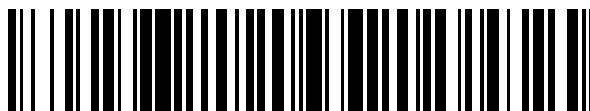


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 952**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/22** (2006.01)  
**A61K 31/341** (2006.01)  
**A61K 31/365** (2006.01)  
**A61K 31/41** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61K 38/13** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2010** **PCT/IB2010/002698**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011** **WO11048479**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010** **E 10784340 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016** **EP 2344154**

54 Título: **Composiciones que incluyen antocianidinas y métodos de uso**

30 Prioridad:

**21.10.2009 US 253835 P**  
**22.10.2009 US 279541 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.06.2017**

73 Titular/es:

**MAQUI NEW LIFE S.A. (100.0%)**  
**Avenida del Condor sur 550, Of 405**  
**Huechuraba, 8580676 Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**HANCKE, JUAN;**  
**BURGOS, RAFAEL;**  
**HIDALGO, MARÍA y**  
**JARA, EVELYN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 618 952 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

Composiciones que incluyen antocianidinas y métodos de uso

### REFERENCIA CRUZADA RELACIONADA A APLICACIONES

- Esta aplicación reclama el beneficio de la fecha de presentación de la Patente de Aplicación Provisional en EEUU N°61/253,835 , presentada el 21 de octubre del 2009 y la Aplicación de Patente Provisional en EEUU N° 61/279,541 , presentada el 22 de octubre del 2009.

### CAMPO TECNICO

- Esta información se refiere a diversas composiciones que generalmente incluyen ciertas cantidades o tipos de antocianidinas y/o su contrapartes glicosiladas. Estas composiciones pueden ser hechas y usadas solas o en combinación con otras composiciones, por ejemplo aquellas que contienen andrografolidos. Las composiciones pueden ser formuladas como preparaciones farmacéuticas o incorporadas a alimentos tales como bebidas o barras de cereal. Su administración o consumo ayuda a mantener el sistema inmune, estimula la función inmune, reduce la inflamación y protege contra condiciones indeseadas (p.ej. síndrome metabólico).

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Antocianidinas y antocianinas (antocianidinas incluyendo grupos de azúcar) son de una gran familia de pigmentos que ocurren en la naturaleza. El color de la mayoría de las frutas, flores y berries es determinado por el contenido de antocianidinas y antocianinas. Otros han sugerido usos para las antocianidinas. Por ejemplo, se ha sugerido que los derivados de las antocianidinas y sus derivados pueden mostrar efectos antivirales en células infectadas y efectos antineoplásicos en células neoplásicas (ver PCT/NO97/00100 (WO97/41137)). Los extractos ricos en antocianinas también son presentados para el tratamiento de síndrome metabólico (ver US Publicación de Aplicación N° 2009/0176718).

El documento EP1683805 describe el extracto enriquecido en antocianinas que se puede obtener de maqui berry.

Escribano Bailón et al. (Phytochemical Analysis 17:8-14 (2006)) describe la composición del Berry Aristotelia chilensis cuyo contenido en antocianinas (delfinidina y cianidinas) fue determinado por el HPLC.

- 25 WO2009/059218 da a conocer unas preparaciones de berries para el tratamiento de la diabetes y síndrome metabólico, una de estas preparaciones se obtiene de maqui berry y fue testada para controlar el nivel de azúcar en la sangre.

Grace et al. (Phytomedicine 2009, 16(5); 406-415) describe extractos de blueberries, los cuales fueron capaces de controlar la glucosa en la sangre cuando fue formulada con Labrasol®.

- 30 Schreckinger et al. (J. Agric. Food Chem 2010, 58; 8966-8976) describe la capacidad antioxidante y la inhibición in vitro de adipogénesis e inflamación por los extractos fenólicos del Vaccinium floribundum y Aristotelia chilensis.

### RESUMEN

- Esta presentación está basada, en parte en nuestros estudios de composiciones que incluyen una preparación de antocianina o antocianidina que es rica en delfinidinas. Si bien, ha habido un interés importante en las antocianinas y en las propiedades antioxidantes de los extractos de berries, esto es, para nuestro conocimiento, la primera descripción de composiciones que incluye no solo cierta cantidad de antocianinas y/o antocianidinas sino también una cierta cantidad o tipo de delfinidina. Las diversas composiciones y métodos de presentación tienen otras características que las distinguen.

- 40 En un primer aspecto, las composiciones de la presente invención comprenden antocianinas y/o antocianidinas en donde (a) un 35% de la composición, por peso, es una antocianina o antocianidina, (b) al menos el 15% de antocianinas y/o antocianidinas, por peso, son delfinidinas libres de azúcar o conteniendo azúcar y, (c) la composición está formulada como un extracto obtenido de la planta Aristotelia chilensis y, (d) la composición comprende los siguientes contenidos de antocianidinas;

- 6,38% de delfinidina -3-O-sambubiosido-5-O glucósido

- 45 - 13,64% de delfinidina-3,5-o glucósido

- 3,36% de cianidina 3-O sambubiosido -5-O glucósido

- 1,58% de cianidina-3,5-O diglucósido

- 1,67% de delfinidina-3-O sambubiosido

- 6,95% de delfinidina- 3-O glucósido

- 0,79% de cianidina -3-O sambubiosido y

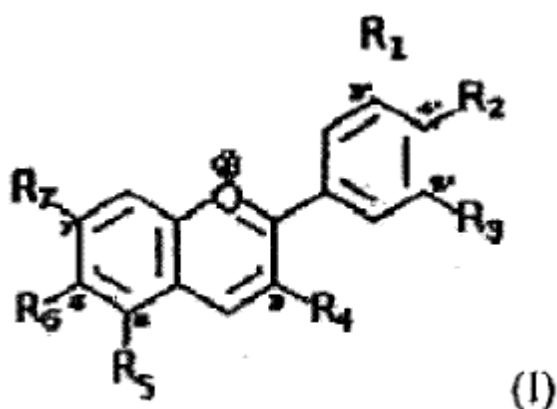
- 1,05% de cianidina -3-O glucósido

Por ejemplo, ni la cantidad o tipo de antocianidinas o antocianinas o el monto o tipo de delfinidinas (o ambos) pueden diferir de lo que se encontró en una composición de la naturaleza tal como un berry u otra parte de la planta o producto. En realizaciones de la invención, las composiciones que contienen delfinidina (e.g. ricas en delfinidina) pueden incluir compuestos específicos adicionales tales como un andrografólido (de una planta del género *Andrographis*). En realizaciones de la invención, las composiciones que contienen delfinidina (e.g. ricas en delfinidina) pueden incluir compuestos específicos adicionales tales como uno o más de: mirtilo, cianidina, quercetina, un derivado cafeolínico, un proantocianidina y/o proantocianina de una planta del género *Vaccinium*).

- 10 Estos compuestos y cualquiera de los compuestos de la revelación pueden ser no tóxicos y todos no ocurren en la naturaleza (es decir, ninguno es idéntico al producto natural). Como se ha señalado, las composiciones incluyen delfinidina conteniendo azúcares tales como delfinidina glicosilada ( delfinidina-3-O sambubiosido-5-O glucosido).

- La cantidad de delfinidina puede variar de acuerdo a los parámetros establecidos aquí. Por ejemplo, al menos o alrededor de un 15% de las antocianinas y/o antocianidinas, por peso (por ejemplo al menos o alrededor de 15%, 15 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50%) puede ser delfinidina tal como delfinidina -3-O- sambubiosido -5-O glucosido. Expresado diferentemente, al menos o alrededor de un 5% del compuesto total, por peso (al menos o alrededor de un 5%, 10%, 15%, 20% o más) puede ser delfinidina tal como delfinidina -3-O- sambubiosido -5-O glucosido.

- En las composiciones de la presente revelación, una o más , incluyendo todas, las antocianinas y antocianidinas 20 pueden conformar la siguiente fórmula:



25

En donde cada R1, R2, R3 , R4, R5, R6 y R7 son independientemente, -H,- OH, o OCH 3 (ver tabla 1 abajo).

- Mientras más adelante se discuten fórmulas específicas, y mientras los métodos de formulación , incluyendo 30 aquellas preparaciones que contienen antocianidinas son conocidas en el arte de la industria farmacéutica y alimenticia, advertimos que las composiciones de la invención pueden ser formuladas para consumo oral (por ejemplo como un ingrediente de un producto alimenticio) o administración oral (como tableta, píldora, cápsula, o similar).

- Las composiciones de la invención (como se describe arriba y más adelante) puede incluir también un andrografolido 35 y puede estar enriquecida por andrografolidos ( el andrografolido puede constituir, por peso, al menos o alrededor de un 10% (por ejemplo al menos o alrededor de un 10%, 15%, 20%, 25% 30% o más) de la composición. El andrografolido puede ser un andrografolido, un deoxi- andrografolido, un neoandrografolido, o una mezcla, por lo tanto puede contener un extracto de una planta de la especie *Andrographis* (*Andrographis paniculata*). La cantidad

de andrografolido también se puede expresar en relación a la cantidad de antocianinas y/o antocianidinas, y la razón de antocianina y/o antocianidina al andrografolido puede ser desde 1,0:0,5 a 1,0:2,5 w/w)

Las composiciones que incluyen ( por ejemplo compuestos enriquecidos para) mirtilo, quercetina y/o cianidina pueden incluir al menos un 15% (por ejemplo al menos 15%, 20%, 25% , 30% o más) de mirtilo, quercetina y/o cianidina.

En donde una composición de la presente revelación incluye una proantocianina o proantocianidina, puede ser extraída o puede extraerse de la planta de la especie *Vaccinium* (por ejemplo *vaccinium angustifolium* y/o *vaccinium myrtillus*).

En donde una composición de la revelación incluye un derivado de cafeolinato, puede ser clorogenato o ácido clorogénico. Así como otros componentes, las cantidades de proantocianinas y/o proantocianidinas pueden ser expresadas en relación a las antocianinas y/o antocianidinas. Por ejemplo, la razón de la pluralidad de antocianinas y/o antocianidinas a la proantocianina y/o proantocianidina puede ser alrededor de un 1,0:0,1 a alrededor de 1,0:10 w/w ( por ejemplo alrededor de 1,0:0,5 a alrededor de 1,0: 2,5 (w/w)). Donde un cafeolionato está presente, la razón de pluralidad de antocianinas y/o antocianidinas es al derivado de cafeolinato también puede ser alrededor de 1,0:0,1 a alrededor de 1,0:10 (w/w) (por ejemplo alrededor de 1,0:0,5 a 1,0; 2,5 (w/w)).

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica que comprende (a) una primera composición que comprende un carrier y (b) 100 mg a 400 mg de una segunda composición donde

- (1) Alrededor de un 35% de la composición, por peso, es una antocianina o antocianidina,
- (2) Al menos un 15% de las antocianinas y/o antocianidinas, por peso, son delfinidinas libres de azúcar o que contienen azúcar,
- (3) La composición es formulada como un extracto obtenido de la planta *Aristolelia chilensis* y
- (4) la composición contiene los siguientes compuestos de antocianidinas:
  - 6,38% de delfinidina -3-O- sambubiosido -5-O glucósido
  - 13,64% de delfinidina -3-5-O diglucosido
  - 3,36% de cianidina 3-O- sambubiosido -5-O glucósido
  - 1,58% de cianidina-3,5-O diglucosido
  - 1,67% de delfinidina -3-O sambubiosido
  - 6.95% de delfinidina -3-O -glucósido
  - 0,79% de cianidina -3-O sambubiosido y
  - 1,05% de cianidina-3-O glucósido.

La primera composición puede incluir celulosa microcristalina, lactosa, dióxido de silicio, glicerina monoestereato, lecitina de soya o aceite de onagra.

La composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir un tercer compuesto que comprende un andrografolido (por ejemplo alrededor de un 30 y 40% de la tercera composición es andrografolido). En las composiciones de la presente revelación, la razón de la segunda composición comprende las antocianinas y/o antocianidinas a la tercera composición comprendiendo el andrografolido que puede ser de alrededor 1,0:05 a alrededor de 1,0 :3,0 (w/w)). Como se ha señalado, las composiciones pueden estar formuladas como cápsulas (por ejemplo cápsula blanda de celulosa o cápsula de gelatina dura).

Esta revelación se caracteriza por contener compuestos farmacéuticos que contienen: 100mg a 400 mg de la primera composición conteniendo antocianidinas , donde alrededor de un 41% de la primera composición es antocianina o antocianidina y alrededor de un 35% de antocianina o antocianidinas son delfinidinas libres de azúcar o conteniendo azúcar; 300 mg de la segunda composición comprendiendo un andrografolido, donde alrededor de un 35% de la segunda composición es el andrografolido; y la tercera composición comprende un carrier , donde la tercera composición, opcionalmente, incluye uno o mas de monoestereato de glicerina, lecitina de soya, aceite de onagra, celulosa microcristalina, lactosa, dióxido de silicio, povidona, carbometilcelulosa de sodio. La tercera composición puede incluir 30mg de monoestereato de glicerina, 20mg de lecitina de soya, y 700 mg de aceite de onagra; 400mg de celulosa microcristalina, 95 mg de lactosa y 10 mg de carbometilcelulosa de sodio.

En otra realización específica, las composiciones farmacéuticas pueden incluir:

- (a) Una primera composición comprende un carrier, y (b) de 100mg a 400mg de una segunda composición donde
- (a) 2  $\Gamma$  about  $\downarrow$  2 II

Un 35% de la composición, por peso, es una antocianina o antocianidina, (b) al menos un 15% de las antocianinas y/o antocianidinas , por peso, son delfinidinas libres de azúcar o conteniendo azúcar.

(c) La composición está formulada como un extracto obtenido de la planta *Aristolelia Chilensis*.

(d) La composición comprende los siguientes contenidos de antocianidinas:

- 6,38% de delphinidina -3-O sambubiosido -5-O glucósido
- 13,64% de delphinidina -3,5-O- diglucósido
- 3,36% de cianidina 3-O -sambubiosido -5-O glucósido
- 1,58% de cianidina -3,5-O- diglucósido
- 1,67% de delphinidina-3-O- sambubiosido
- 0,79% de cianidina -3-O- sambubiosido y
- 1,05% de cianidina -3-O glucósido,

10 y (c) una tercera composición que contiene ácido cafeolínico.

Las composiciones de la presente revelación, se pueden usar en varios tratamientos y métodos profilácticos. En un aspecto, la invención se caracteriza porque usa la composición como método para mantener la función inmune del sujeto por, inter alia, administrando a este una composición como se describe más adelante y no es necesario que tenga un compromiso evidente en su sistema inmune. La composición puede ser administrada en una cantidad y por un tiempo suficiente para mantener la función inmune. En cualquiera de dichos métodos, el sujeto puede ser humano, aunque la invención no está limitada, y cualquier de los presentes métodos se puede expresar en términos de "uso" de las composiciones. Los métodos además pueden incluir un paso de prescripción, para el sujeto, estándares de dieta y/o un programa de ejercicios.

En una realización preferida de la invención, un sujeto a tratar puede ser un animal doméstico o ganado. Cuando el sujeto es un animal mantenido como ganado, la administración de la composición se puede reducir u obviar la necesidad del tratamiento antibiótico profiláctico. El ganado incluye, inter alia, vacas, ovejas, cerdos, pollos, pavos o patos.

En otro aspecto, la invención presenta la composición de ésta al usar un método para tratar al paciente que tiene una condición en la cual el sistema inmune está indeseablemente suprimido administrándole una composición como se describe más adelante en una cantidad y por tiempo suficiente para estimular el sistema inmune del paciente. Preferiblemente, el paciente es humano. De preferencia, la condición es cáncer o síndrome de inmuno deficiencia adquirido.

En otro aspecto, la invención presenta la composición de ésta para ser usado en un método para tratar la inflamación en un sujeto administrándole a éste la composición en un periodo de tiempo suficiente para que reduzca o mejore el aspecto o síntoma de inflamación en este sujeto. El sujeto puede ser humano y la inflamación puede ser causada por una quemadura u otra herida traumática, una toxina química irritante, una infección (por ejemplo infección bacteriana o viral) o una enfermedad autoinmune.

En otro aspecto, la invención presenta la composición de ésta para usar en un método que trata el síndrome metabólico en un paciente, administrándole el compuesto en una cantidad y tiempo suficiente de modo que reduzca o mejore las señales o síntomas del síndrome metabólico, de preferencia el paciente es humano y el síndrome metabólico está asociado a la diabetes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención están establecidos más adelante en los esquemas explicativos y la descripción siguiente. Otras características, asuntos y ventajas de la invención serán señalados en la descripción, esquemas y en las reivindicaciones.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS ESQUEMAS

Fig.1 muestra el promedio de resultados espectrofluorescentes para 4 mediciones de flujo de calcio en células Jurkat T tratadas con composiciones de delphinidina.

Fig. 2A muestra resultados espectrofluorescentes para un promedio de 4 mediciones de flujos de calcio en células Jurkat T tratadas con la composición que contiene delphinidina 50uM.

Fig. 2B muestra los resultados espectrofluorescentes del promedio de 4 mediciones de flujos de calcio en células Jurkat T tratadas con la composición que contiene delphinidina 50uM y BTP-2 10uM.

Fig. 3 muestra los resultados espectrofluorescentes para células Jurkat T pretratadas con U73122 100 uM y tratadas con delphinidina 50uM

Fig. 4A muestra niveles COX-2 en un inmunoblot de células CaCo-2 tratadas con la composición que contiene una concentración final en las muestras 1,75 ug/ml de antocianidinas ricas en delphinidinas después de 0,24,48 y 72 horas.

Fig. 4B muestra niveles de expresión RNAm COX-2 en un tiempo real de PCR de CaCo-2 en células tratadas con una composición que contiene una concentración final en las muestras de 1,75 ug/ml de antocianidinas ricas en delfinidinas después de 24 horas.

Fig. 4C muestra niveles de expresión en un inmunoblot neutrófilo de humano preincubado durante 30 minutos con una composición de acuerdo al presente invento considerando una concentración final en las muestras de 1,75 uM de antocianidinas ricas en delfinidinas o con una composición de acuerdo al presente invento considerando una concentración final en las muestras de 1,75 uM de antocianidinas ricas en delfinidinas y 50 uM de andrografolidos y tratadas con fMLP durante 3 horas.

Fig.5 muestra la activación PPar-y comparada al control en células HL-60 transfectadas con un vector reportero PPar-y-Luc y tratado con una composición de acuerdo al invento que contiene concentraciones finales en las muestras de 0,175 ug/ml, 1,75 ug/ml y 17,5 ug/ml en antocianidinas ricas en delfinidinas o tratadas con PMA, PGj2 o TNFα por 12 horas.

Fig.6 muestra los resultados en el aumento de niveles de glicemia en tres grupos de tratamiento en ratas: grupo de control, tratado con agua, grupo tratado con una composición de acuerdo a la invención considerando una dosis de 7 mg/kg de antocianidinas ricas en delfinidina; y un grupo tratado con una composición de acuerdo a la invención considerando una dosis de 70 mg/kg de antocianidinas ricas en delfinidinas y el efecto de las composiciones de acuerdo al invento para reducir estos niveles elevados.

#### DESCRIPCION DETALLADA

La presente invención revela un número de composiciones que comprende antocianidinas, de preferencia delfinidinas, solas o combinadas con otros compuestos que comprenden componentes seleccionados entre andrografolidos, derivados cafeolinos y proantocianidinas.

En un aspecto, la presente invención se relaciona a una composición que contiene antocianinas y/o antocianidinas donde

- (a) Alrededor de un 35% de la composición, por peso, es antocianina o antocianidina,
  - (b) Al menos un 15% de las antocianinas y/o antocianidinas, por peso, son delfinidinas libres de azúcar o conteniendo azúcar,
  - (c) La composición está formulada como un extracto obtenido de la planta *Aristolelia chilensis* y
  - (d) La composición comprende el siguiente contenido de antocianidinas:
- 6,38% de delfinidina -3-O sambubiosido -5-O glucósido
  - 13,64% de delfinidina -3,5-O- diglucósido
  - 3,36% de cianidina 3-O -sambubiosido -5-O glucósido
  - 1,58% de cianidina -3,5-O- diglucósido
  - 1,67% de delfinidina-3-O- sambubiosido
  - 0,79% de cianidina -3-O- sambubiosido y
  - 1,05% de cianidina -3-O glucósido,

En una realización particular, la composición de la invención además comprende un andrografolido, preferiblemente, en donde el andrografolido constituye, por peso, al menos un 10% de la composición o donde el andrografolido es un andrografolido, un deoxi-andrografolido, un neoandrografolido o una mezcla, por lo tanto o donde el andrografolido está contenido dentro de un extracto de la planta de la especie *Andrographis*, o dentro de la razón de antocianina y/o antocianidina a andrografolido que es de 1,0:0,5 (w/w) a 1,0:2,5 (ww).

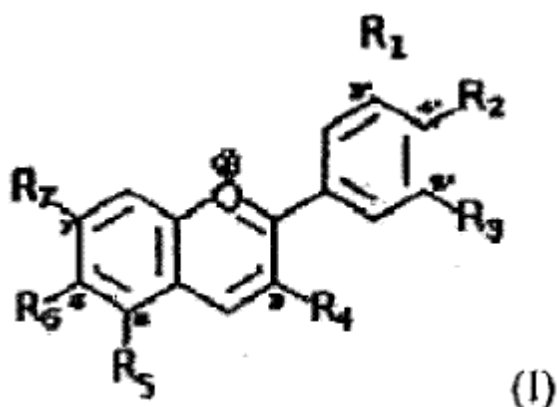
En otra realización particular, de la composición de la invención, (a) las antocianinas y/o antocianidinas comprenden mirtilo, quercetina o cianidina o (b) la composición además contiene una composición rica en mirtilo, quercetina y/o cianidina, preferiblemente, la composición rica en mirtilo, quercetina y/o cianidina contiene al menos un 15% de mirtilo, quercetina y/o cianidina.

En otra realización particular, de la composición de la invención, la composición está formulada para consumo o administración oral.

Como se describe más adelante, las composiciones de la presente divulgación pueden ser formuladas en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones incluyen los compuestos per se, formulaciones orales compactas (por ejemplo cápsulas o "tabletas gel" incluyendo los extractos y un carrier), y productos alimentarios (por ejemplo, jugos o barras de cereal). Además, las características divulgadas de métodos al usar estas composiciones que estimulan el sistema inmune de un sujeto, mantienen la función inmune del sujeto que no tiene una condición explícita (por ejemplo para promover o mantener la función inmune en una persona aparentemente saludable (por ejemplo, una persona que no ha sido diagnosticada con una infección o enfermedad inmune)), trata un sujeto que tiene una condición reconocible (por ejemplo una infección), trata la condición inflamatoria en un sujeto o mejora los signos o síntomas de síndrome metabólico.

Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren a conseguir uno o más de los siguientes : a) reducir la severidad de un desorden; b) limitar el desarrollo de los síntomas característicos del desorden tratados; c) limitar el empeoramiento de los síntomas característicos del desorden tratados.; d) limitar la recurrencia del desorden en sujetos que han tenido previamente los desórdenes y e) limitar la recurrencia de los síntomas en sujetos que fueron previamente sintomáticos por el desorden. Cualquiera de los presentes métodos puede incluir un paso de identificación del paciente que necesita tratamiento. Por ejemplo, un sujeto puede ser examinado y/o sometido a pruebas clínicas para determinar si hay, por ejemplo, un desorden metabólico o inflamación. Entre las condiciones tratables con el tratamiento están los desórdenes metabólicos como Síndrome X, resistencia a la insulina, síndrome de Reaven y el síndrome de CHAOS. La diabetes también puede ser tratada.

- 10 Más específicamente, la presente revelación presenta composiciones que comprenden combinaciones de antocianidinas ricas en delfinidinas. En una realización, las composiciones incluyen uno o más compuestos encontrados en el extracto de la planta ( por ejemplo donde las composiciones están basadas en los extractos pero no son extractos per se), las composiciones pueden incluir algunas o todas las antocianidinas naturalmente presentes en el extracto. Por ejemplo, la composición (por ejemplo, un nutraceutico o producto alimentario) puede incluir algunas, la mayoría, o todas las antocianidinas presentes en el extracto. La antocianidina puede conformar la siguiente fórmula:



20

- Donde cada R1, R2, R3 , R4, R5, R6 y R7 son independientemente, -H, -OH, o OCH3 y en donde al menos un 15% de las antocianidinas (por ejemplo, al menos o alrededor de un 15%, 20% , 25%, 30%, 40%, 45%, 50% o más de antocianidinas) son delfinidinas. Las combinaciones de antocianidinas ricas en delfinidina incluyen ambas delfinidinas y cianidinas.

- Mientras las composiciones de la presente revelación no están limitadas a aquellas en las cuales una cantidad específica de antocianidina está presente, al menos (o alrededor) un 35% de las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina rica en delfinidinas (por ejemplo al menos o alrededor de un 35, 40, 41, 42,43, 44, 45 o 50% de las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina rica en delfinidina puede ser una antocianidina de Fórmula I.

- Las antocianinas son pigmentos flavonoides vacuolares solubles en agua que pueden verse, rojos, morados o azules de acuerdo al pH. Las antocianinas se encuentran en tejidos de plantas mas altas y tienen color en las hojas, tallos, raíces, flores y frutas. En los tejidos fotosintéticos ( tales como hojas y algunos tallos), las antocianinas protegen las células del daño por la luz alta absorbiendo luz azul-verde y rayos UV, de este modo se protegen los tejidos de la fotoinhibición.

- Las antocianinas ( antocianidinas con grupo azúcar) son mayormente 3-glucósidos de antocianidinas. Las antocianinas están subdivididas en los aglicones de antocianidina libres de azúcar y los glicósidos de antocianina. Deseamos aclarar que las composiciones que contienen combinaciones ricas en delfinidina pueden incluir una mezcla de antocianidinas. Las combinaciones de antocianidinas ricas en delfinidinas también pueden contener cianidinas.

Con respecto a la fuente, las composiciones de la presente muestra pueden incluir combinaciones de antocianidinas que son extraídas de una planta, opcionalmente incluyendo la fruta u otro producto comestible de la planta de la especie, *Aristotelia*, *Aronia*, *Enterpe*, *Glycine*, *Prunus*, *Ribes*, *Rubus*, *sambucus*, *vaccinium* o *Zea*. Cuando se usa la variedad *Aristotelia*, el extracto puede ser hecho de la planta *Aristotelia chilensis*. El fruto u otro producto comestible de la planta puede ser el acai berry, bilberry, grosella negra, soya negra, mora, maíz azul, arándano, cereza, aronia, cranberry, sauco, grosella europea, maqui berry, maíz morado, frambuesa o grosella roja. Las plantas de la especie *Vaccinium* tales como, arándano, cranberry y bilberry, grosella negra, cereza, berenjena, arroz negro, uva Concord y uva moscatel, vino tinto, repollo rojo, y pétalos violeta son ricos en antocianidinas y pueden ser usados como fuente de estos extractos. Ya que las antocianinas son menos abundantes en plátano, espárrago, arveja, hinojo, pera o papa, los frutos de estas plantas también pueden ser usados en la fabricación de las siguientes composiciones. Se encuentran altas cantidades de antocianinas en cáscaras de semilla del poroto de soya negro (*Glycine max*. L. Merr.) (2000mg/100g) y en la cáscara y pulpa de aronia (*Aronia melanocarpa* L.) (1480mg/100g) la cual se utiliza para hacer estas composiciones.

En la *Aristotelia chilensis* los principales componentes son derivados de la cianidina y delfinidina en forma de diglucósidos, los cuales están presentes comúnmente en los frutos a una concentración entre los 0,9 y 1,5%.

Las composiciones de la presente revelación además pueden incluir un carrier o excipiente (por ejemplo un aceite, incluyendo aceite vegetal o animal (aceite de pescado)) y puede ser administrada por vía oral. Puede haber ventajas adicionales al formular los extractos en los aceites ricos en ácidos  $\omega$ -3 poliinsaturados tales como aceites *Oenothera Biennis* o *Linum usatissimum* o aceite de pescado. Cualquiera de los compuestos presentes también puede contener adyuvantes incluyendo agentes preservantes, agentes humedecedores, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La acción de los microorganismos puede ser inhibida al incluir un antibacterial, antifúngico o agente antiviral (por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares). También es adecuado incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro de sodio y similares. Adecuados agentes de almacenamiento incluyen: ácido acético, y una sal (1-2% w/v); ácido cítrico y una sal (1-3% w/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5% w/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2% w/v). Preservantes adecuados que incluyen el cloruro de benzalkonium (0,003-0,03% w/v); clorobutanol (0,3-0,9% w/v); parabenos (0,01-0,25% w/v) y timerosal (0,004-0,02% w/v).

Para administración oral, los compuestos de la presente muestra pueden ser formulados como tableta, gragea o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina dura o blanda o cápsula a base de celulosa).

Alternativamente, cualquiera de las composiciones de la presente revelación puede ser formulada e incorporada dentro de un producto alimentario. La forma del producto alimentario puede variar ampliamente e incluir bebidas o bebestibles (por ejemplo una solución ingerida en forma líquida), cereal o un tipo de barra de cereal energética. Cuando es formulada como bebestible, estas composiciones pueden incluir una composición de la presente revelación, un componente del bebestible y un diluyente. El compuesto del bebestible puede incluir componentes que mejoran la eficacia de este al otorgarle beneficios como luchar contra las infecciones, otorgar un perfil nutricional adecuado y mejorar las propiedades organolépticas. El componente del bebestible puede ser té, una bebida carbonatada o una bebida nutricional. El componente del bebestible, además puede incluir una o más trazas de flavonoides, azúcar o endulzantes no calóricos, vitaminas, saborizantes, colorantes, preservantes, acidulantes o diluentes (por ejemplo agua). Los extractos o compuestos activos pueden ser dispersados, solubilizados o también mezclados en la formulación del bebestible de la presente invención.

Las composiciones de la presente revelación contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina que pueden ser usadas para tratar a un sujeto que tiene una condición en la cual el sistema inmune está notablemente disminuido. Por ejemplo, una composición contiene una combinación rica en delfinidinas que puede actuar como inmunoestimulante en un sujeto cuyo sistema inmune está deprimido. Las composiciones que son generadas de compuestos purificados o sintetizados (por ejemplo, mezclas de antocianidinas) también se pueden usar en estos métodos de tratamiento. Las composiciones se pueden administrar al sujeto (por ejemplo, un humano) en una cantidad y por un tiempo suficiente para que promueva la inmunoestimulación en el sujeto.

Así, en otro aspecto, la invención se refiere a la composición de esta para uso en un método de mantener la función inmune en un sujeto que no tiene compromiso aparente del sistema inmune y el compuesto es administrado en una cantidad y por un tiempo suficiente para que mantenga la función inmune.

La inmunosupresión puede ocurrir, por ejemplo, en sujetos que tienen cáncer o inmunodeficiencia adquirida.

Nuestros estudios indican que las composiciones ricas en delfinidina de la presente revelación son útiles para mantener la función inmune en un sujeto (por ejemplo humano), incluyendo sujetos que no tienen una condición aparente de compromiso en el sistema inmunológico. Estos métodos engloban el administrar al sujeto una composición que contenga una combinación de antocianinas y sea rica en delfinidina. Las composiciones son administradas en cantidad y tiempo suficiente para mantener la función inmune del sujeto. Ya que estas composiciones son útiles para mantener la función inmune y por lo tanto promueven o apoyan una condición saludable, pueden ser administradas en conjunto con un programa de dieta y ejercicio. Estas y cualquiera de las otras composiciones también se pueden tomar con las comidas. La inmunidad disminuye con la edad y las



respuestas inmunes naturales son afectadas adversamente con la edad de la persona y asociadas a diversas condiciones. Estas condiciones incluyen el uso de drogas inmunosupresoras, estrés y varias enfermedades como el cáncer, SIDA, hepatitis y otras. Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina de estarevelación se pueden usar en cualquier circunstancia donde uno quiera contrarrestar la baja natural de la inmunidad. Por ejemplo, se puede administrar a una persona saludable en general. La persona puede ser de cierta edad (por ejemplo, a una mujer pre o post menopáusica). De este modo, en otro aspecto, la invención se refiere a la composición de esta para usarse en un método de tratar al paciente que tiene una condición en la cual el sistema inmune está indeseablemente deprimido y la composición es administrada en una cantidad y tiempo suficiente para estimular el sistema inmune del paciente, de preferencia un paciente humano con cáncer o síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación, también pueden usarse para contrarrestar la baja en inmunidad que ocurre como efecto colateral del tratamiento inmunosupresor o en asociación con el cáncer e infecciones (por ejemplo, bacterial, por hongos o infecciones virales).

La falta de respuesta inmune celular adecuada (interferón gama, algunas interleuquinas) es una característica clave implícita en un número de desórdenes que amenazan la vida.

Ya que el sujeto puede ser humano, la invención no es tan limitada. Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidinas ricas en delfinidinas de la presente revelación puede ser administrada a animales (por ejemplo, animales como mascotas domésticas, en zoológicos o ganado). En un animal mantenido como ganado (por ejemplo, una vaca, oveja, cerdo, cabra, pollo, pavo, pato u otra ave), la administración de la composición de la presente revelación puede obviar la necesidad de un tratamiento antibiótico profiláctico.

Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación pueden ser usadas para tratar la inflamación en un sujeto.

Así, en otro aspecto, la invención se refiere a la composición de este para el uso de un método para tratar inflamación en un sujeto, de este modo la composición es administrada en una cantidad y por tiempo suficiente de modo que reduzca o mejore los signos o síntomas de inflamación en el sujeto, de preferencia un sujeto humano, o que la inflamación sea causada por quemadura u otra herida traumática, un irritante químico o toxina, una infección o enfermedad autoinmune, preferiblemente que la infección sea bacterial o viral.

Las composiciones de la presente revelación que son generadas a partir de componentes purificados o sintetizados (por ejemplo, mezclas de antocinidinas) también pueden ser usadas en estos métodos de tratamiento. Las composiciones pueden ser administradas a un sujeto (por ejemplo un humano) en una cantidad y por un tiempo suficiente para inhibir la inflamación en el sujeto.

Como experiencia normal del estado del arte, las dosis efectivas pueden variar basadas en un número de parámetros y dosis particulares que pueden ser determinadas por metodologías conocidas en el campo. Generalmente, esperamos cantidades terapéuticamente efectivas de las presentes composiciones o ingredientes activos que varían desde 0,001 mg/kg de peso corporal hasta alrededor de 10 g/kg de peso corporal (por ejemplo alrededor de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 1,0, 10,0, 100, 250, o 500 mg/kg de peso). La cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la presente revelación contiene una combinación de antocianidina rica en delfinidinas que es al menos o alrededor 1g/kg de peso corporal (por ejemplo al menos o alrededor 2,5, 5,0, 7,5 o 10,0 g/kg de peso corporal). Estas dosis son independientemente pertinentes del contenido preciso o uso destinado.

La inflamación puede ser producida por diversas condiciones o una herida externa. Por ejemplo, la inflamación puede ser causada por una quemadura u otra herida traumática, un químico irritante o toxina, una infección (por ejemplo una infección bacterial o viral). O una enfermedad autoinmune.

Las composiciones de la presente invención que contiene una combinación de antocianidinas rica en delfinidinas puede ser administrada a un sujeto para el tratamiento de síndrome metabólico.

Así, en otro aspecto, la invención se refiere a la composición de esta para usarla en un método que trate el síndrome metabólico en un paciente en donde la composición se administre en una cantidad y tiempo suficiente para que reduzca o mejore el signo o síntoma del síndrome metabólico en el paciente, preferiblemente que sea un paciente humano. O que el síndrome metabólico esté asociado a la diabetes.

La composición puede ser administrada en una cantidad y tiempo suficiente para que mejore el signo o síntoma del síndrome metabólico. Con este método o cualquiera de los métodos señalados aquí, el método puede incluir un paso de identificación del sujeto quien recibiría el beneficio al administrársele la composición. Por ejemplo, el presente método puede incluir una etapa de ejecución de pruebas de diagnóstico y/o exámenes al paciente y/o entrevistas para determinar si un paciente tiene o parece tener síndrome metabólico y por lo tanto sería candidato al tratamiento con las composiciones descritas.

El síndrome metabólico está asociado a la obesidad y la diabetes.

En consecuencia, las composiciones de la presente invención que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina pueden ser usadas para tratar la obesidad y/o diabetes (por ejemplo diabetes tipo II) si aquellas condiciones se presentan dentro del contexto de síndrome metabólico o independientes del síndrome metabólico. Las composiciones de la presente invención que contiene combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina

5 también se pueden usar para regular los niveles de colesterol, incluyendo los niveles LDL y triglicéridos. Así también, las composiciones de la presente muestra pueden ser usadas para tratar estas condiciones en el contexto de síndrome metabólico o independiente de ese síndrome.

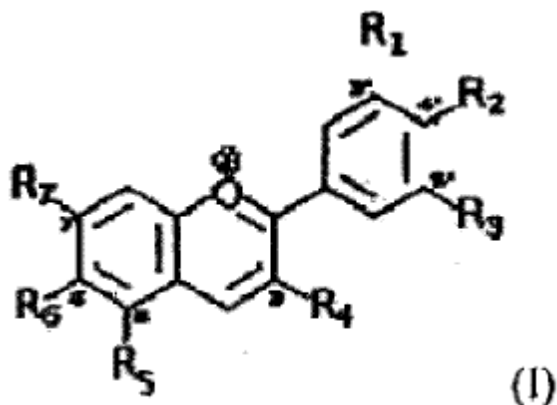
La incidencia de la diabetes tipo II está aumentando rápidamente a nivel mundial y ha alcanzado proporciones de epidemia en el mundo occidental. También está aumentando en países en desarrollo, con aproximadamente 194

10 millones de personas afectadas.

La resistencia a la insulina periférica es una característica clave y este fenómeno tiene implicancia en un número de desórdenes que amenazan la vida colectivamente relacionados al síndrome metabólico (o síndrome X).

En otras realizaciones, las composiciones pueden contener combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas como se muestra en la composición de la invención y composiciones que contienen andrografolidos.

15 Las composiciones ricas en delfinidina de la presente invención pueden ser hechas de componentes purificados o sintetizados. Al menos un 35% (por ejemplo al menos o alrededor de un 35%, 40%, 45% o 50%) de las combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente invención puede ser antocianidina de la siguiente fórmula:



20

Donde R1, R2, R3 R4,R5,R6 y R7 son, independientemente, H, -OH, o -OCH3 y en donde al menos un 15% de antocianidinas ( por ejemplo al menos o alrededor de un 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45% 50% o mas de las antocianidinas) son delfinidinas.

25 Las combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente muestra incluyen ambas, delfinidinas y cianidinas, y los componentes pueden ser extraídos de una planta, opcionalmente incluye el fruto u otro producto comestible de la planta de la especie Aristotelia (Aristotelia chilensis), Aronia, Enterpe, Glycene, Prunus, Ribes, Rubus, Sambucus, Vaccinium o Zea.

El fruto u otro producto comestible de la planta puede ser un acai, bilberry, grosella negra, poroto de soya negro,

30 mora, maíz azul, blueberry, aronia, cranberry, sauco, grosella, maqui, maíz morado, frambuesa o grosella roja.

Al menos un 30% de las composiciones de la presente revelación que contiene andrografolidos (por ejemplo al menos o alrededor de un 30, 35, 40, 45% ) puede ser un andrografolido (por ejemplo un andrografolido, un deoxy-andrografolido, un neoandrografolido, o una mezcla de lo mismo). Las composiciones que contienen andrografolidos de la presente revelación pueden ser preparadas de hierbas (por ejemplo, las hojas) de la planta

35 especie Andrographis ( Andrographis paniculata).

En las composiciones de la presente revelación, la razón de las combinaciones de antocianidinas ricas en delfinidinas a las combinaciones que contienen andrografolidos puede ser alrededor de 1,0:0,5 (w/w) a alrededor de 1,0:10,0 (w/w) , (por ejemplo alrededor de 1,0: 0,1 , 1,0:0,5 , 1,0: 1,0 , 1,0:1,5 , 1,0:2,0 , 1,0: 1,25 , 1,0: 3,0 , 1,0: 3,5 , 1,0 :4,0 , 1,0: 4,5 , 1,0: 5,0 , 1,0: 5,5 , 1,0: 6,0 , 1,0 :6,5 , 1,0: 7,0 , 1,0: 7,5 , 1,0 :8,0 , 1,0: 8,5 , 1,0: 9,0 , 1,0: 9,5 ,

40 1,0: 10,0 o 1,0: 10,5).

Las composiciones contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación combinadas con composiciones que contienen andrografolidos pueden ser formuladas con un carrier o excipiente y administradas como nutraceutico o en el contexto de un producto alimentario.

- 5 Las composiciones contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina de la presente revelación combinadas con composiciones que contienen andrografolidos pueden ser usadas para tratar un sujeto que tiene una condición en la cual el sistema inmune esta indeseablemente deprimido. Por ejemplo, una composición que contiene una combinación de antocianidina rica en delfinidina de la presente muestra combinada con una composición que contiene andrografolidos puede actuar como inmuno estimulante en un sujeto cuyo sistema inmune esté deprimido. Las composiciones que son generadas a base de componentes purificados o sintetizados (por ejemplo mezclas de antocianidinas y andrografolidos) también pueden ser usadas en estos métodos de tratamiento. 10 Las composiciones pueden ser administradas a un sujeto (por ejemplo un humano) en una cantidad y tiempo suficiente para mejorar la inmunestimulación de este sujeto.

La inmuno supresión puede ocurrir, por ejemplo, en sujetos que tienen cáncer o síndrome de inmuno deficiencia adquirido.

- 15 Nuestros estudios indican que las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina de la presente revelación combinadas con composiciones que contienen andrografolidos son útiles para mantener la función inmune en un sujeto (por ejemplo un humano) , incluyendo sujetos que no tienen una evidente condición que comprometa el sistema inmune. Estos métodos comprenden administrar a un sujeto una composición que incluya compuestos que tengan a) combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina de la presente 20 revelación y b) composiciones que contengan andrografolidos. Las composiciones de la siguiente revelación son administradas en una cantidad y tiempo suficiente para mantener la función inmune en el sujeto. Ya que estas composiciones son útiles para mantener la función inmune y por lo tanto mejoran y apoyan una condición saludable, estas ( y otras composiciones descritas aquí) pueden ser administradas en conjunto con un programa de dieta y ejercicio. Estas y cualquier otra de las composiciones de la revelación también se pueden tomar con las 25 comidas. La inmunidad disminuye con la edad y la inmunidad natural se ve adversamente afectada en una persona mayor y asociadas a diversas condiciones. Estas condiciones incluyen el uso de drogas inmuno supresoras, estrés, y diversas enfermedades como el cáncer, SIDA, hepatitis y otras. Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente muestra combinadas con composiciones que contienen andrografolidos, se pueden usar en cualquier circunstancia donde se quiera contrarrestar el natural decaimiento de 30 la inmunidad. Por ejemplo, pueden ser administradas a una persona saludable en general. La persona puede ser de cierta edad (por ejemplo un hombre sobre 50 años y una mujer pre o post menopáusica).

- Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación combinadas con composiciones que contienen andrografolidos, también se pueden usar para contrarrestar la disminución de la inmunidad que ocurre como efecto lateral del tratamiento inmunosupresor o asociada al cáncer e 35 infecciones (por ejemplo bacterial, por hongos o infecciones virales).

La falta de una respuesta celular apropiada (interferón gama, algunas interleuquinas) es una característica clave que está involucrada en una cantidad de desórdenes que amenazan la vida.

- Ya que el sujeto puede ser humano, la divulgación no es tan limitada. Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina de la presente revelación combinada con composiciones que 40 contienen andrografolidos pueden ser administradas a animales (por ejemplo animales mantenidos como mascotas domésticas, en zoológicos, o como ganado). En un animal mantenido como ganado (por ejemplo, vaca, oveja, cerdo, cabra, pollo, pavo, u otra ave) de la composición puede obviar la necesidad de un tratamiento antibiótico profiláctico.

- Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina de la presente revelación combinadas con composiciones que contienen andrografolidos también pueden ser usadas para tratar la 45 inflamación en un sujeto. Por ejemplo, una composición que contiene una combinación de antocianidina rica en delfinidinas de la presente revelación combinada con una composición que contenga andrografolidos puede ser usada para tratar la inflamación. Las composiciones de la presente revelación que son generadas a base de componentes purificados o sintetizados (por ejemplo mezclas de antocianidinas y andrografolidos) también se 50 pueden usar en estos métodos de tratamiento. Las composiciones de la presente revelación pueden ser administradas a un sujeto (por ejemplo un humano) en una cantidad y tiempo suficiente para que inhiba la inflamación del mismo.

- Como experiencia normal del estado del arte, las dosis efectivas pueden variar basadas en un número de parámetros y dosis particulares que pueden ser determinadas por metodologías conocidas en la materia. 55 Generalmente, esperamos montos de efectividad terapéutica de las composiciones de la presente revelación o ingredientes activos donde varía desde 0,001 mg/kg de peso corporal a alrededor de 10g/kg de peso corporal ( por ejemplo alrededor de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 1,0, 10,0 , 100, 250 o 500 mg/kg de peso corporal). El monto terapéutico efectivo de una composición contiene una combinación de antocianidina rica en delfinidinas de la presente revelación combinada con una composición que contiene andrografolidos es al menos o alrededor 1g/kg

de peso corporal (por ejemplo al menos o alrededor 2,5, 5,0, 7,5 o 10,0g/kg de peso corporal). Estas dosis están relacionadas relevantemente al contenido preciso o uso esperado.

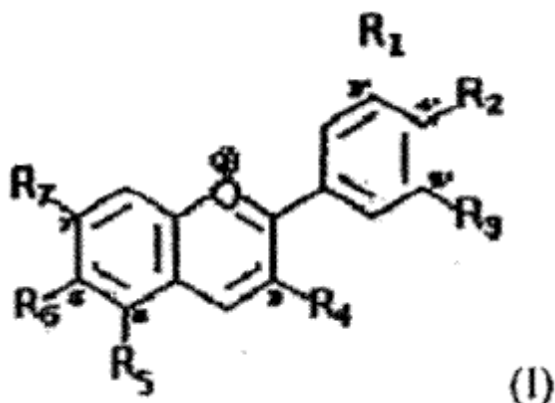
La inflamación puede ser causada por diversas condiciones o una herida externa. Por ejemplo, la inflamación puede ser causada por una quemadura u otra herida traumática, un químico irritante o toxina, una infección (por ejemplo infección bacteriana o viral) o enfermedad autoinmune.

Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación combinadas con composiciones que contienen andrografolidos pueden ser administradas a un sujeto para el tratamiento de síndrome metabólico. La composición de la presente revelación puede ser administrada por una cantidad y tiempo suficiente para mejorar signos o síntoma del síndrome metabólico. Con este método o cualquiera de los métodos señalados aquí, el método puede incluir una etapa para identificar al sujeto quien esperaría beneficiarse al consumir la composición. Por ejemplo, el presente método puede incluir una etapa de pruebas de diagnóstico y/o exámenes del paciente y/o entrevistas para determinar si el paciente tiene o parece tener síndrome metabólico y por lo tanto sería un candidato para el tratamiento con las composiciones ya descritas. El síndrome metabólico está asociado a la obesidad y la diabetes. En consecuencia, las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación combinadas con composiciones que contienen andrografolidos pueden ser usadas para tratar la obesidad y/o diabetes (por ejemplo diabetes tipo II) si esas condiciones ocurren dentro del contexto síndrome metabólico o independientes del síndrome metabólico. Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas combinadas con composiciones que contienen andrografolidos también pueden ser usadas para ayudar a regular los niveles de colesterol, incluyendo los niveles LDL y triglicéridos. Así también, las composiciones de la presente revelación se pueden usar para tratar estas condiciones en el contexto de síndrome metabólico o independientes de ese síndrome.

La incidencia de la diabetes tipo II está aumentando rápidamente en el mundo y ha alcanzado proporciones de epidemia en el mundo occidental. También está aumentando en los países en desarrollo donde se estima que 194 millones de personas la padecen.

La resistencia a la insulina periférica es una característica clave, y este fenómeno está implicado en una cantidad de desórdenes que amenazan la vida colectivamente referidos al síndrome metabólico (o síndrome X). En otras realizaciones, las composiciones características de la invención contienen (a) combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente invención y (b) composiciones que contienen combinaciones de componentes seleccionados de, mirtilo, quercetin, o derivados cafeolínicos y pro antocianidinas.

En composiciones de la presente revelación, al menos o alrededor de un 35% (al menos o alrededor de un 35%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45% o 50%) de las composiciones contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas que incluye una antocianidina de la siguiente fórmula:



Donde cada R1, R2, R3, R4, R5 y R7 son independientemente, -H, -OH, o -OCH3 y donde al menos 15% de las antocianidinas (por ejemplo o alrededor un 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50% o más de antocianidinas) son delfinidinas. La combinación de antocianidina rica en delfinidina de la presente revelación puede incluir ambas, delfinidina y cianidina. Las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidina de la presente revelación de la planta especie *Aristotelia* que puede ser una *Aristotelia chilensis* y las composiciones que contienen combinaciones de componentes seleccionados del mirtilo, quercetin o derivados cafeolínicos y pro antocianidinas pueden ser extraídos de la planta especie *Vaccinium* que puede ser, por ejemplo, *Vaccinium*

augustifolium y/o Vaccinium myrtillus y/o Vaccinium corimbosum. Otras especies de Vaccinium pueden ser usadas, pero estas están entre las fuentes mas viables económicamente. Las composiciones de la presente revelación que contiene combinaciones de componentes seleccionados de mirtilo, quercetin o derivados cafeolínicos y proantocianidinas pueden ser extraídos de hierbas (las hojas) de una planta de la especie Vaccinium. Las composiciones de una planta de la especie Vaccinium pueden incluir mirtilo, quercetin o un derivado de ácido cafeico ( por ejemplo ácido clorogénico). En los extractos de Vaccinium augustifolium y/o corimbosum, el contenido de ácido cafeolínico puede ser alrededor de un 20%.

La razón de las composiciones que contienen combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación a las composiciones que contienen combinaciones de componentes seleccionados del mirtilo, quercetin, o derivados del cafeolínicos y proantociadinas puede ser alrededor de un 1,0:0,5 (ww) a alrededor 1,0:10,0 (ww) . Por ejemplo, la razón puede ser alrededor de 1,0: 0,1 , 1,0:0,5 , 1,0: 1,0 , 1,0:1,5 , 1,0:2,0 , 1,0: 1,25 , 1,0: 3,0 , 1,0: 3,5 , 1,0 :4,0 , 1,0: 4,5 , 1,0: 5,0 , 1,0: 5,5 , 1,0: 6,0 , 1,0 :6,5 , 1,0: 7,0 , 1,0: 7,5 , 1,0 :8,0 , 1,0: 8,5 , 1,0: 9,0 , 1,0: 9,5 , 1,0: 10,0 o 1,0: 10,5.

Así como en otras composiciones señaladas aquí, estas composiciones pueden ser preparadas de componentes purificados y sintetizados (por ejemplo de antocianidinas y mirtilo, quercetin, o derivado de ácido cafeico) más bien que extraídos de los materiales de la planta per se.

En relación a la fuente de estos ingredientes, los componentes pueden ser formulados por administración o consumo oral. Por ejemplo, las composiciones además pueden incluir un carrier o excipiente (por ejemplo aceite vegetal o animal (por ejemplo aceite de pescado)). Las composiciones pueden ser formadas usando técnicas conocidas en tabletas, cápsulas, y similares para administración oral o incorporados dentro de un producto alimentario (por ejemplo una bebida (o bebestible) o barra de cereal).

Las composiciones incluyendo (a) combinaciones de antocianidina ricas en delfinidinas de la presente revelación y (b) composiciones que contienen combinaciones de componentes seleccionados de mirtilo, quercetin, o derivados cafeolínicos o proantocianidinas pueden ser administradas a un sujeto para el tratamiento de síndrome metabólico. La composición de la presente revelación puede ser administrada en una cantidad y tiempo suficiente para mejorar los signos o síntoma del síndrome metabólico. Con este método o cualquiera de los métodos descritos aquí, el método puede incluir una etapa de identificación del sujeto quien esperaría beneficiarse con el consumo de la composición. Por ejemplo, el presente método puede incluir una etapa de pruebas de diagnóstico y/o exámenes al paciente y/o entrevistas para determinar si el paciente tiene o parece tener síndrome metabólico y por lo tanto sería candidato al tratamiento con las composiciones ya descritas. El síndrome metabólico se asocia a la obesidad y diabetes. Por consiguiente, las composiciones de la siguiente muestra que contienen combinaciones de componentes seleccionados del mirtilo, quercetin, o derivados cafeolínicos y proantocianidinas puede ser extraído de la especie de planta Vaccinium y se puede usar para tratar la obesidad y/o diabetes (por ejemplo diabetes tipo II) si esas condiciones ocurren dentro del contexto de síndrome metabólico o independiente del síndrome metabólico. Las composiciones de la presente revelación que contienen combinaciones de componentes seleccionados del mirtilo, quercetin, o derivados cafeolínicos y proantocianidinas se pueden extraer de la planta , especie Vaccinium; también pueden ser usados para ayudar a regular los niveles de colesterol, incluyendo los niveles LDL y triglicéridos. Así también, las composiciones de la presente revelación se pueden usar para tratar estas condiciones en el contexto de síndrome metabólico o independiente de ese síndrome.

La incidencia de la diabetes tipo II está aumentando rápidamente alrededor del mundo y ha alcanzado proporciones de epidemia en el mundo occidental. También está aumentando en los países en desarrollo, con aproximadamente 194 millones de personas afectadas. La resistencia a la insulina periférica es una característica clave y este fenómeno está relacionado con los desórdenes que amenazan la vida colectivamente referido al síndrome metabólico ( o Síndrome X).

Ya que a menudo nos referimos a las antocianidinas , el azúcar que contienen las contrapartes de las antocianidinas ( flavonoides antocianosidos o antocianinas) también pueden ser incluidos en las composiciones de la presente revelación. Las cantidades mencionadas más abajo son de este modo, aplicables a las antocianidinas, antocianosidos o una combinación de las dos ( o ambas de las cuales pueden ser incluidas en las presentes composiciones).

Así, las composiciones de la presente revelación pueden incluir uno o más componentes en que las contrapartes contengan azúcar de una antocianidina. De este modo, las composiciones pueden incluir, además de o en vez de, uno o más de las antocianidinas mencionadas aquí, un correspondiente flavonoide antocianoide que contenga azúcar ( también conocido como antocianina). En consecuencia, las combinaciones de composiciones que contienen antocianidina pueden incluir al menos una de delfinidina-3-galactosido; Delfinidina-3-Glucósido; cianidina-3- galactosido; delfinidina-3- arabinosido; cianidina-3, glucósido; petunidina-3- galactosido; petunidina-3- arabinosida; malvidina-3-galactosida; peonidina-3-glucósida; malvidina-3-glucosida; peonidina-3-arabinosida; malvidina-3-arabinosida; delfinidina-6- acetil-3-glucósida; cianidina-6-acetil-3-glucósida; malvidin-6- acetil-3-galactosida; petunidina – 6-acetil-3-glucósido; peonidina-6-acetyl-3- glucósido; y malvidin-6-acetil-3- glucósido. Alternativamente o como agregado, los extractos pueden incluir al menos una de delfinidina-3-sambubiosido-5-

glucósido; delphinidina 3,5- diglucosido; cianidina 3-sambubiosido-5-glucósido; cianidina 3,5-diglucosido; delphinidina 3-sambubiosido; delphinidina 3-glucósido; cianidina-3-sambubiosido; y cianidina 3-glucósido.

Tabla 1: Antocianidina y sus reemplazos

Antocianidina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
Aurantidinina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delphinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Eupopidinina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH
Luteolinidina	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Pelargonidinina	-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>

5

La Tabla 1 muestra antocianidinas de la fórmula I y sus substitutos, cualquiera de los cuales puede ser incorporado a las composiciones de la presente revelación. Como se señaló, una contra parte aglicólica también puede ser usada.

Las composiciones de la presente revelación pueden ser composiciones acuosas.

- 10 Para mejorar la absorción oral, las composiciones de la presente revelación pueden ser suspendidas en agentes lipofílicos, los cuales pueden incluir aceites vegetales ( aceite de maní, de poroto de soya, de maíz y de oliva) aceites vegetales semisintéticos tales como aceite de coco fraccionado (una mezcla de ácidos grasos triglicéridos de cadena media) , glicéridos poliglicolisados insaturados (GPG) y aceite mineral, como parafina líquida. Aceites animales, incluyendo aceite de pescado , también se pueden ser usados. Sin considerar la fuente precisa, los
- 15 aceites también pueden ser aquellos ricos en ácidos grasos omega3 insaturados, y fosfolípidos.

Las suspensiones pueden ser preparadas por suspensión de extractos micronizados en el agente ( agitando a temperatura ambiente). Los modificadores convencionales reológicos también pueden ser agregados para optimizar la estabilidad física de las suspensiones, así también como surfactantes convencionales ( a los cuales nos referimos más generalmente como agente o excipiente), tales como lecitina de soya para asegurar una buena

20 hidratación. Las suspensiones aceitosas resultantes, se pueden distribuir directamente en las cápsulas de gelatina o absorberse en los excipientes adecuados, tales como dióxido de silicona coloidal, almidón o manitol. En segunda instancia, las mezclas pueden resultar granuladas y distribuidas en sobres o usadas para preparar tabletas.

Otros polifenoles y triterpenos con esqueletos de oleanane y ursane pueden estar presentes en las composiciones de la presente revelación y mejorarán sus efectos.

- 25 Nuestros estudios a la fecha, indican que las composiciones de la presente revelación funcionan sinérgicamente, Así, las composiciones de la presente muestra contienen combinaciones de antocianidina combinadas con composiciones que contienen andrographolides o con composiciones que contienen combinaciones de compuestos seleccionados del mirtilo, quercetina, derivados del caffeoyl quinic y proantocianidinas que muestran un efecto mayor de lo esperado debido a la simple combinación de dos composiciones; estas no son simplemente aditivas.
- 30 Las composiciones de la presente revelación , también pueden incluir algunos diterpenos. Ya que estos componentes tienen efectos inmunoestimulantes, estos pueden ser incluidos en cualquiera de las composiciones de la presente revelación.

- Las composiciones de la presente revelación pueden ser extraídas de la planta antes mencionada. Los extractos de las plantas seleccionadas pueden ser preparados de acuerdo a los procesos conocidos y usados en la ciencia de
- 35 preparar extractos botánicos. Los procesos pueden ser estandarizados para mejorar la productibilidad y consistencia de extracto a extracto. Los procesos pueden comenzar con frutos maduros, frescos o congelados o donde se especificaba, las hierbas de la planta. La extracción puede realizarse en etanol en la presencia de ácidos orgánicos o minerales o por la extracción de los frutos con agua en presencia de iones bisulfato. Ver J.B Hrborne, Los favonoides, Chapman & Hall Ed. Londres p 227. Los iones bisulfito pueden estar preparados por métodos
- 40 conocidos (eg. Por la adición de dióxido de sulfuro o simplemente por la adición de metabisulfito de sodio ).

El porcentaje entre frutas y agua que contiene metabisulfito es de 1:10 y el porcentaje molar entre antocianosidos y bisulfito de sodio es 1:3.

La solución de aductos bisulfitos, cuyo pH generalmente varía entre 1 a 3.5 puede ser alcalinizado hasta que el pH alcance 5 y subsecuentemente eluida a través de una columna que contenga resinas polímeras no-ionogénicas.

Mientras en condiciones ácidas, los aductos antocianosidos bisulfato pueden ser absorbidos con otros polifenoles presentes en el extracto a pH 5. Los aductos bisulfato permanecen sorprendentemente en solución mientras los otros fenoles son absorbidos y separados de las antocianosides. Con este procedimiento es posible preparar dos extractos que contengan esencialmente todas las sustancias polifenolicas o la familia de antocianosides pura. En el caso de una fracción fenólica total, el extracto no puede ser alcalinizado y pasado directamente sobre la resina a un pH ácido; después de la absorción de los compuestos la columna puede ser eluida con agua para eliminar sales y azúcares y los compuestos inertes. Finalmente, la resina es lavada con etanol para la recuperación de las sustancias polifenolicas incluyendo los antocianosidos como aductos bisulfato. La solución alcohólica puede ser concentrada al vacío a una temperatura que varía entre los 25 y 40 °C (eg. 35 °C) hasta que sea alcanzado la mitad del volumen del peso del fruto. Entonces el concentrado puede ser acidificado con ácido diluido (eg. Ácido hidroclorhídrico) con agitación en una atmósfera rica en nitrógeno para remover el dióxido de azufre. El flujo de gas puede ser burbujado en una solución acuosa de hidróxido de sodio para evitar la contaminación de dióxido de azufre en el ambiente.

El concentrado que contiene todas las sustancias fenolicas podría evaporarse hasta secado. En el caso de la preparación de fracciones puras de antocianosidas, el concentrado se puede ser alcalinizado a pH 6 y extraído con n-butanol o acetato etílico para remover las procianidinas y sustancias como taninos. Entonces, la solución puede ser acidificada con ácido hidroclorhídrico para remover el dióxido de azufre como se describe anteriormente. El contenido de antocianósido en el extracto, en este caso varía entre el 90 y 95%.

Hasta que la preparación de un andrographolide es realizada (e.g. extracto de *Andrographis Paniculata*), las hojas secas se pueden extraer después de molerlas con una mezcla de agua mezclada con alcohol (eg. Etanol con agua, así como etanol/agua 50% v/v) hasta que las sustancias extraíbles estén completamente recuperadas. Los extractos hidroalcohólicos combinados son concentrados en agua filtrada a este punto precipitaciones turbias y finas partículas de hojas etc. La resina puede ser eluida con agua para eliminar en gran parte sustancias indeseadas como azúcares, péptidos y sales; y el principio activo puede ser eluido con etanol al 95% hasta el agotamiento o el mismo. La elución etanólica puede ser concentrada al vacío a una temperatura no superior a 40°C. El contenido de andrographolide estaría en el rango de 30 y 40% dependiendo de ciertos factores tales como el contenido original en las hojas.

En la presente muestra, este extracto podría usarse tanto si está en combinación con el extracto purificado de *Aristolelia chilensis* u otra planta que contenga antocianidina.

Las antocianinas están subdivididas en aglycones antocianidina libres de azúcar y antocianinas glucósidas y las composiciones de la presente revelación pueden incluir uno o ambos tipos de antocianinas.

En otro aspecto, la invención se asocia a una composición farmacéutica que contiene (a) una primera composición que contiene un agente y (b) 100 a 400mg de una segunda composición en donde,

- (1) Alrededor de un 35% de la composición, por peso, es una antocianina o antocianidina,
- (2) Al menos un 15% de las antocianinas y/o antocianidinas, por peso, son libres de azúcar o delfinidinas con contenido de azúcar,
- (3) La composición es formulada como un extracto obtenido de la planta *Aristolelia chilensis* y
- (4) La composición contiene los siguientes contenidos de antocianidinas:

- 6,38% de delfinidina-3-O- sambubiosido-5-O- glucósido
- 13,64% de delfinidina-3,5-O- diglucósido
- 3,36% de cianidina 3-O- sambubiosido-5-O- glucósido
- 1,58% de cianidina-3,5-O – diglucosido
- 1,67% de delfinidina-3-O- sambubiosido
- 6,95% de delfinidina-3-O-glucosido
- 0,79% de cianidina-3-O-sambubiosido y
- 1,05% de cianidina-3-O-glucosido.

En una aplicación particular, la composición farmacéutica del invento comprende una tercera composición que contiene un andrografolide, preferiblemente alrededor de un 30- 40% de la tercera composición es un andrografolide.

En otra aplicación particular, la composición farmacéutica del invento además comprende (c) una tercera composición que contiene ácido caffeoylquinic.

La cantidad terapéuticamente efectiva de una antocianina individual o de una antocianina en particular u otro componente activo en las composiciones de la presente revelación puede variar desde aprox. 0.01 mg/kg de peso corporal a 1g/kg de peso corporal. El componente de antocianina de las composiciones de la presente revelación incluye una o más de delfinidina-3-galactoside; delfinidina-3-glucoside; cianidina-3-galactoside; delfinidina-3-arabinoside; cianidina-3-glucoside; petunidin-3-galactoside; petunidin-3-glucoside; cianidina-3-arabinoside;

peonidin-3-galactoside; perunidin-3-arabinoside; malvidin-3-galactoside; peonidin-3-glucoside; malvidin-3-glucoside; peonidin-3-arabinoside; malvidin-3-arabinoside; delphinidina-6-acetyl-3-glucoside; cianidina-6-acetyl-3-glucoside; malvidin-6-acetyl-3-galactoside; petunidin -6-acetyl -3-glucoside; peonidin-6-acetyl-3-glucoside; malvidin-6-acetyl-3-glucoside; delphinidina 3-sambubioside-5-glucoside; delphinidina3,5-diglucoside; cianidina 3-sambubioside; delphinidina 3-glucoside; cianidina3- sambubioside; y cianidina3-glucoside.

Podemos usar los términos “ agente terapéutico” y “agente activo” intercambiablemente para referirnos al compuesto(s) en las composiciones de la presente revelación que interactúan en alguna forma con el sujeto o cuerpo del paciente al obtener la respuesta o resultado fisiológico deseado . El agente activo puede ser, por ejemplo, pero no es limitado, al menos un flavonoide o una antocianina o un derivado de la variante en esto, una antocianina de blueberry como por ejemplo, delphinidina-3- galactoside; delphinidina-3-glucoside; cianidina-3-galactoside; delphinidina-3- arabinoside; cianidina-3-glucoside; petunidin-3-galactoside; petunidin-3-glucoside; cianidina-3-arabinoside; peonidin-3-galactoside; perunidin-3-arabinoside; malvidin-3-galactoside; peonidin-3-glucoside; malvidin-3-glucoside; peonidin-3-arabinoside; malvidin-3-arabinoside; delphinidina-6- acetyl3-glucoside; cianidina-6-acetyl-3-glucoside; malvidin-6-acetyl-3-galactoside; petunidin-6-acetyl-3-glucoside; peonidin-6-acetyl-3-glucoside; malvidin-6-acetyl-3-glucoside, o una antocianina de maqui como por ejemplo, delphinidina 3-sambubioside-5-glucoside; delphinidina3,5-diglucoside; cianidina3-sambubioside-5-glucoside; cianidina 3,5-diglucoside; delphinidina3-sambubioside; delphinidina3-glucoside; cianidina 3-sambubioside; cianidina 3- glucoside by combinaciones de estas.

La “extracción” como se usa para referirse al proceso de extraer, retirar, destilar o de otro modo, separar una sustancia de otra por un proceso físico o químico. El extracto puede ser una sustancia sólida, viscosa o líquida extraída de una planta o por ejemplo, una población mezclada de componentes sintéticos o similares las cuales contengan su esencia en forma concentrada. También nos podemos referir a eso como “agente o “droga agente”, o vehículo y estos términos se refieren a llevar materiales adecuados para la administración de los componentes de antocianidina como se describía aquí, variantes o derivados. Los agentes útiles en las composiciones de la presente muestra incluyen muchos materiales conocidos en la materia que no son tóxicos y no interactúan activamente con otros componentes (son considerados inertes). Un “ agente farmacéuticamente aceptable” es cualquier agente convencional substancialmente no tóxico usado en fármacos que pueden mejorar la estabilidad o bio disponibilidad del agente activo. Los agentes útiles incluyen glicéridos esterificados, los cuales pueden ser saturados o insaturados. Los agentes útiles también incluyen glicol polietileno y ácidos grasos. Las composiciones farmacéuticas de la presente muestra también pueden incluir solidos apropiados o agentes tipo gel o excipientes. (e.g. carbonato de calcio, fosfato de calcio, azúcares varios, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros como el glicol polietileno , ya mencionado.).

Tanto líquido como sólido, las composiciones farmacéuticas de la presente revelación pueden ser microencapsulada y si es apropiado con uno o más excipientes, encochleated, revestido con microscópicas partículas de oro, contenidas en liposomas, pellets para implantación en el tejido, o secados sobre un objeto para ser frotado en el tejido. Las composiciones farmacéuticas de la presente muestra también pueden estar en forma de gránulos, cuentas, polvo, tabletas, tabletas recubiertas, microcapsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de componentes activos en cuya preparación los excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de inflamación, lubricantes o solubilizantes son normalmente usados como se señala anteriormente. Las composiciones farmacéuticas de la presente muestra son adecuadas para el uso en una diversidad de sistemas de entrega de drogas. Las antocianinas descritas en la presente muestra pueden ser entregadas en forma de un sal farmacéutica aceptable. Cuando son usadas en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables pero las sales no farmacéuticammente aceptables pueden ser usadas convenientemente para preparar sales farmacéuticamente apropiadas. Tales sales incluyen, pero no están limitadas a, aquellas preparadas a base de los siguientes ácidos: hidroclicídrico, hidrobromico, sulfúrico, nítrico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, y benceno sulfónico.

También, dichas sales se pueden preparar como sales metalo alcalinas o de tierra alcalina, como sodio, potasio, o sales de calcio del grupo de ácido carboxílico. Por “sal farmacéutica aceptable” se entiende que son aquellas sales en las cuales , donde la opinión médica, sea adecuado para uso en contacto con tejidos humanos y animales inferiores sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares sean conmensurables con una proporción de beneficio razonable, Las sales pueden ser preparadas in situ durante la aislación final y purificación de los componentes señalados dentro del presente invento o separadamente reaccionando a una función base libre con un ácido orgánico apropiado. Las sales ácidas representativas agregadas incluyen, pero no están limitadas a, acetato, adipate, alginate, citrato, aspartato, benzoato, benzenesulfonate, bisulfato, butryate, camphorate, camphorsulfonate, digluconato, glycerophosphate, hemisulfate, heptanoate, hexanoate, fumarate, hidroclicloruro, hidrobromide, hidroioide, 2-hydroxyethansulfonate (isethionate), lactato, maleato, methanesulfonate, nicotinate, 2-naphthalenesulfonato, oxalate, pamoate, pectinate, persulfato, 3-phenylpropionate, picrate, pivate, propionate, succinate, tartrato, thiocynate, fosfato, glucamato, bicarbonato, p-sulfato de tolueno y undecanoate. También , los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden ser quatemized con ciertos agentes como alkyl halides inferiores tales como methyl, ethyl, propyl, y cloruro de butyl, bromides, y iodides; sulfatos de dialkyl, como benzyl y



bromuros phenethyl y otros. El agua o productos solubles en aceite o dispersables son obtenidos de este modo. Ejemplos de ácidos que pueden ser empleados para formar sales ácidas agregadas farmacéuticamente aceptables que incluyan ácidos inorgánicos como ácido hidrociorídrico, ácido hidro bromuro,, ácido sulfúrico ácido fosfórico y ácidos orgánicos como ácido oxalic, ácido maleico, ácido succinic, y ácido cétrico. Las sales básicas agregadas se pueden preparar in situ durante la aislación final y purificación de los componentes señalados aquí , por reacción en una porción que contenga ácido carboxylic con una base adecuada como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión de metal aceptable farmacéuticamente o con amoníaco o una amina primaria, secundaria o terciaria.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen pero no están limitadas a, cationes basados en metales alcalinos o metales de tierras alcalinas como el litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y sales de aluminio y similares. Amoníaco quaternario no tóxico, y cationes amine incluyendo amoníaco, tetramethylamonio, tetraethylamonio, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, triethylamine, diethylamine, ethylamine y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales basicas agregadas incluyen ethylenediamine, ethanolamine, diethanolamine, piperidine, piperazine, y similares.

Las sales aceptables farmacéuticamente también se pueden obtener usando procedimientos estándar bien conocidos en el tema, por ejemplo, por reaccionando a un compuesto suficientemente básico como una amine con un ácido adecuado apoyando un anion aceptable fisiológicamente. El metal alcalino (ej. Sodio, potasio o litio) o un metal de tierra alcalina (e, calcio o magnesio) sales de ácidos carboxylic también pueden ser creadas.

Las formulaciones pueden ser presentadas convenientemente en la forma de dosis unitaria y puede ser preparada por cualquiera de los métodos bien conocidos en el campo farmacéutico. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar un aglycone de antocianidina libre de azúcar y/o una antocianina glycoside o un derivado o variante junto con el agente que constituye uno o más agentes complementarios. En general, las formulaciones son preparadas al traer en forma uniforme y profunda la asociación del agente activo con agentes líquidos o agentes sólidos finamente divididos o ambos y entonces si es necesario, conformar el producto en la formulación deseada.

Las antocianinas y antocianidinas como se señala en la presente revelación, o aceptable farmacéuticamente ester, sal, solvato o prodroga puede ser mezclado con otros materiales activos que no dañen la acción deseada o con materiales que suplementen la acción deseada (e.g. los andrographolides descritos) . Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea, intra thecal o tópica pueden incluir, pero no limitados a, por ejemplo los siguientes componentes: diluyente esteril, como agua por inyección, solución salina, aceites , polietileno glycols, glicerina, propileno glicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacteriales como benzyl alcohol o metil parabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes tales como ácido einetetraacetic; retardadores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales come cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral pude ser incluida conservada en bombillas, jeringuillas desechables o vías de múltiple dosis hechas de vidrio o plástico. Administrada en forma intravenosa, los agentes particulares son salinos fisiológicos o buffer de fosfato salino (PBS).

En otro aspecto, el presente invento se relaciona a un método para hacer una composición de este, en donde el método comprende; (a) teniendo la planta *Aristolelia chilensis* que contiene antocianinas y/o antocianidinas;

(b) alterando la integridad de la planta;

(c) extrayendo los químicos de la planta alterada para producir una extracción líquida;

(d) concentrar la extracción líquida para producir una mezcla de extracción;

(e) alcanilizar la mezcla de extracción;

(f) separar al menos un componente en la mezcla de extracción de otros componentes en la mezcla de extracción y;

(g) recolectar y secar al menos uno de los componentes separados.

Algunos de los siguientes ejemplos son solo de referencia y otros ilustrarán el invento en detalle pero no con la intención de limitar al alcance. Otras aplicaciones serán aparentes a una habilidad común en el tema.

45

## EJEMPLOS DE REFERENCIA

Ejemplo 1: Preparación de extracto de *A. chilensis* que contenga antocianidinas y polifenoles.

Frutos congelados de *Aristolelia chilensis* (1 kg) que contiene 15grs de antocianidinas extraidas con 5 x 1 L de etanol/ agua, 50% v/v; cada extracción fue llevada a cabo en 4 horas. Para ambas, la primera y segunda extracción , 7,5 grs de bisulfito de sodio, fueron disueltos en el solvente etanol/agua. Los líquidos extraídos fueron concentrados al vacio a una temperatura de 30°C a un volumen de 2 L para eliminar el etanol. El concentrado fue cargado a una columna de 2,5 L de una resina plystrenica no polar con un tamaño de partícula de 25-60 de malla. La columna fue lavada con 10 L de agua y después lavada con 3 L de etanol (95%). La solución de etanol fue

concentrada a 0,5 L (esencialmente removiendo el etanol) batiéndolo y la solución concentrada fue acidificada a pH 1 en un flujo de nitrógeno para remover el SO<sub>2</sub>, burbujeando en una solución NaOH. La solución rojo oscuro luego fue cuidadosamente cocentrada al vacío por sequedad. SE obtuvieron 150 grs del extracto con un contenido de antocianidina de un 30%.

- 5 Ejemplo 2: Preparación de extracto de *A. chilensis* que contiene antocianidinas y polifenoles. Un extracto de *Aristotelia chilensis* que contiene antocianidinas y polifenoles fue preparado esencialmente de acuerdo al método en el ejemplo 1, a excepto de la solución de etanol fue concentrado a 1L y después de la acidificación fue diluido en 2,5 L de agua y cargado en 2L de la columna polystyrene como se describe en el ejemplo 1. La columna fue eluida con etanol como se señala. Con este proceso, el rendimiento del extracto fue de 135 grs aprox. E incluyó un 41% de antocianidinas.

Ejemplo 3: Preparación de un extracto con alto contenido de antocianidinas de *A. chilensis*.

- Los frutos congelados de *Aristotelia chilensis* (1kg) que contiene 15 grs de antocianidinas fueron extraído con 5x1 L de etanol/agua 50% v/v. Cada extracción se llevó a cabo en 4 horas. Para ambas, la primera y segunda extracción fueron disueltos 7,5grs de bisulfito de sodio en el solvente etanol/agua. Los líquidos extraídos fueron concentrados al vacío a una temperatura de 30°C, a un volumen de 2 L para eliminar el etanol. La mezcla fue alcalinizada a un pH 5,5 agregándole un 10% de solución de NaOH y cargado a una columna con 2 L de resinas polystyrenic no polares. La columna fue diluida con 2 L de agua. El eluato acuoso fue entonces concentrado a 2 L y acidificado a un pH 1 agregándole ácido hidrociorídrico y luego cargado sobre otra columna de 2L de resina polystyrenic no polar. Continuamos lavando con agua hasta que el eluato quedó sin color.
- 20 Las antocianidinas fueron recuperadas de la resina, lavándolas con etanol hasta que el etanol quedo sin color. La solución alcohólica fue concentrada por secado, rindiendo 50grs de extracto con 95% de antocianidinas.

Ejemplo 4: Preparación de un extracto con alto contenido de andrografolidos.

- Las hojas secas de *Andrographis paniculata* (1kg) fueron extraídas con 5L de etanol/agua 50% v/v por 4 horas a 60°C. Se realizaron tres extracciones adicionales usando 3 L de la misma mezcla de solvente y los extractos combinados fueron concentrados al vacío a una temperatura de 45°C hasta que el alcohol fue eliminado. El extracto acuoso fue centrifugado para eliminar los floculantes poliméricos y la turbiedad; y la solución clara fue pasada a través de 3L de resina polistirénica no polar. La columna fue eluida con 2 L de agua. El material absorbido fue recuperado por el lavado de etanol de la resina hasta que los eluados de alcohol quedaron sin color. La solución alcohólica fue concentrada por secado, rindiendo 120 grs de un extracto con un 35% aprox. De andrografolidos totales (10% de andrografolido, 3% deoxyandrografolido y 1% de neoandrografolido.)

Ejemplo 5: Un extracto con alto contenido en ácido caffeoyl esters quinic y proantocianidinas.

- Las hojas secas de *Vaccinium angustifolium* (1kg) fueron extraídas con 5L de etanol/agua 50% v/v por 4 horas a una temperatura de 60°C. Se ejecutaron tres extracciones adicionales usando 3L de la misma mezcla de solvente y los extractos combinados fueron concentrados al vacío a una temperatura de 45°C hasta que el alcohol fue eliminado. El extracto acuoso fue centrifugado para eliminar los floculantes poliméricos y la turbiedad y luego la solución clara fue pasada a través de 3L de resina polistirénica no polar. La columna fue eluida con 2L de agua. El material absorbido fue recuperado por el lavado de resina con etanol hasta que el eluado de alcohol quedó sin color. La solución alcohólica fue concentrada por secado, rindiendo 120grs de un extracto con contenido de 35% aprox. De derivados de caffeoyl quinic, 10% de procianidinas y 3% de ácidos triterpenic.

- 40 Ejemplo 6: La delfinidina indujo una emisión de calcio intracelular en una forma dosedependiente.

- Evaluamos el efecto de la delfinidina en una emisión de calcio intracelular en células Jurkat T. Los extractos fueron preparados de acuerdo al método del ejemplo 1. Las células Jurkat T en Solución Salina Balanceada Hanks (HBSS) medio (invitrogen) con 0.9 mM de CaC<sub>2</sub> fueron cargados con Fura-2- acetoxymetil ester (2.5 uM) por 30 min a 37°C, lavados y encubados en 10uM, 50uM y 100 uM de delfinidina. Los flujos de Ca<sub>2</sub> fueron medidos como proporción de excitación a 340 y 380 nm y la emisión a 509 nm por 300 segundos a 37°C en un espectrofluorimetro (LS55, Perkin Elmer).

Tabla 2: Los flujos de Ca inducidos por diferentes concentraciones de delfinidina.

Concentración de delfinidina en el modelo[μM]	Area media bajo la curva de la proporción 340/380 por 300 segundos	Porcentaje versus control (%)
0	60	100
10	100	166,7
50	225	375
100	250	416,7

Como se muestra en la Tabla 2, el área bajo la curva (AUC) de la proporción de excitación de 340 a 380 nm y emisión de 509 nm durante 300 segundos después de los tratamientos variaron con la concentración de delfinidina. Para las células encubadas en 10 uM, 50uM y 100 uM de delfinidina, el área bajo la curva fue de 66.7%, 275% y 316,7% la más alta, respectivamente, que lo obtenido por células de control no tratadas- Estos resultados mostraron que la delfinidina indujo flujos  $\text{Ca}^{2+}$  en células Jurkat T en una forma dosis dependiente.

Ejemplo 7: La delfinidina activó células T via flujos de calcio.

Para continuar exploramos el mecanismo de del efecto de la delfinidina en el ingreso de calcio intracelular y emisión de células Jurkat T. Para medir la emisión de calcio,  $4 \times 10^6$  FURA 2-AM, carga Células Jurkat T fueron encubadas en HBSS medio libre de calcio como se describe en el ejemplo 6. Las células fueron encubadas en delfinidina de 50uM o en delfinidina 50uM y 10 uM N- [4-[3,5 bis (trifluoromethy)-1H-pyrazol-1-yl] phenyl]-4- metil-1,2,3 thiadiazole -5- caroxamide (BTP-2, Store operated Calcio Entry (SOCE) inhibidor). La emisión de  $\text{Ca}^{2+}$  fue medida en un rango de excitación de 340 y 380 nm con emisión de 509nm, por 200 segundos a 37°C, en un espectrofluorómetro (LS55, PerkinElmer).

Tabla 3: Emisión de calcio en muestras de células Jurkat T con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media AUC prop. 340/380 por 200 segundos	Porcentaje versus control (%)
No Tratado	3	100
50 $\mu\text{M}$ delfinidina	51	1,700
50 $\mu\text{M}$ delfinidina + 10 $\mu\text{M}$ BTP-2	47	1,566.7

Como se muestra en la Tabla 3, ambas muestras tratadas con delfinidina y las muestras tratadas con delfinidina con 10uM BTP-2 generaron un peak de excitación a razón de 340 y 380 nm y emisión de 509nm. El área bajo la curva (AUC) para las muestras encubadas en delfinidina sola y en delfinidina con 10 uM BTP-2 fue de 1700% y 1566% más alta respectivamente, que las células de control no tratadas. Estos datos sugieren que ambas delfinidinas, la sola y la delfinidina con 10uM BTP-2 indujeron la emisión de calcio.

Para medir la emisión de calcio después de 200 segundos, cuando los niveles de calcio volvieron a la línea base, 0,9 nM de  $\text{CaCl}_2$  se agregó y los flujos de  $\text{Ca}$  fueron medidos a razón de una excitación de 340 y 380nm y la emisión de 509 en un espectrofluorómetro durante 150 segundos.

Tabla 4: Emisión de calcio en muestras de células Jurkat T con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media AUC de prop 340/380 150 segundos después de tratamiento con calcio	Porcentaje versus control (%)
Modelo control	38	100
50 $\mu\text{M}$ delfinidina	70	184,2
50 $\mu\text{M}$ delfinidina + 10 $\mu\text{M}$ BTP-2	38	100

Como se muestra en la Tabla 4, el área bajo la curva para las muestras incubadas en delfinidina y delfinidina con 10uM BTP-2 fue 100% respectivamente, del valor obtenido para células de control no tratadas. Estos resultados demostraron que BTP-2, un inhibidor de SOCE, inhibió la entrada pero no la emisión de  $\text{CaCl}_2$ , sugiriendo que la delfinidina indujo la descarga de calcio intracelular y el ingreso de calcio via SOCE en células Jurkat T y que la delfinidina activó las células T via flujos de calcio.

Ejemplo 8: La delfinidina indujo la activación celular caracterizada por la liberación de calcio en las células T que es reversible.

$4 \times 10^6$  FURA 2-AM de carga en células T fueron incubadas en medio HBS S libre de calcio. Entonces, las células fueron incubadas en 50 uM de delfinidina y los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron medidos a razón de 340 y 380nm con emisión de 509nm a 37°C en un espectrofluorómetro (LS55 PerkinPalmer).

Como se muestra en la figura 1, se observó un peak de emisión de calcio siguiendo el tratamiento con delfinidina. El peak disminuyó gradualmente a la línea base después de dos minutos. Estos resultados demostraron que la delfinidina indujo la emisión reversible del calcio, sugiriendo que la activación de delfinidina de células T fue caracterizada por la emisión de calcio reversible.

Ejemplo 9: La delfinidina indujo el influjo de calcio via store operated.

5 Escencialmente de acuerdo al método descrito en el ejemplo 7.  $4 \times 10^6$  FURA-2 AM- carga de células Jurkat T que fueron encubadas en medio HBSS libre de calcio. Las células fueron incubadas en delfinidina de 50uM o delfinidina de 50uM con 10uM BTP-2 y los flujos de Ca2 fueron medidos a razón de excitación 340 y 380 nm, a una emisión de 509nm a 37°C en un espectrofluorímetro (LS55, PerkinELmer).

FIG.2A muestra los resultados de espectrofluorescencia para un promedio de 4 mediciones de flujos de calcio en células Jurkat T incubadas en delfinidina de 50uM. La Fig2B muestra los resultados de espectrofluorescencia para un promedio de 4 mediciones de flujos de calcio en células Jurkat T encubadas en delfinidina 50uM plus BTP-2 10UM.

El influjo de calcio inducido por delfinidina, nos muestra en la Figura 2A, que fue reducido en la presencia (fig.2B) 10 Ingreso de calcio Store Operated (SOCE) inhibidor, BTP-2. Estos resultados sugerían que los canales de calcio STORE OPERATED estaban mediando el flujo de calcio introducido por delfinidina y que la delfinidina indujo la activación celular de células Jurkat T por el influjo de calcio STORE OPERATED.

Ejemplo 10: La delfinidina activó la emisión de célula T por el mecanismo dependiente PLC.

15 Evaluamos el rol de la fosfolifase C (PLC) en la emisión de calcio inducido por delfinidina usando el inhibidor selectivo C de fosfolipasa, U73122.

$4 \times 10^6$  FURA 2-AM cargado células Jurkat T que fueron incubadas en HBSS. Entonces, las células fueron tratadas con un vehículo solo o 50 o 100uM Ut3122 por 10 minutos antes de la incubación en delfinidina de 50uM. El flujo Ca2+ fue medido a razón de 340 y 380 nm con una emisión de 509nmn a 37°C en un espectrofluorímetro (LS55 PerkinPalmer).

20 Como se muestra en la Fig.3, el pretratamiento con U73122 resultó en una reducción dosis dependiente en delfinidina inducida por el flujo de calcio que no fue observado en células tratadas con vehículo solo. Estos datos sugerían que la activación de delfinidina de células T fue mediada por phospholipase C y puede incluir la activación de una membrana receptora.

25 Ejemplo11: La delfinidina pero no la cianidina indujo una producción de interleucinas-2 en células T. Exploramos el efecto de la delfinidina y cianidina en la producción de interleucinas -2 (IL-2) en células Jurkat T.

30 Las células Jurkat T  $2 \times 10^6$  E6 en un medio RPMI fueron incubadas por 48 horas a 37°C con CO2 al 5% en presencia de una solución de control de vehículo o activador de célula T, phorbol 12-myristate 13- acetato/lonomycin (PMA/Io 2 ng/ml 1 uM); 50 uM de delfinidina; 50uM de delfinidina + PMA/Io; 50uM de cianidina ; 50uM de cianidina + PMA/Io. Luego, los sobrenadantes fueron recolectados y la producción IL-2 fue analizada por ELISA usando un kit comercial (Becton Dickinson, EEUU) de acuerdo a los parámetros del proveedor.

Tabla 5: La producción IL-2 en muestras ce células jurkat T con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media producción IL-2	Porcentaje versus control (%)
Modelo de control	50	100
PMA/Io	3.750	7.500
50 µM delfinidina	170	340
50 µM delfinidina + PMA/Io	3.500	7.000
50 µM cianidina	45	90
50 µM cianidina + PMA/Io	3.700	7.400

35 Como se muestra en la Tabla 5, las células tratadas con delfinidina produjeron niveles significativamente más altos (P 0.05) de IL-2 (240% más alto) que las células de control no tratadas, mientras las células tratadas con cianidina produjeron un poco menos IL-2 (10%) que las células controladas. Estos datos sugieren que la delfinidina pero no la cianidina agredada IL-2 afectaron la producción en células Jurkat T.

Como se esperaba, el control positivo PMA/Io produjo altos niveles de producción IL-2. Cuando la delfinidina y cianidina se agregaron en combinación con PMA/Io, ambos compuestos redujeron la producción de IL-2 levemente.

40 Ejemplo 12: La delfinidina pero no la cianidina, promovió la producción de Interferon-gamma (INF-y) en las células T.

45 También exploramos el efecto de la delfinidina y cianidina en la producción de Interferongamma (INF-y) en células Jurkat T.  $2 \times 10^6$  células Jurkat T medio RPMI fueron incubadas por 48 horas a 37°C, en 5% de CO2. Las muestras fueron incubadas en presencia de una solución control. ; o activador de células T, phorbol 12- myristate 13,acetato/lonomycin (PMA/Io 2 ng/ml 1 uM), 50 uM de delfinidina; 50Um DE CIANIDINA; O 50 Um DE CIANIDINA + pma/Io. Luego, los sobrenadantes fueron recolectados y la producción IFN-y fue analizada por ELISA usando un kit comercial (Becton Dickinson, EEUU) de acuerdo a los parámetros del proveedor.

Tabla 6: producción INF- $\gamma$  en muestras de células Jurkat T con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media producción INF- $\gamma$	Porcentaje versus control (%)
Modelo de control	8	100
PMA/Io	60	750
50 $\mu$ M delfinidina	28	350
50 $\mu$ M delfinidina + PMA/Io	125	1.562,5
50 $\mu$ M cianidina	8	100
50 $\mu$ M cianidina + PMA/Io	110	1.375

Como se muestra en la Tabla 6, las células tratadas con delfinidina aumentaron significativamente los niveles (p 0.05) de INF- $\gamma$  (250% más alto) que aquellas células de control no tratadas, mientras las células tratadas con cianidina produjeron casi los mismos niveles de INF- $\gamma$  que las células de control. Estos datos sugerían que la delfinidina y no así la cianidina, incluían INF- $\gamma$  producción en células Jurkat T.

Como se esperaba, el control positivo PMA/Io produjo altos niveles en la producción. En contraste al efecto sobre la producción IL-2, cuando la delfinidina y cianidina fueron agregadas en combinación a PMA/Io, los componentes mostraron un efecto sinérgico en la producción INF- $\gamma$ , los niveles de INF- $\gamma$  fueron casi el doble que el de las células tratadas con PMA/Io solo.

#### Ejemplo 13: Delfinidina agregada a IL-2 e INF- $\gamma$ en células T humanas via SOCE

El efecto de la delfinidina en la producción INF- $\gamma$  e IL-2 también fue probado en células T humanas frescamente aisladas. Las células T humanas fueron aisladas de la sangre de voluntarios saludables usando el reactivo Lymphoprep. Células T ( $1 \times 10^6$ ) en RMP medio fueron incubadas por 48hrs a 37°C, en 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de una solución control; 50  $\mu$ M de delfinidina; 50  $\mu$ M de delfinidina + 1  $\mu$ M BTP-2; 5  $\mu$ M BTP-2; o 10  $\mu$ M BTP-2. Entonces se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron usando el kit comercial ELISA (Becton Dickinson EEUU) para medir la producción IL-2 e INF- $\gamma$  de acuerdo a las normativas del proveedor.

Tabla 7: producción IL-2 en muestras de células T humanas con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media producción IL-2
Modelo de control	0
50 $\mu$ M delfinidina	370
50 $\mu$ M delfinidina + 1 $\mu$ M BTP-2	23
50 $\mu$ M delfinidina + 5 $\mu$ M BTP-2	20
50 $\mu$ M delfinidina + 10 $\mu$ M BTP-2	10
1 $\mu$ M BTP-2	0
5 $\mu$ M BTP-2	0
10 $\mu$ M BTP-2	0

Como se muestra en la Tabla 7, las células T humanas tratadas con delfinidina produjeron un aumento significativo en los niveles de IL-2 que aquellas células control no tratadas. BTP-2 tuvo una baja en la producción al reducirse la delfinidina inducida (P < 0.05 de IL-2 todas las concentraciones testeadas. El tratamiento BTP-2 solo no se incrementó la producción IL-2.

Tabla 8: producción INF- $\gamma$  en muestras de células T humanas con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media producción INF- $\gamma$	Porcentaje versus control (%)
Modelo de control	370	100
50 $\mu$ M delfinidina	3.900	1.054,1
50 $\mu$ M delfinidina + 1 $\mu$ M BTP-2	550	148,6
50 $\mu$ M delfinidina + 5 $\mu$ M BTP-2	500	135,1
50 $\mu$ M delfinidina + 10 $\mu$ M BTP-2	150	40,5
1 $\mu$ M BTP-2	240	64,9
5 $\mu$ M BTP-2	390	105,4
10 $\mu$ M BTP-2	140	37,8

Como se muestra en la Tabla 8, las células T humanas tratadas con delfinidina aumentaron significativamente (P < 0.05) los niveles (950% más altos) de INF- $\gamma$  que aquellas células control no tratadas. BTP-2 mostró una reducción dosis-dependiente en la producción con delfinidina inducida de INF- $\gamma$  en todas las concentraciones testeadas. El tratamiento BTP-2 solo no aumento la producción IL-2. Considerando todos los datos mostraron en las

tablas 7 y 8, la producción con delfinidina inducida IL-2 a INF- $\gamma$  fue medida en células T humanas via SOCE-mecanismo dependiente.

**Ejemplo 14:** Producción de delfinidina inducida IL-2 via Factor Nuclear de células T activadas (NFAT).

Entonces, exploramos si la delfinidina de la producción IL-2 inducida via factor nuclear en activación de células T activadas (NFAT).  $2 \times 10^6$  Células Jurkat T en medio RPMI donde se incubaron por 48 horas a 37°C, a 5% de CO<sub>2</sub>, en presencia de una solución control; 50uM delfinidina, 50uM delfinidina + ciclosporina A (CsA un inhibidor calcineurina de la vía NFAT); o CsA solo. Luego se recolectaron los sobrenadantes y fueron analizados usando el kit comercial ELISA (Becton Dickinson, EEUU) para medir la producción IL-2 de acuerdo a los parámetros del proveedor.

10 Tabla 9: La producción IL-2 en muestras de células Jurkat T inhibidas por CsA.

Tratamiento	Media producción IL-2
Modelo de control	0
50 $\mu$ M delfinidina	240
50 $\mu$ M delfinidina + CsA	10
CsA	0

Como se muestra en la Tabla 9, las células Jurkat T tratadas con la delfinidina produjeron una importante subida en los niveles de IL-2 y no así en las células control no tratadas. CsA se redujo significativamente ( $P < 0.01$ ) en la producción con delfinidina inducida de IL-2. No fue detectada producción de IL-2 en célula tratada con CsA solo.

15 Los datos mostrados en la tabla 9 sugirieron que la delfinidina indujo la producción de IL-2 en células Jurkat T via activación NFAT.

**Ejemplo 15:** Efecto de andrografolido más delfinidina sobre la producción IL-2 en células T.

Evalúamos el efecto de una combinación de delfinidina y andrografolido en la producción IL-2, en células T humanas y línea celular Jurkat ambas frescamente cosechadas. El andrografolido fue preparado de acuerdo al método descrito en el ejemplo 4. Las células T humanas fueron aisladas de la sangre de voluntarios saludables usando el reagente Lymphoprep. Las células T ( $1 \times 10^6$ ) en medio RPMI fueron encubadas por 48 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, en la presencia de una solución control; 5nM andrografolido; 50 uM delfinidina; o 5nM andrografolido más 50uM delfinidina. Luego se recolectaron y analizaron los supernadantes usando un kit comercial ELISA (Becton Dickinson, EEUU) para medir la producción IL-2 de acuerdo a los parámetros del proveedor.

25 Tabla 10: Producción de IL-2 en linfocitos con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media producción IL-2	Porcentaje versus control (%)
Modelo de control	40	100
5 nm andrografolido	85	212,5
50 $\mu$ M delfinidina	87	217,5
5nm andrografolido + 50 $\mu$ M delfinidina	135	337,5

Como se muestra en la Tabla 10, las células T humanas tratadas con el andrografolido y la delfinidina produjo un aumento significativo en los niveles (112% y 117% más altos respectivamente) de IL-2 que en las células control no tratadas. Sorprendentemente, cuando el andrografolido y la delfinidina se agregaron juntos, los dos componentes mostraron un efecto sinérgico en la producción IL-2, es decir, los niveles de IL-2 fueron un 237% más altos que aquellos de células tratadas con andrografolido o delfinidina sola.

Tabla 11: Producción IL-2 en células Jurkat T con diferentes tratamientos.

Tratamiento	Media producción IL-2	Porcentaje versus control (%)
Modelo de control	0,0165	100
5 nm andrografolido	0,0140	84,8
50 $\mu$ M delfinidina	0,023	139,4
5 nm andrografolido + 50 $\mu$ M delfinidina	0,0375	227,3

Las células Jurkat T se incubaron en una solución control; 5nM andrographolido; 50uM delfinidina o 5nM andrografolido más 50 uM delfinidina. Como se muestra en la tabla 11, las células Jurkat T tratadas con delfinidina produjeron niveles más altos (39,4% más altos) de IL-2 que las células control no tratadas. Se observó una leve reducción con andrografolido. Sorprendentemente, cuando el andrografolido y la delfinidina se agregaron juntos,

los dos componentes mostraron un efecto sinérgico en la producción IL-2, es decir, los niveles de IL-2 fueron 127% más altos que aquellos de células tratadas con andrografolido y delfinidina sola.

Ejemplo 17: Efecto antiinflamatorio de antocianidinas en un modelo in vivo.

La composición conteniendo antocianidinas ricas en delfinidinas fue preparada de acuerdo a la presente invención.

- 5 Probamos el efecto de las antocianidinas en una inflamación in vivo en un modelo agudo de inflamación plantar. La inflamación fue introducida en ratas Sprague Dawley (200g) usando un 1% de carragenina (Sigma-Aldrich). Los animales fueron tratados con 35 mg/kg de antocianidinas ricas en delfinidina (preparado de acuerdo al método descrito en el Ejemplo 1) o con diclofenaco (2mg/kg). El diámetro de las patas tratadas fue medido con un calibrador digital por más de 6 horas. El área bajo la curva (ABC<sub>0-6</sub>) fue calculado; los resultados se muestran en la
- 10 tabla 13.

Tabla 13: Area bajo la curva del diámetro de patas tratadas .

Tratamiento	Media ABC <sub>0-6</sub> (mm*hr)	Disminución % vs control
Modelo de control	20	0
Antocianidina rica en delfinidina 35 mg/kg	13 *	35
Diclofenaco 2 mg/kg	12,5 **	37,5

- Como se muestra en la Tabla 13, el tratamiento con antocianidinas ricas en delfinidina redujo significativamente el edema plantar (\*p<0.05); esta reducción fue similar a la alcanzada con el agente control positivo, diclofenaco. (\*\* p <0,01).
- 15

Ejemplo 18: Formulación de la composición de antocianidinas rica en delfinidinas en cápsulas de gelatina dura.

Dentro de una composición:

Composición que contiene antocianidinas (41% de antocianidinas,

- 20 35% de estas antocianidinas son delfinidinas) .....400 mg
- Celulosa microcristalina.....400 mg
- Lactosa.....
- .95 mg
- Dioxido
- 25 silicio.....10mg de

- En este ejemplo y los ejemplos siguientes los cuales describen ciertas cantidades de diversos componentes de la invención, donde esta abarca composiciones similares en las cuales las cantidades proporcionadas por uno o más de los componentes varían, por ejemplo, por más o menos alrededor de un 10%. De este modo, la invención abarca las composiciones que contienen los componentes mencionados más adelante en los cuales, por ejemplo,
- 30 la antocianina antocianidina está presente en 360- 440 mg.

Ejemplo 19: Formulación de una composición conteniendo andrografolidos y antocianidinas ricas en delfinidinas (proporción 3:1) en una suspensión aceitosa para cápsulas de celulosa blandas.

En una unidad de composición:

Composición que contiene andrografolidos

- 35 (35% total de andrografolidos).....300 mg
- Composición que contiene antocianidinas (41% antocianidinas,
- 35% de estas antocianidinas son delfinidinas)..... 100mg
- Monostearato de glicerina..... .30mg
- Lecitina de soya..... .20 mg
- 40 Aceite de onagra..... 700 mg

Ejemplo 20: Formulaci3n de una composici3n que incluye una composici3n que contiene andrografolidos y antocianidinas ricas en delfinidina (proporci3n 3:1) en c3psulas de gelatina duras.

En una unidad de composici3n:

Composici3n que contiene andrografolidos

5 (35% total de andrografolidos).....300 mg

La composici3n contiene antocianidinas (41% de antocianidinas,

35% de estas antocianidinas son delfinidinas)..... 100mg

Celulosa microcristalina..... 400 mg

Lactosa.....95mg

10 Di3xido de silicio.....10mg

Ejemplo 21: Formulaci3n de una composici3n contiene andrografolidos y antocianidinas rica en delfinidinas (proporci3n 1:1) en c3psulas de gelatina duras.

En una unidad de composici3n

La composici3n contiene andrografolidos

15 (35% total de andrografolidos).....200 mg

Composici3n que contiene antocianidinas (41% antocianidinas,

35% de las antocianidinas son delfinidinas)..... 200 mg

Celulosa microcristalina.....400mg

Povidona.....15 mg

20 Carboximetilcelulosa de sodio.....10 mg

Ejemplo 22: Formulaci3n de una composici3n que contiene antocianidinas rica en delfinidinas, 3cido cafeol3nico (proporci3n 1:1) en c3psulas de gelatina duras.

En una unidad de composici3n:

La composici3n contiene 3cido cafeol3nico

25 (20% de 3cido cafeol3nico).....200 mg

La composici3n contiene antocianidinas (41% antocianidinas,

35% son delfinidinas).....200mg

Celulosa microcristalina..... 400 mg

Lactosa.....95 mg

30 Di3xido de silicio..... 10mg

Ejemplo 23: Efecto de los extractos de Maqui combinados con Vaccinium o extractos de A. paniculata en niveles de glucosa en la sangre en un Modelo Rata Diab3tica.

Comparamos el efecto de la administraci3n oral de extracto de Maqui solo, con extracto de Maqui combinado con extracto de Vaccinium o A. paniculata en un modelo rata diab3tica. Las ratas fueron tratadas con estreptozotocina a 60mg/kg para inducir diabetes. Una semana despu3s de la administraci3n de Eestreptozotocina, los animales fueron divididos en 5 grupos y cada uno recib3 el siguiente tratamiento: 1) Grupo 1 , (n=5), control diab3tico no tratado; 2) Grupo 2 (n=4), Maqui (20mg/kg); 3) Grupo 3 , (n=5), Maqui (200mg/kg); 4) Grupo 4 (n=4), Maqui (20mg/kg) m3s Vaccinium (100mg/kg); 5) grupo 5 (n=5), Maqui (20mg/kg) m3s A.paniculata (100mg/kg); Despu3s de cuatro d3as de tratamiento, las muestras de sangre fueron tomadas y se midieron los niveles de glucosa usando kit ACCU-CHEK® (Roche) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

El extracto de Maqui era extracto estandarizado de fruto de maqui fresco (35% de antocianinas totales, min: delfinidinas totales 25%; min. delfinidina DSG: 5%); el extracto de A. paniculata era de hierba seca (37% andrografolidos totales, con aproximadamente un 20 a un 40% w/w de Andrografolido, alrededor de un 5 a un 10%



w/w de 14- deoxiandrografolido y alrededor de un 0,2 a 0,8% w/w de neoandrografolido. Extracto de *Vaccinium angustifolium* fue un: extracto estandarizado de hojas secas (ácido chlorogenico 16%).

- Los resultados de niveles de azúcar en la sangre post tratamiento fueron: 1) Grupo 1, control diabético no tratado 361,2 + 107,98 (SEM=48,29); 2) Grupo 2, Maqui (20mg/kg), 354 +/- 176,71 (SEM=88,35); 3) Grupo 3, Maqui (200mg/kg) 383,2 +/- 137,35 (SEM =61,42); 4) Grupo 4 Maqui (20mg/kg) más *Vaccinium* (100mg/kg), 261,5 +/- 99,71 (SEM =49,85); 5) Grupo 5, Maqui (20 mg/kg) más *A. paniculata* (100mg/kg) 223,4 + 120,56 (SEM=53,92). Estos datos sugirieron que la combinación de extracto de Maqui con extracto de *Vaccinium* o *A. paniculata* reducían los niveles de azúcar en la sangre en un mayor grado que el extracto de Maqui solo.

#### EJEMPLOS ILUSTRATIVOS DE LA INVENCION

- 10 Ejemplo 24: Efecto de las antocianidinas y antocianidinas combinadas con andrografolido en la expresión de ciclooxigenasa 2.

Analizamos el efecto de las antocianidinas y antocianidinas combinadas con andrografolido en la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2), una enzima que interviene en el proceso inflamatorio. Las células Caco-2 (un tumor de cáncer de colon que constitutivamente expresa COX-2) fueron cultivadas en un medio MEM a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> e incubadas con 1,75 ug/ml de delfinidina enriquecida por 24, 48 o 72 horas. Los niveles de COX-2 mRNA fueron analizados en tiempo real RT PCR usando primers específicos COX-2 usando reagente SYBRGreen (Stratagene); B-actin utilizado como control interno. Los niveles de proteína COX-2 fueron probados por inmunotransferencia usando un anticuerpo específico COX-2 (Cayman) fue ejecutado para comparar la expresión; B-actin fue usado como control estandarizado.

- 20 FIG 4A muestra niveles polipéptidos COX-2 en una inmunotransferencia de células Ca Co-2 tratadas con 1,75 ug/ml de antocianidinas rica en delfinidina después de 0, 24, 48 y 72 horas. FIG 4B muestra niveles COX-2 mRNA en células CaCo-2 tratadas con 1,75 ug/ml de antocianidinas rica en delfinidina por 24 horas. Como se muestra en la FIG. 4A, tratamiento con 1,75 ug/ml de antocianidinas rica en delfinidinas por 24 horas redujeron los niveles de polipéptidos COX-2 en casi un 50%; además se observó la reducción a 48 y 72 horas. Como se muestra en la FIG. 25 4B, el tratamiento con 1,75ug/ml de antocianinas rica en delfinidina por 24 horas redujo significativamente los niveles COX-2 mRNA al 50% de los niveles de control.

También analizamos los niveles polipéptidos COX-2 en neutrófilos humanos. Las células fueron preincubadas por 30 minutos con 1,75 uM de antocianina rica en delfinidina o 1,75 uM de antocianina rica en delfinidina y 50 uM de andrografolidos. Entonces las células tratadas por 3 horas con formil-metionil leucil-fenilalanina (fMLP) para inducir la expresión. Los niveles de polipéptidos COX-2 y B-actin fueron probados como se describe más adelante. Como se muestra en la figura 4C, el tratamiento con 1,75 uM de antocianina rica en delfinidina redujo los niveles del polipéptido COX-2. El tratamiento con combinación de 1,75 uM de antocianina rica en delfinidina y 50 uM de andrografolidos produjo una reducción mayor del polipéptido COX-2.

#### Ejemplo 25: Efecto de antocianidinas en activación PPAR-Y

- 35 La habilidad de un grupo de drogas derivadas de tiazolidenediones (rosiglitazona y pioglitazona) para regular el nivel de glicemia vía activación PPAR-Y (proliferador peroxisoma- receptor activado, un receptor involucrado en sensibilización a la insulina) como se conoce. Además, para alterar los niveles de expresión de adipocinas, proteínas proinflamatorias y lípidos, activación de PPAR-Y también produce sensibilización a la insulina, sin aumento de adipogenesis (Sugii et al. 2009), de adipocitos maduros. Por lo tanto, la activación de PPAR-Y podría prevenir el desarrollo de diabetes tipo II y mejorar la respuesta a la insulina. Nosotros examinamos el efecto de la antocianidina rica en delfinidina en activación PPAR-Y. Células HL-60 en un medio IMDM fueron transfectadas con los vectores reporteros PPAR-Y Luc (5ug) (Panomics) y TK-RL (1ug) (Promega) usando reagente Eugene 6 (Roche), y cultivadas por 24 horas. Luego, las células fueron incubadas por 2 horas en 0,175, 1,75 o 17,5 ug/ml de antocianidina rica delfinidina, forbol miristato acetato (PMA), 15-deoxi-d 12,14 -prostaglandina 32 (PGj 2), o factor de tumor necrosado alfa (TNFa) como control. La actividad luciferasa fue medida usando el kit Dual Luciferase Reporter Assay (DLR) de Promega en un luminómetro (Luminoskan).

Tabla 14: Activación de PPAR-Y con diferentes composiciones (ant = anthocyanidins).

Tratamiento	Actividad porcentual media de control ( PPAR-y-Luc/TK-RL)+ SD
Modelo de control	100
0.175 µg/ml ant. Rica en delfinidina	346.7±450.6
1.75 µg/ml ant. Rica en delfinidina	285.7±171.5
17.5 µg/ml ant. Rica en delfinidina	706.7±829.9
PMA	527.5±536.3
PGj2	256.8±126.9
TNFα	283.4±47.23

Como se muestra en la Tabla 14, los controles positivos PMA, PGj2 y TNF- $\alpha$  aumentaron la actividad luciferasa en PPAR- $\gamma$  Luc de células transfectadas HL-60. El tratamiento con antocianidinas rica en delfinidina produjo un aumento dosis dependiente en la actividad luciferasa. Estos datos están representados gráficamente en la FIG 5. Estos datos dan a entender el por qué la antocianidina rica en delfinidina aumentó la actividad PPAR- $\gamma$ , tales componentes pueden otorgar un beneficio terapéutico en la diabetes tipo II.

**Ejemplo 26:** Efectos de antocianidinas rica en delfinidina en hiperglicemia en ratas diabéticas.

10 Evaluamos el efecto de la antocianidina rica en delfinidina en un tipo de rata diabética. La diabetes fue introducida en ratas por inyección intravenosa de estreptozotocina. Después de 7 días los perfiles metabólicos de los animales fueron analizados para determinar cuales ratas eran hiperglicémicas. Las ratas hiperglicémicas fueron asignadas al azar a diferentes grupos; grupo control tratado con agua, grupo tratado con 7mg/kg de antocianidina rica en delfinidinas y un grupo tratado con 70mg/kg de antocianidina rica en delfinidina. En cada grupo hubo 5 ratas. Las ratas fueron tratadas por dos semanas con antocianidina rica en delfinidina mezclada en el agua que bebían. Después de 2 semanas de tratamiento, se sacó 1ml de sangre de cada animal por punción retro – orbital. El nivel de glicemia fue determinado en la sangre con el método de glucosa oxidasa (Wiener Lab).

15 **Tabla 15:** Nivel de glicemia en ratas tratadas con composiciones de la invención.

Tratamiento	Promedio aumento nivel de glicemia	Disminución porcentual vs control
Modelo de control	195	0
Antocianidina rica en delfinidina 7 mg/kg	62*	68.2
Antocianidina rica en delfinidina 70 mg/kg	190	2.6

20 Se observó un aumento de aproximadamente 200mg/dl en los animales diabéticos comparado a los niveles anteriores del estreptozotocina. Como se muestra en la Tabla 15, los animales tratados con una dosis de 7 mg/kg de antocianidina rica en delfinidinas con hiperglicemia mostraron una reducción importante ( $p < 0.05$ ) a hipoglicemia; es interesante mencionar que los animales tratados con una dosis más alta 70mg/kg de antocianidina rica en delfinidinas tenían niveles que eran casi idénticos a aquellos animales control. Estos datos están representados gráficamente en la Figura 6.

**Ejemplo 27:** Análisis cromatográfico de antocianidina rica en delfinidinas.

Un análisis cromatográfico de una composición que contiene antocianidina rica en delfinidinas fue realizado.

25 **Tabla 16:** Tabla de peaks del contenido de antocianidinas de una composición que contiene antocianidinas ricas en delfinidinas de acuerdo a la invención.

	Nombre	RT (min)	RRT	Area (uV*sec)	Contenido (%)
1)	Delfinidina-3-O-sambubiosido-5-O-glucosido	19.164	0.640	2367620	6,38
2)	Delfinidina-3,5-O-diglucosido	20.117	0.672	6057231	13,64
3)	Cyanidina-3-O-sambubiosido-5-O-diglucosido	22.506	0.752	1268598	3,36
4)	Cyanidina-3,5-O-diglucosido	22.852	0.764	721117	1,58
5)	Delfinidina-3-O-sambubiosido	24.410	0.816	774162	1,67
6)	Delfinidina-3-O-glucosido	25.871	0.864	4108076	6,95
7)	Cyanidina-3-O-sambubiosido	28.996	0.969	377697	0,79
8)	Cyanidina-3-O-glucosido	29.930		639701	1,05
	<b>Suma de contenido</b>				<b>35,42</b>

30 Como se muestra en la Tabla 16, 35,45% del contenido de la composición corresponde a antocianidinas, de las cuales un 28,64% son delfinidinas y 6,78% eran cianidinas. Aunque no fue el más abundante, se observó un alto contenido de delfinidina 3-O sambubiosido -5-o glucósido. Este contenido corresponde a un 6,38% de los contenidos totales, 18% del contenido de antocianidinas, y 22,3% del contenido de delfinidinas. Delfinidina -3-O sambubiosido -5-O glucósido fue un componente característico particular de las composiciones de la invención.

35 **Ejemplo 28:** Las antocianidinas interfirieron con la activación de NF- $\kappa$ B. Examinamos el efecto de las antocianidinas en la activación NF- $\kappa$ B usando un reporte de prueba luciferasa en células HL-60 (células humanas con leucemia promielocítica). Las células HL-60 en IMDM fueron transfectadas con vector reportero con una secuencia NF- $\kappa$ B ubicada en un promotor luciferasa por 24 hrs a 37°C, luego fueron incubadas con antocianidinas rica en delfinidina diluida en 1 : 500000, 1:50000 y 1: 5000. PMA se usó como control positivo.

La actividad luciferasa fue medida con un kit de prueba luciferasa Dual (Promega) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Un vector que constitutivamente expresó renilla luciferasa fue usado para estandarizar la prueba.

Tabla 17: Actividad de NF- $\kappa$ B en células HL-60 tratadas con diferentes composiciones de antocianidinas ricas en delfinidinas comparadas con el control.

Tratamiento	Promedio actividad Porcentual de control (pNF- $\kappa$ B/pRL-luc)
Modelo de control	100
1:500000 antocianidina ricca en delfinidina	73
1:50000 antocianidina ricca en delfinidina	62
1:5000 antocianidina ricca en delfinidina	43
PMA	50

5

Como se muestra en la Tabla 12, transfectantes luciferasa HL-60 mostraron una importante baja dosis dependencia en la actividad luciferasa (al menos en 3 experimentos independientes con un  $p < 0.05$ ). Estos datos indicaban que la actividad de antocianidinas ricas en delfinidinas fue intervenida por NF- $\kappa$ B.

Un número de realizaciones de la invención han sido descritas. Sin embargo, se entenderá que varias  
10 modificaciones se pueden hacer sin apartarnos del espíritu y propósito de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende antocianinas y / o en el que antocianidinas  
(a) alrededor de 35% de la composición, en peso, es una antocianina o antocianidina.
- 5 (b) Al menos el 15% de las antocianinas y / o antocianidinas, en peso, son delfinidina sin azúcar o con azúcar.  
(c) La composición se formuló como un extracto obtenido de la planta *Aristotellia chilensis*  
(d) La composición incluye el siguiente contenido de antocianidinas  
- 6,38% de delfinidina-3-O-sambubiosido-5-O-glucósido  
- 13,64% de delfinidina-3,5-O-diglucósido.
- 10 - 3,36% de cianidina 3-O-sambubiosido-5-O-glucósido,  
- 1,58% de cianidina-3,5-O-diglucósido,  
- 1,67% de delfinidina-3-O-sambubiosido,  
- 6,95% de delfinidina-3-O-glucósido,  
- 0,79% de cianidina-3-O-sambubiosido y
- 15 - 1,05% de cianidina-3-O-glucósido.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un andrografolido, preferiblemente, en el que el andrografolido constituye, en peso, al menos 10% de la composición, o cuando la andrografolido es un andrografolido, un desoxi-andrografolido, un neoandrografolido o una mezcla, donde el andrografolido está contenido dentro de un extracto de una planta del género *andrographis*, o donde la proporción de antocianina y / o antocianidina para andrografolido es de 1,0: 0,5 (w: w) a 1,0: 2,5 (w: w).
- 20 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde (a) las antocianinas y / o antocianidinas incluyen mirtilo, quercetina o cianidina, o (b) la composición comprende además una composición rica en mirtilo, la quercetina y / o cianidina, preferiblemente, la composición rica en mirtilo, la quercetina y / o cianidina comprende al menos 15% de mirtilo, la quercetina y / o cianidina.
- 25 4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición se formula para el consumo de la administración oral u oral.
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método de mantenimiento de la función inmunitaria en un sujeto, donde el sujeto no tiene enfermedad conocida que compromete el sistema inmune y la composición se administra en una cantidad y durante un tiempo suficiente para
- 30 mantener la función inmune.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el sujeto es un ser humano o el sujeto es un animal de ganado doméstico o mascota.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene una condición en la que el sistema inmune se suprime indeseablemente, en
- 35 donde la composición se administra en una cantidad y durante un tiempo suficiente para estimular el sistema inmune del paciente, preferiblemente el paciente es un ser humano, o condición es un cáncer o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método de tratamiento de la inflamación en un sujeto, donde la composición se administra en una cantidad y durante un tiempo
- 40 suficiente para reducir o mejorar un signo o síntoma de la inflamación es causada por una quemadura o otras lesiones traumáticas, un producto químico irritante o toxina, una infección o una enfermedad autoinmune, preferiblemente, la infección es bacteriana o viral.
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento del síndrome metabólico en un paciente, donde la composición se administra en una cantidad y durante
- 45 un tiempo suficiente para reducir o mejorar un signo o síntoma de un síndrome metabólico en el paciente, preferiblemente el paciente es un ser humano, o el síndrome metabólico se asocia con diabetes.
10. Una composición farmacéutica que comprende (a) una composición que comprende un vehículo y (b) 100 mg de una segunda composición en la que  
(1) Alrededor del 35% de la composición en peso es una antocianina o antocianidina.
- 50 (2) Por lo menos el 15% de antocianinas y / o antocianidinas, en peso, son delfinidinas sin azúcar o con azúcar.

(3) La composición se formuló como un extracto obtenido de la planta *Aristotellia chilensis*

(4) La composición incluye el siguiente contenido de antocianidinas

- 6,38% de delfinidina-3-O-sambubiosido-5-O-glucósido

- 13,64% de delfinidina-3,5-O-diglucósido.

5 - 3,36% de cianidina 3-O-sambubiosido-5-O-glucósido,

- 1,58% de cianidina-3,5-O-diglucósido,

- 1,67% de delfinidina-3-O-sambubiosido,

- 6,95% de delfinidina-3-O-glucósido,

- 0,79% de cianidina-3-O-sambubiosido y

10 - 1,05% de cianidina-3-O-glucósido.

11. La composición farmacéutica según la reivindicación 10, que comprende una tercera composición que comprende un andrografolido, preferiblemente de aproximadamente 30 a 40% de la tercera composición es una andrografolido.

12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, que comprende (c) una tercera composición que  
15 contiene ácido cafeolínico.

13. Un método para preparar una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende:

(A) proporcionar un compuesto de la planta *Aristotellia chilensis* de antocianina y / o antocianidinas

(B) la intervención de la integridad de la planta;

(C) la extracción química de la planta intervenida para producir un líquido de extracción;

20 (D) la concentración del líquido de extracción para producir una mezcla de extracción;

(E) alcalinizar la mezcla de extracción;

(F) separar al menos un componente de la mezcla de la extracción de los otros componentes; y

(G) recoger y se secar por lo menos uno de los componentes separados.