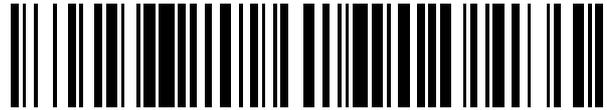


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 291**

51 Int. Cl.:

**C09B 61/00** (2006.01)

**C08B 37/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2015 PCT/EP2015/054084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15128437**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2015 E 15706257 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 3110890**

54 Título: **Complejo de antocianidina**

30 Prioridad:

**28.02.2014 EP 14157248**

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

**25.04.2018**

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 2 665 291 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

Complejo de antocianidina

La invención se refiere a un complejo a partir de una antocianidina y una ciclodextrina.

5 Las antocianidinas son colorantes citocromos, los cuales tienen presencia en la mayoría de las plantas terrestres más altas. Las antocianidinas no tienen azúcares (aglicona) y están estrechamente emparentadas con las antocianinas con contenido de azúcares. Las antocianidinas son colorantes y tienen propiedades antioxidantes.

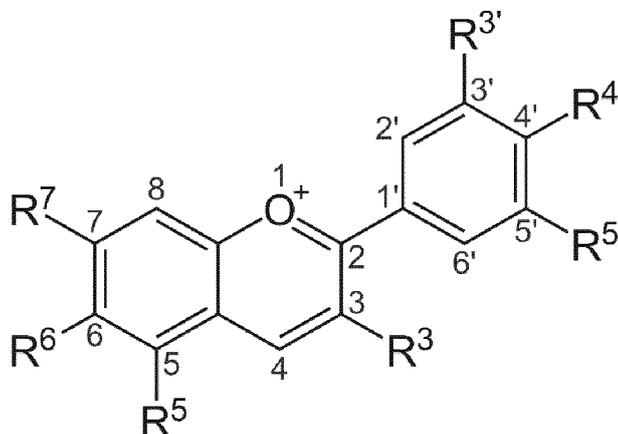
Del documento WO 2013/144297 A1 ya se conoce la complejación de antocianidinas con sulfoalquiléter- $\beta$ -ciclodextrinas.

10 La invención se basa en la tarea de poner a disposición antocianidinas en forma muy manejable, que pueda ser formulada y estable en almacenamiento y relativamente concentrada.

Esta tarea se soluciona mediante un complejo a partir de una antocianidina y una  $\beta$ -ciclodextrina metilada.

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

Las antocianidinas presentan la estructura básica que se reproduce a continuación.



15 Los sustituyentes en esta fórmula están elegidos del grupo consistente en hidrógeno, grupo hidroxilo y grupo metoxilo.

20 Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos de moléculas de glucosa  $\alpha$ -1,4-glicosídicamente enlazadas. La  $\beta$ -ciclodextrina tiene siete unidades de glucosa. En el caso de una  $\beta$ -ciclodextrina metilada los grupos hidroxilo de la unidad de glucosa están provistos de grupos metilo. Según la invención normalmente solo está metilada una parte de los 21 grupos hidroxilo de una  $\beta$ -ciclodextrina.

La preparación de  $\beta$ -ciclodextrinas metiladas es habitual para el experto, pueden obtenerse productos correspondientes por ejemplo de la empresa Wacker Chemie bajo la denominación Cavasol®.

25 La invención ha puesto de manifiesto que de manera sorprendente con  $\beta$ -ciclodextrinas metiladas las antocianidinas como la delphinidina pueden complejarse en una concentración notablemente más alta que en el estado de la técnica con otras ciclodextrinas. Esto es sorprendente en particular porque por ejemplo en el documento WO 2013/144297 A1 se llevaron a cabo pruebas de complejación con una serie de ciclodextrinas, en las cuales la concentración o la carga del complejo con antocianidina eran inferiores a razón de magnitudes.

30 La presente invención posibilita de esta manera poner a disposición antocianidinas en alta concentración y con ello en altas dosificaciones preferentemente en forma acuosa o soluble en agua y de esta manera hacer accesible de forma sencilla una administración *in vivo*, por ejemplo, una administración i.v. Es una ventaja particular de la invención además de ello que las ciclodextrinas metiladas, en particular RAMEB, no son o en todo caso son mínimamente tóxicas en las concentraciones usadas, en particular no dan lugar *in vivo* a ninguna o en todo caso a mínimas e inofensivas hemólisis.

35 De manera preferente el grado de sustitución de la  $\beta$ -ciclodextrina con grupos metilo es de 10 a 15, preferentemente de 11 a 14, de manera más preferente aún de 12 a 13.

De manera particularmente preferente se usa como  $\beta$ -ciclodextrina metilada RAMEB (*randomly methylated  $\beta$ -Cyclodextrin*) ( $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente). Se trata de una  $\beta$ -ciclodextrina metilada estadísticamente con un grado de sustitución de aproximadamente 1,8 grupos metilo por unidad de azúcar o 12,5 grupos metilo por

anillo de ciclodextrina (DS *degree of substitution* (grado de substitución) aproximadamente 12,5). RAMEB puede obtenerse comercialmente por ejemplo de la empresa Wacker Chemie bajo la denominación Cavasol® W7 M Pharma.

- 5 Las antocianidinas complejadas según la invención están elegidas de manera preferente del grupo consistente en aurantinidina, cianidina, delfinidina, europinidina, luteolinidina, pelargonidina, malvidina, peonidina, petunidina y rosinidina.

La estructura química se corresponde con la fórmula I reproducida arriba con el siguiente patrón de substitución

	R <sup>3'</sup>	R <sup>4'</sup>	R <sup>5'</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
Aurantidinina	-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 <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH
Luteolinidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Pelargonidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidina	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>

Es particularmente preferente en el marco de la invención un complejo con delfinidina.

- 10 Es además de ello objeto de la invención una solución acuosa de un complejo según la invención.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de un complejo según la invención, así como de una solución acuosa correspondiente, con los pasos:

- a) preparar una solución acuosa de la  $\beta$ -ciclodextrina metilada,
- b) adición de la antocianidina y mezclar para la preparación del complejo.

- 15 En el paso a) se prepara preferentemente una solución acuosa, la cual contiene de un 10 a un 60 % en peso, de manera más preferente de un 20 a un 50 % en peso, de manera más preferente aún de un 30 a un 50 % en peso de la ciclodextrina usada.

- 20 Es particularmente preferente en el marco de la invención cuando el valor de pH de la solución acuosa durante o tras, preferentemente sin embargo antes de la adición de la antocianidina, de manera preferente delfinidina, se ajusta a un valor de pH de 7 o menos, preferentemente de 6 a 7. Ha podido verse que en el caso de este valor de pH puede ajustarse una concentración más alta del complejo en solución acuosa.

La concentración de la antocianidina, calculada como cloruro, es de preferentemente al menos 10 mg/ml, de manera más preferente de al menos 20 mg/ml, de manera más preferente aún de al menos 50 mg/ml, de manera más preferente de al menos 80 mg/ml. Pueden alcanzarse sin problemas concentraciones de por ejemplo 100 mg/ml.

- 25 Es también objeto de la invención una sustancia sólida que contiene un complejo a partir de una antocianidina y una  $\beta$ -ciclodextrina metilada, que puede obtenerse mediante eliminación del disolvente de una solución acuosa. La eliminación del disolvente de la solución acuosa puede producirse mediante procedimientos habituales para el experto, como por ejemplo deshidrocongelación (liofilización). Esta sustancia sólida según la invención es estable en almacenamiento a largo plazo y puede mezclarse sin problemas nuevamente con agua dando lugar a una solución acuosa y con ello, que puede ser administrada *in vivo*. Tanto la solución acuosa según la invención, como también la sustancia sólida, tienen una alta estabilidad de almacenamiento.

- 30 En el marco de la preparación según la invención la mezcla de los componentes de la solución acuosa puede producirse mediante agitación, son espacios de tiempo preferentes para la mezcla de 2 a 20 h. De manera preferente se trabaja en la oscuridad para evitar la oxidación inducida por la luz.

- 35 A continuación se explican ejemplos de realización de la invención.

#### 1. Materiales usados:

Se obtuvo RAMEB de la empresa Wacker Chemie y cloruro de delfinidina de la empresa Extrasynthese.

2. Determinación del contenido de delfinidina

Para la determinación del contenido de cloruro de delfinidina en los compuestos con contenido de delfinidina se hizo uso de un procedimiento de HPLC de fase reversa. En este caso se usaron los siguientes reactivos:

- 5 Agua purificada
- Metanol para la cromatografía
- Ácido fórmico, p. a.
- 1 M de ácido clorhídrico como solución volumétrica.

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

Las fases móviles fueron como se indica a continuación:

- 10 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 utilizó el siguiente programa de gradientes:

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

- 15 Tiempo de parada: 35 min
- Tiempo de seguimiento (*posttime*): 8 min
- Velocidad de flujo: 1 ml/min
- Volumen de inyección: 20 µl
- Temperatura de columna: 30 °C +/- 2 °C
- 20 Detector UV-Vis: 530 µm para el ensayo químico, 275 µm para la detección de ensuciamientos
- Integrador: superficie

Soluciones y preparación de muestras:

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

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

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

La solución de calibración de control se preparó de la misma manera. Las soluciones de calibración se analizaron directamente mediante HPLC, dado que el cloruro de delfinidina no es estable en solución.

- 30 Preparación de las soluciones de prueba:

Para la determinación del contenido de delfinidina de sustancias sólidas preparadas según la invención (preparación véase más abajo) se incorporaron aproximadamente 50 mg de esta composición en un matraz de 10 ml. A continuación, se disolvió en solución de dilución 2 y se continuó diluyendo con la misma solución de dilución 2 hasta el ajuste de una concentración de delfinidina aproximada de 0,1 mg/ml.

- 35 La determinación del contenido de delfinidina en las muestras se calculó con la ayuda de Agilent Chem-Station Software mediante el uso de la calibración con el estándar externo descrito.

**Ejemplo 1**

Complejación de delfinidina con RAMEB.

Se prepararon soluciones de 40 % en peso de RAMEB en agua.

- 40 Se introdujo 1 ml de la solución de ciclodextrina acuosa en un matraz de vidrio. A continuación se añadieron 250 mg de cloruro de delfinidina.

La suspensión se agitó durante 4 h a 30 °C en la oscuridad. A continuación se filtró a través de un filtro de membrana con 0,8 µm de tamaño de poro.

### **Ejemplo 2**

Preparación de una sustancia sólida según la invención

- 5 La solución según el ejemplo 1 se congeló y a continuación se liofilizó a -48 °C y con una presión de aproximadamente 10,3 Pa (77 mTorr). Se obtuvieron 0,36 g de una sustancia sólida con un contenido de delfinidina de 31,1 % en peso.

Esta sustancia sólida pone a disposición delfinidina de alta concentración en forma almacenable y administrable *in vivo* sin mayor problema. El contenido del complejo de delfinidina es mucho más alto que en el estado de la técnica.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Complejo de una antocianidina y una  $\beta$ -ciclodextrina metilada.
2. Complejo según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el grado de sustitución de la  $\beta$ -ciclodextrina con grupos metilo es de 10 a 15, preferentemente de 11 a 14, de manera más preferente aún de 12 a 13.
- 5 3. Complejo según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la  $\beta$ -ciclodextrina metilada es RAMEB (*randomly methylated  $\beta$ -Cyclodextrin*) ( $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente).
4. Complejo según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** las antocianidinas están elegidas del grupo consistente en aurantinidina, cianidina, delphinidina, europinidina, luteolinidina, pelargonidina, malvidina, peonidina, petunidina y rosinidina.
- 10 5. Complejo según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la antocianidina es delphinidina.
6. Solución acuosa de un complejo según una de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Solución acuosa según la reivindicación 6, **caracterizada porque** la concentración de la antocianidina, calculada como cloruro, es de al menos 10 mg/ml, de manera más preferente de al menos 20 mg/ml, de manera más preferente aún de al menos 50 mg/ml, de manera más preferente de al menos 80 mg/ml.
- 15 8. Sustancia sólida con contenido de un complejo de una antocianidina y una  $\beta$ -ciclodextrina metilada, que puede obtenerse mediante la eliminación del disolvente de una solución acuosa según una de las reivindicaciones 6 o 7.
9. Procedimiento para la preparación de un complejo de una antocianidina y una  $\beta$ -ciclodextrina metilada, con los pasos:
  - a. Preparación de una solución acuosa de la  $\beta$ -ciclodextrina metilada,
  - 20 b. Adición de la antocianidina y mezcla para la preparación del complejo.
10. procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado porque** la solución preparada en el paso a) contiene de un 10 a un 60 % en peso, preferentemente de un 20 a un 50 % en peso, de manera más preferente aún de un 30 a un 50 % en peso de la  $\beta$ -ciclodextrina metilada.
- 25 11. Procedimiento según las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado porque** la mezcla en el paso b) se produce en un espacio de tiempo de 2 a 20 h.