte del mismo.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** el cuerpo animal o partes del mismo están seleccionados del grupo compuesto por
- cuerpo de un bobino o una parte del mismo,
 - cuerpo de un cerdo o una parte del mismo,
 - 40 - cuerpo de ave o una parte del mismo y
 - cuerpo de un animal de vida acuática o una parte del mismo.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el objeto es un alimento y/o un pienso.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** el objeto es un alimento y/o un pienso, estando seleccionado el alimento y/o el pienso del grupo compuesto por
- 45 - un producto cárnico,
 - un producto cárnico procesado,
 - un producto lácteo,
 - hortalizas y sus partes y
 - fruta y sus partes.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** los objetos están seleccionados del grupo compuesto por
- a) dispositivos y/o equipos y/o equipamientos y/o aparatos para

- aplicaciones médicas,
 - el procesamiento de alimentos,
 - el sector militar,
- 5 b) equipamientos protectores,
 c) objetos domésticos,
 d) equipos de edificios y
 e) obras.
- 10 11. Uso no terapéutico de delfinidina o sus sales o un complejo que comprende delfinidina o una solución acuosa o un sólido que contienen delfinidina o sus sales o un complejo que comprende delfinidina en el tratamiento de un objeto del que se sospecha que está infectado con bacterias resistentes a antibióticos o sensibles a antibióticos de la especie *Staphylococcus aureus*.
- 15 12. Delfinidina o sus sales o complejo que comprende delfinidina o solución acuosa o sólido que contienen delfinidina o sus sales o un complejo que comprende delfinidina para el uso en el tratamiento o la profilaxis de seres humanos o animales de los que se sospecha que están infectados por bacterias resistentes a antibióticos o sensibles a antibióticos de la especie *Staphylococcus aureus*.
- 20 13. Delfinidina o sus sales o complejo que comprende delfinidina o solución acuosa o sólido para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizados porque** la infección causa enfermedades con síntomas que están seleccionados del grupo compuesto por:
- infecciones cutáneas, inclusive forúnculos y carbúnculos,
 - piomiositis,
 - neumonía,
 - endocarditis,
 - síndrome de choque tóxico,
 - septicemia y
 - 25 - mastitis.
- 30 14. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5-10 o uso de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizados porque** el complejo que comprende delfinidina
- comprende sulfoalquiléter- β -ciclodextrina, preferentemente una sulfobutiléter- β -ciclodextrina y
 - el grado de sustitución de la ciclodextrina con grupos sulfoalquiléter asciende preferentemente a 3-8, más preferentemente a 4-8, más preferentemente de 5 a 8, de forma particularmente preferente a 6-7.
- 35 15. Complejo que comprende delfinidina o solución acuosa o sólido que contienen un complejo que comprende delfinidina para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 y 13, **caracterizados porque** el complejo que comprende delfinidina
- comprende sulfoalquiléter- β -ciclodextrina, preferentemente una sulfobutiléter- β -ciclodextrina y
 - el grado de sustitución de la ciclodextrina con grupos sulfoalquiléter asciende preferentemente a 3-8, más preferentemente a 4-8, más preferentemente de 5 a 8, de forma particularmente preferente a 6-7.

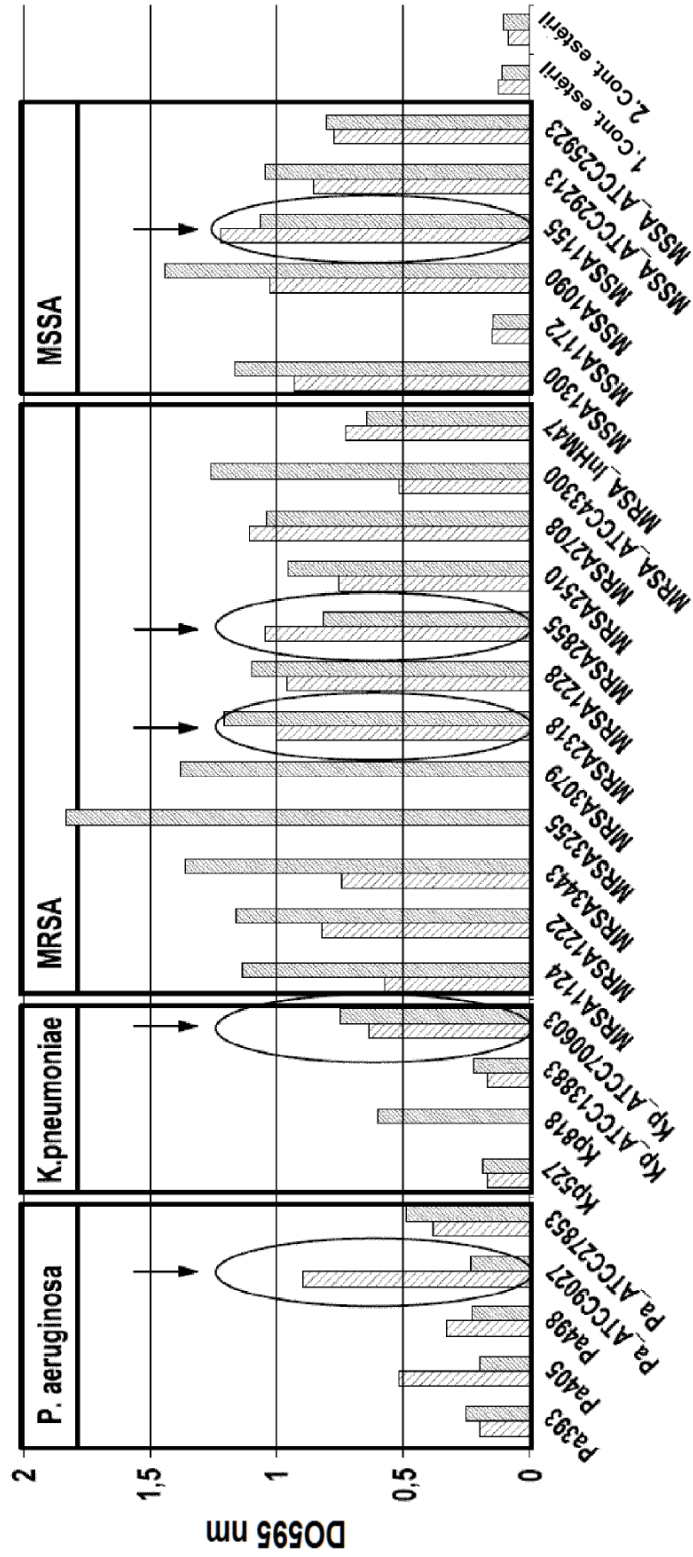


Figura 1

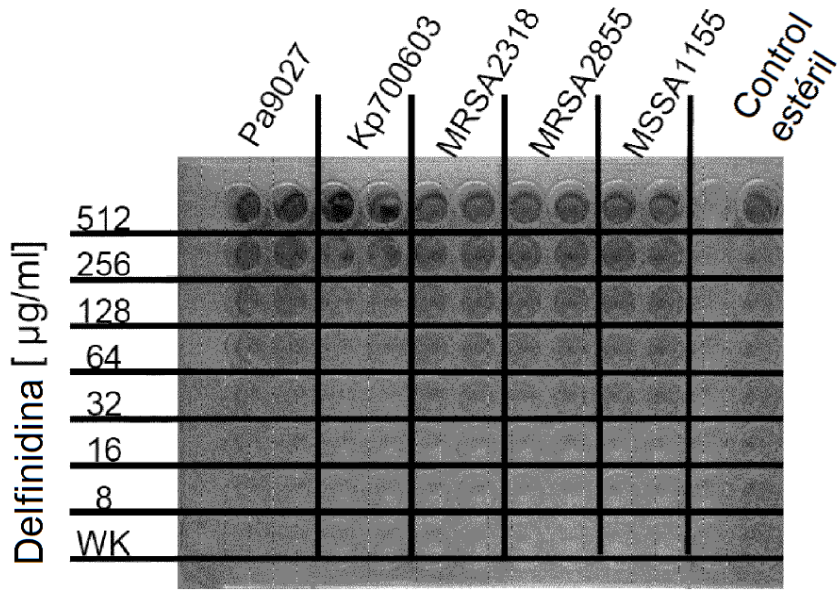


Figura 2

P. aeruginosa ATCC9027

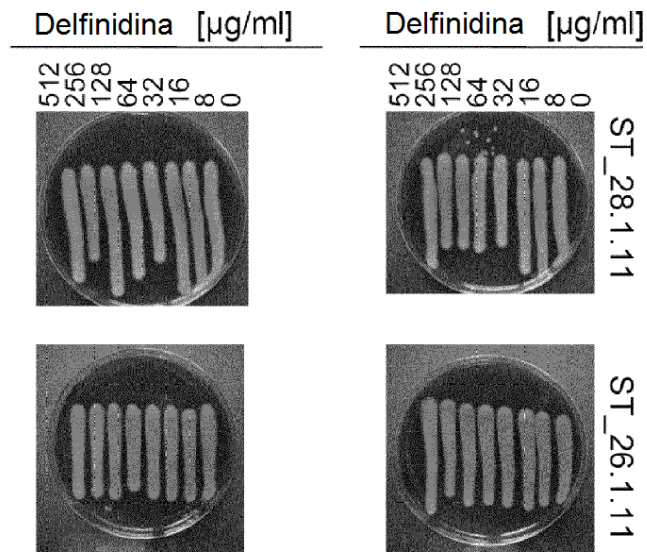


Figura 3

***K. pneumoniae* ATCC700603**

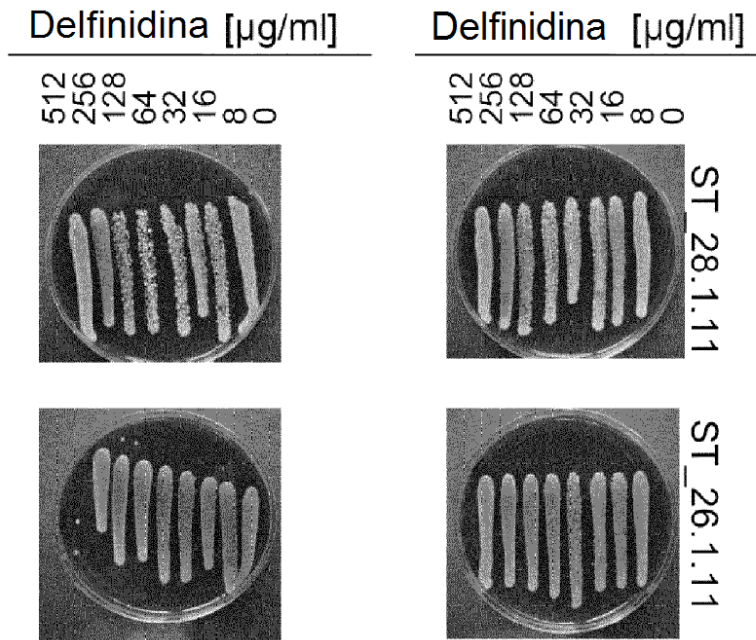


Figura 4

MRSA2318

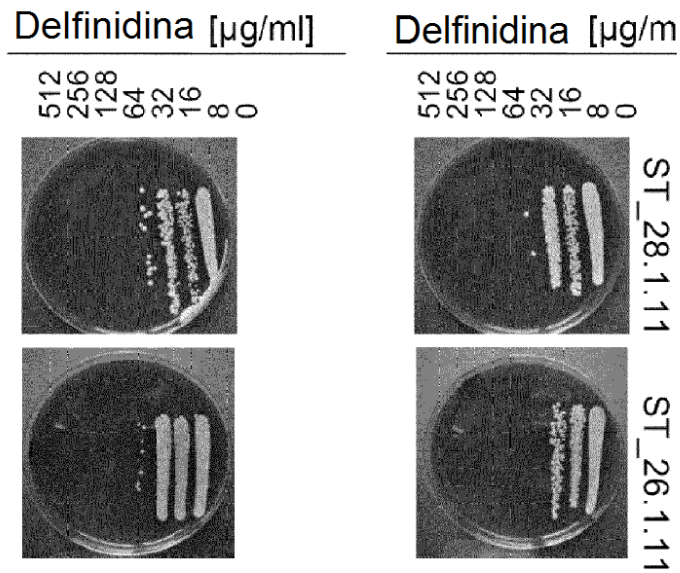


Figura 5

MRSA2855

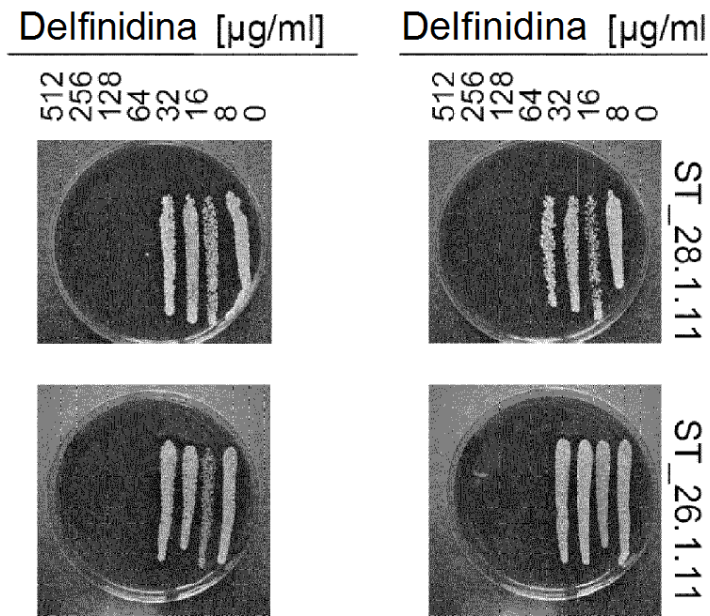


Figura 6

MSSA1155

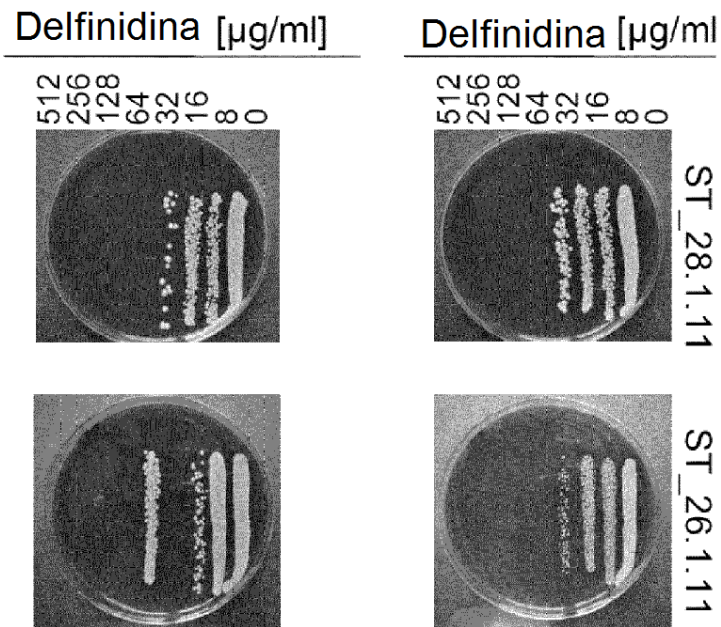


Figura 7

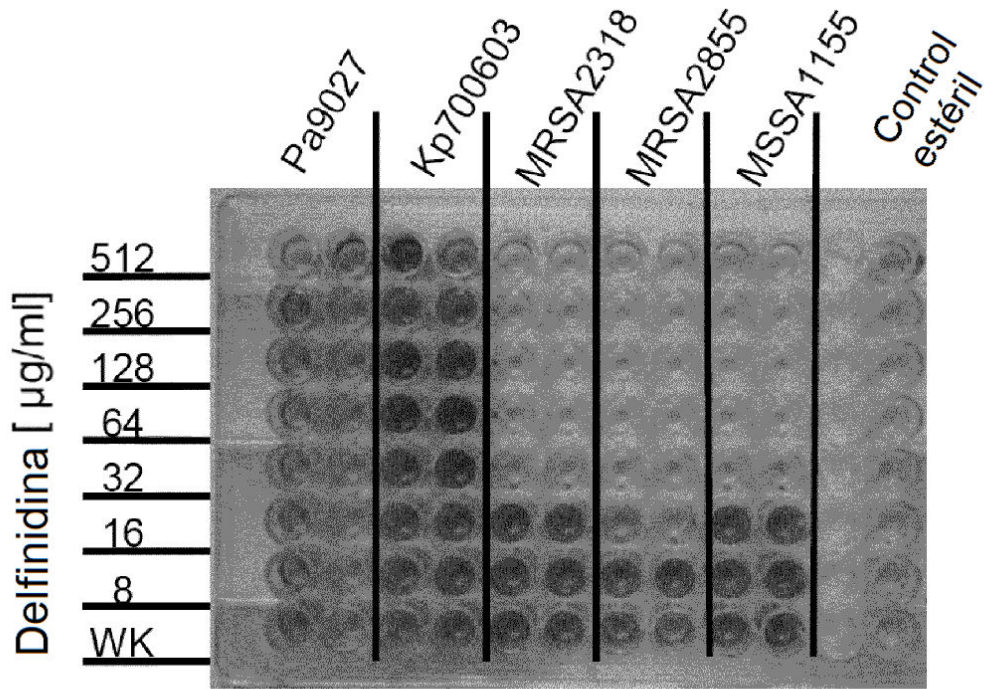


Figura 8

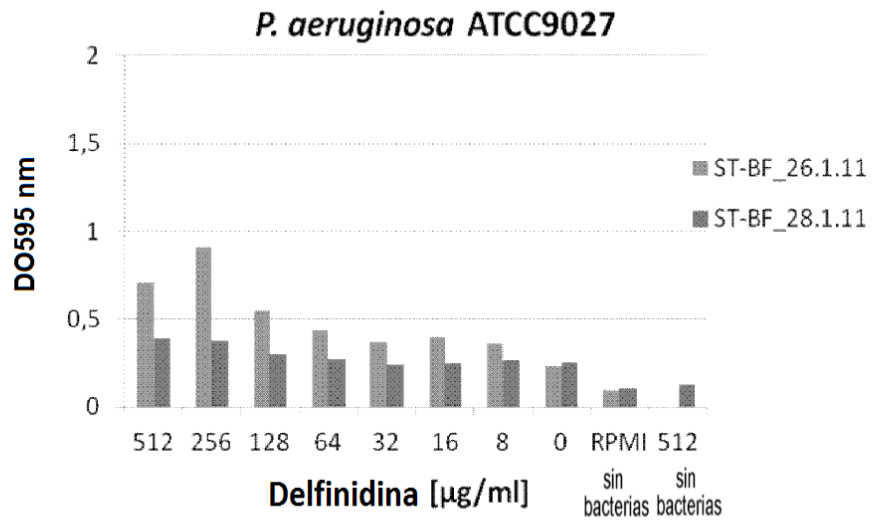


Figura 9

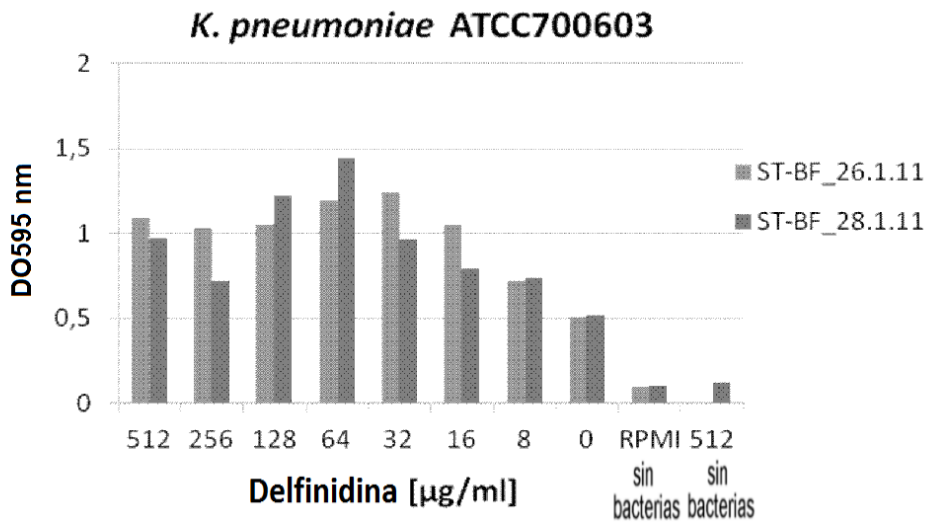


Figura 10

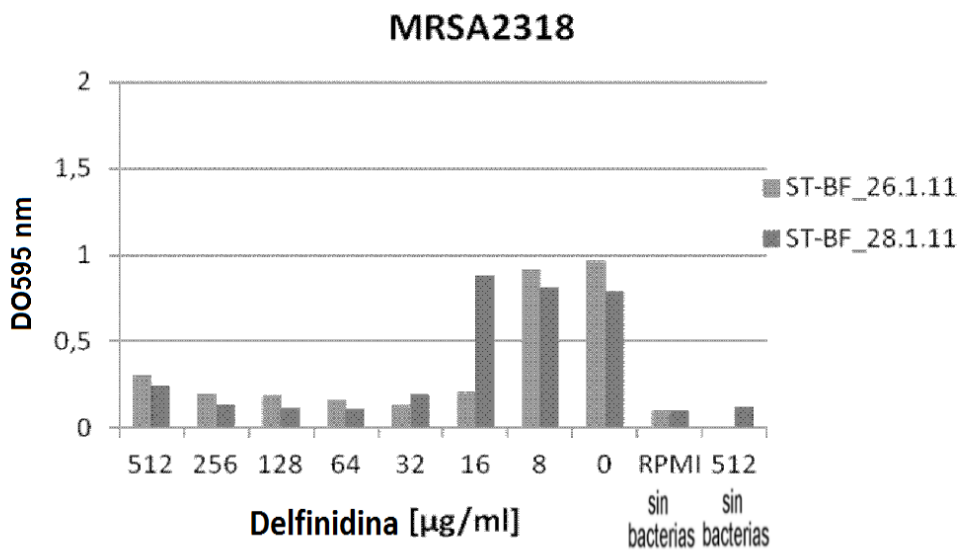


Figura 11

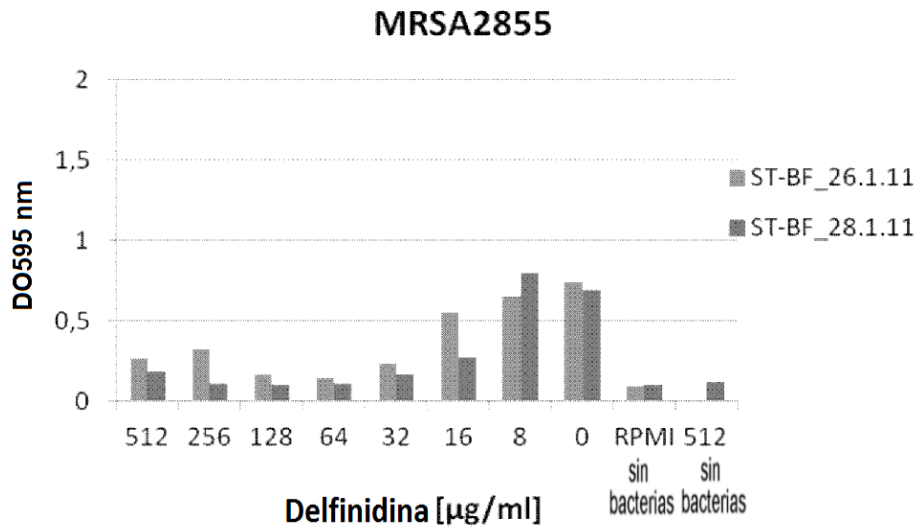


Figura 12

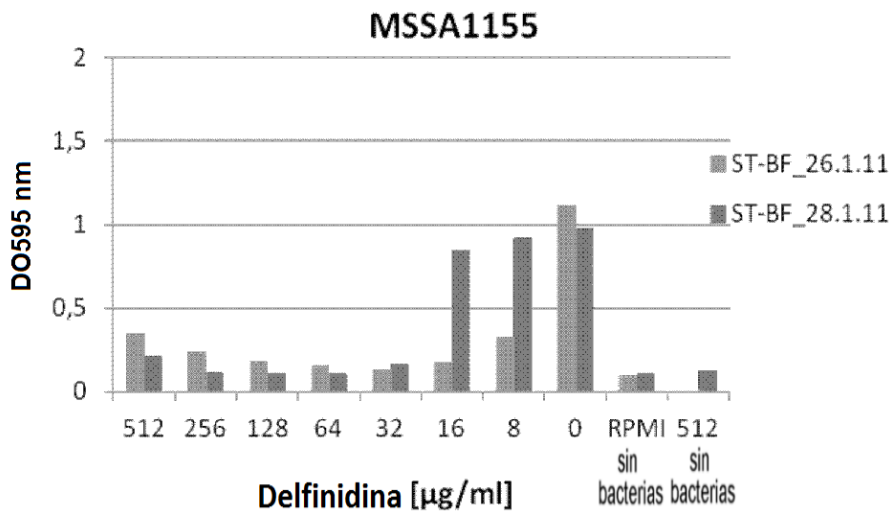


Figura 13