

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-210988

(P2007-210988A)

(43) 公開日 平成19年8月23日(2007.8.23)

(51) Int.C1.

F 1

テーマコード(参考)

A61K 31/352 (2006.01)
C07D 311/92 (2006.01)
A61P 5/24 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)

A 61 K 31/352
C 07 D 311/92
A 61 P 5/24
A 61 K 35/78

4 C 062
4 C 086
4 C 088
Q

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L 外国語出願 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2006-60189 (P2006-60189)
(22) 出願日 平成18年2月7日 (2006.2.7)

特許法第30条第1項適用申請有り 1. 2005年
8月29日 ナース、ジ オベシティ ソサイエティ (NAASO, The Obesity Society)
) 発行の雑誌 「Obesity Research」
第13巻第1335~1343頁

(71) 出願人 501394413
サビンサ コーポレーション
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
8854 ピスカタウェイ ユニット 6
エセル ロード 70
(74) 代理人 100082005
弁理士 熊倉 賢男
(74) 代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74) 代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
(74) 代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(74) 代理人 100114007
弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ジテルペンフォルスコリン及びその誘導体で男性ホルモン及び女性ホルモンを生理学的に増大するための組成物

(57) 【要約】

【課題】テスツステロン、エストロゲン又はHGHの血清レベルを生理学的に増大できる組成物を提供すること。

【解決手段】有効量のフォルスコリン及び/又はその誘導体を含む、男性ホルモン及び女性ホルモン、例えば、テスツステロン、エストロゲン及びHGHを生理学的に増大するための組成物が開示される。少なくとも一種の生理学上許される担体又は賦形剤と組み合わせて約1%から100%までのフォルスコリン及び/又はその誘導体を含む、本発明に適した組成物がまた開示される。コレウス・フォルスコリ植物からのフォルスコリン及びその誘導体の調製方法だけでなく、その方法により調製されたフォルスコリン及びその誘導体組成物が更に開示される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

フォルスコリン、イソフォルスコリン又は7-デアセチルフォルスコリンを含むことを特徴とする、テストステロン、エストロゲン又はHGHの血清レベルを生理学的に増大するための組成物。

【請求項 2】

テストステロン、エストロゲン又はHGHの標的組織レベルを生理学的に増大するのに使用される、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

1-デオキシフォルスコリン、9-デオキシフォルスコリン及び1,9-ジデオキシフォルスコリンを含む、請求項1又は2記載の組成物。 10

【請求項 4】

乾燥コレウス根を微粉碎し、水とアルコール、C1-C4アルコール、二塩化メチレン、トルエン、又はヘキサンの混合物から選ばれた溶媒で抽出し、抽出物を濃縮し、ヘプタン、ペンタン、ヘキサンから選ばれた無極性溶媒で沈殿させ、濾過し、水とアルコールの混合物で逆抽出し、アルコール中で結晶化することからなるイソフォルスコリンの商業的製造方法。

【請求項 5】

乾燥コレウス根を微粉碎し、根粉末を45～55の温度及び300バールの圧力で超臨界二酸化炭素及び補助溶媒エタノールで抽出し、エタノール中で結晶化することからなるイソフォルスコリンの商業的製造方法。 20

【請求項 6】

乾燥コレウス根を微粉碎し、根粉末を45～55の温度及び300バールの圧力で超臨界二酸化炭素及び補助溶媒エタノールで抽出し、リパーゼ酵素で加水分解し、エタノール中で結晶化することからなる7-デアセチルフォルスコリンの商業的製造方法。

【請求項 7】

精油を除去するための乾燥コレウス根の商業的超臨界又は亜臨界抽出方法。

【請求項 8】

臨界温度以下で110バールから400バールまでの範囲の圧力下で超臨界ガス中に存在する種々の量のエタノールを含む超臨界二酸化炭素による商業的方法。 30

【請求項 9】

組成物が約10mg～約100mgの毎日の用量で投与される形態である、請求項1から3のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 10】

約1%～約100%のフォルスコリンを含む、請求項1から3のいずれか1項記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】**

殆どの体重損失医薬組成物及び栄養助剤は食物についての個体の食欲を低下し、個体における食物吸収の量を低減し、生体内の脂肪酸合成の速度を遅くし、又は脂肪酸の異化作用の速度を増大することにより個体中の体脂肪の量を低減するように設計される。以下は体重損失製品及びそれらのメカニズムの幾つかの例である。デクスフェンフルラミンは食欲を抑えるセロトニン、神経伝達物質及び神経ホルモンの脳レベルを増大する。また、シブトラミンはセロトニンだけでなく、ノルアドレナリンのレベルを増大し、食欲を抑えるように作用する。神経ペプチドYインヒビターは食欲を抑制するだけでなく、生体を刺激して一層多くの糖及び一層少ない脂肪を燃焼させる。プロメリピチンは神経伝達物質ドーパミンを模倣し、血糖及び肝臓による脂肪生成を低下し得る。脂肪細胞により生成されるホルモンである、レプチンは、視床下部に影響する。ホルモン及び神経伝達物質である、コレシストキニンは、食欲を低下するように作用する。ブタビンジドはコレシストキニン 40

50

を失活する酵素をブロックする。オルリストットは膵臓リパーゼに干渉し、これが食事脂肪の不十分な吸収をもたらす。インスリノトロピンは胃の空化を遅延することにより肥満を予防するグルカゴン様ホルモンである。Bta-243は脂肪細胞のベータ-アドレナリン作用性受容体を刺激して、脂肪酸の燃焼の増大をもたらす。トログリタゾンは筋肉細胞にシグナルを送って、糖ではなく脂肪をエネルギーに利用させる合成ホルモンである。サイトカインレギュレーターはホルモン様サイトカインの活性を変化し、細胞間の連絡を変化して、体重損失をもたらす。ヒドロキシクエン酸は酵素シトトレートリアーゼのインヒビターとして作用し、続いてそれは脂肪酸の合成を遅くし、脂肪酸が燃焼される速度を増大する。

【0002】

米国の男性における体脂肪の平均の量は22～25%であり、また米国の女性では、脂肪の平均の量は33～35%である。これらの値は最適値（これらは20-29才の男性について15～19%であり、また20-29才の女性について19～23%である）よりもはるかに上である。40-49才についての相当する値は夫々、17～21%及び21～25%であり、また60才について、相当する値は夫々、19～23%及び23～27%である。高度に超過体重の個体では、脂肪組織が体重の70%までを構成し得る。

生体組成の残りの%は脂肪なし体重に相当する。脂肪なし体重は生体中の筋肉、生体器官、骨、結合組織及びその他の非脂肪組織、並びに生体水の殆どを含む。生体の代謝速度は脂肪なし体重の量に直接比例する。それ故、脂肪なし体重を考慮することが体重損失戦略に重要である。

上記重量コントロール手段は重量損失のプロセスで脂肪なし体重を維持又は増大することの重要性を考慮しない。実際に、体脂肪を減少するための養生法が脂肪なし体重の異化消耗にしばしば寄与する。増大された脂肪なし体重は生体代謝を調節し、体重を失うことを助けるだけでなく、達成された重量低減を維持する。一方で、減少された脂肪なし体重は生体代謝を遅くし、適当な、健康な体重を維持することの困難をもたらす。こうして、理想的な体重管理アプローチは脂肪の最適比率を脂肪なし体重に回復することにより体重を許容レベルに低下することであるべきである。脂肪なし体重を維持又は増大すると同時に体脂肪を減少することにより、重量損失養生法が個体の総合の健康を改善するという一般目的に利用できるであろう。

脂肪なし体重（例えば、骨格筋）の維持又は増大は重量損失戦略に重要な考慮の一つである。何とならば、脂肪なし体重は代謝の速度及び食物に対する生体の発熱応答を決定し、食物誘導熱発生及び代謝速度が、順に、体脂肪の異化作用の増大により体重をコントロールするからである。これは熱発生が体脂肪の貯蔵及び食物に由来する脂肪酸により優先的に支持されるからである。加えて、高速の熱発生は一層多くの食物が吸収されること及び脂肪組織ではなく、脂肪なし体重の優先的な蓄積に寄与する。

【0003】

脂肪なし体重維持及び生体組成減少の防止の重要な成分の一つは内在性テストステロン、エストロゲン及びヒト成長ホルモンの充分な供給を有することである。テストステロン及びエストロゲンはソマトトロフ軸 (somatotroph axis) 中の幾つかのホルモンの反応の最終生成物である。例えば、テストステロンについてのソマトトロフ軸は視床下部により分泌されるゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)で開始し、下垂体前葉による黄体形成ホルモン(LH)及び卵胞刺激ホルモン(FSH)の拍動分泌をコントロールする。黄体形成ホルモンは睾丸のライディヒ細胞によるテストステロンの生成及び分泌を調節し、FSHは精子生成を刺激する。

老化はソマトトロフ軸の減少、エストロゲン及びテストステロンの生成の減少、ホルモンの有害な形態、例えば、ジヒドロテストステロン(DHT)の増大-通常の老化の異化後遺症の多くを生じると考えられていたイベントと関連している。例えば、年齢による骨質量の損失（骨多孔症）が脂肪なし体重の損失の例であり、老人個体における生体組成の劣化をもたらす。GH (IGF-1、HGH)に例示されるが、これらに限定されない、成長ホルモン) 分泌の減少は代謝、骨、筋肉、心血管系、中枢神経系、免疫系及び幸福感の年齢に関係する変化を部分的に説明し得る。老化と成長ホルモン欠乏の間の臨床上の類似性のために、老

10

20

30

40

50

人被験者の相対的GH不足がそれらのもろさに寄与する一つの重要な因子と仮定されていた。

生体組成における有害な変化の別の例は生殖腺の低機能にある。性機能低下及び低レベルの血清テストステロンを有する男性は生体組成の負の変化、例えば、減少された筋肉質量、増大された比率の体脂肪、及び体脂肪分布の変化を有する。性機能低下とは独立に、減少された脂肪なし体重、増大された体脂肪及び全体重がホルモンの不均衡及び低レベルの血清テストステロンに寄与する。加えて、テストステロン及びエストロゲンの血清レベルが、特に超過重量及び肥満の個体における、血清コルチゾルのレベルと負の相関関係がある。

【0004】

本発明はミント科 (Fam. Lamiaceae) の一員であるコレウス・フォルスコリ (*Coleus forskohlii*)、*Briq.* (*Syn. C. barbatus* (*barbatus*) Benth., *Plectranthus barbatus*), *Andr.*、また *P. foersteri* (*Willd.*), *P. comosus* (*Willm.*) の根から得られたジテルペングルコリン及びその天然誘導体イソフォルスコリン及び7-デアセチルフォルスコリンを含む。フォルスコリンは抗高血圧活性、正の変力作用を有し、また血小板凝集を抑制すると報告されていた (de Souzaら, 1983; Ammon及びMuller, 1985)。フォルスコリンの作用のメカニズムは環状アデノシンモノホスフェート (cAMP) (これは幾つかの生物学的応答を媒介する) の細胞内レベルを増大する、アデニレートシクラーゼに対するその刺激作用に関係していると考えられている (de Souzaら, 1983; Ammon及びMuller, 1985; Dohadwalla, 1985; Seamon, 1985)。フォルスコリンの種々の作用に関する多くの薬理学的研究が局所、静脈内 (i.v.)、動脈内、腹腔内 (i.p.)、気管内 (i.t.)、及び吸入の治療後に実験動物及びヒトで行なわれていた。cAMPの生理学的作用 (これらはまたフォルスコリンにより実証されていた) として、血小板凝集の抑制、*in vitro* の増大された脂肪細胞リポリーゼ、心臓筋肉に対する正の変力作用、臍臓によるインスリン分泌の強化、甲状腺ホルモンの増大された分泌、副腎による増大されたステロイド生成、下垂体による増大された副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 放出、及び局所適用における低下された眼内圧力が挙げられる (Dubeyら, 1981; Caprioli及びSears, 1983; Malaisse及びMalaisse-Lagae, 1984; Ammon及びMuller, 1985; Dohadwalla, 1985; Potterら, 1985)。老化したラットライディヒ細胞の分泌能はフォルスコリン刺激により、また刺激によらずに若いラットライディヒ細胞のそれよりも低いと判明された (Dengら, 2005)。フォルスコリンはまた重大な副作用を生じないでモルモット (10分間で体重1kg当り1mLの用量そして30 µgのi.t.投与) 及び喘息患者 (乾燥粉末として、フォルスコリン1~10mgの吸入) で気管支拡張を誘発すると報告されていた (Lichetら, 1984; Kreutnerら, 1985; Bauerら, 1993)。イソフォルスコリン及びフォルスコリンの両方がウサギで眼の高血圧に対して抑制作用を有する (Liら, 2000)。1-アセチル-7-デアセチルフォルスコリン フォルスコリンは培養されたヒト内皮細胞中でアデニリルシクラーゼを活性化し、一方、1-アセチル-7-デアセチルフォルスコリンは活性化しなかった (Sasakiら, 1995)。7-デアセチルフォルスコリンは強力な心臓作用のジテルペノイドフォルスコリンの水溶性誘導体を提供するために調製された (Khandelwalら, 1988)。イソフォルスコリン又は7-デアセチルフォルスコリンではなく、フォルスコリンがまた超過体重及び肥満のヒト被験者で脂肪なし体重を増大することが示されていた (Majeed, Badmaev、Rajendranの米国特許 (1998年))。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は最初に超過体重及び肥満の若い男性へのフォルスコリンの経口投与が血清テストステロンのレベルを増大することを実証する。

本発明はフォルスコリン、イソフォルスコリン又は7-デアセチルフォルスコリンを含む、テストステロン、エストロゲン又はHGHの血清レベルを生理学的に増大するための組成物に関する。また、本発明はコレウス・フォルスコリ又は関連種から抽出されたフォルス

10

20

30

40

50

コリン、イソフォルスコリン又は7-デアセチルフォルスコリンをヒトに投与してテストステロン、エストロゲン、HGHの血清レベルを生理学的に増大することを特徴とする方法に関する。

更に、本発明はホルモン不足を有するもの又は超過体重及び肥満である恐れの高いものの中で、老化のプロセスに予想される生体組成劣化の阻止における血清テストステロン、エストロゲン及びHGHを増大する安全な、生理学的方法に関する。精神的及び肉体的スタミナを改善する方法が開示される。少なくとも一種の生理学上許される担体又は賦形剤と組み合わせて約1%から約95%未満までのフォルスコリン及び/又はその誘導体を含む、本発明に適した組成物がまた開示される。

コレウス・フォルスコリ植物からのフォルスコリン及びその誘導体の調製方法だけでなく、その方法により調製されたフォルスコリン及びその誘導体の組成物が更に開示される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

コレウス・フォルスコリ又は関連種から抽出されたフォルスコリン、イソフォルスコリン又は7-デアセチルフォルスコリンが使用されることが好ましい。

その組成物は約10mg～約100mgの毎日の用量で投与される形態であることが好ましい。更に、組成物は約1%～約100%のフォルスコリンを含むことが好ましい。好ましい量は約5%～約20%、更に好ましくは約8%～約15%、最も好ましくは約10%のフォルスコリンである。

本発明の組成物は必要な被験者の生体組成劣化の阻止、並びに精神的及び肉体的スタミナの改善に使用し得る。

本発明の更に別の主題は

- (a) 超臨界抽出方法でコレウス・フォルスコリ植物のフォルスコリン、イソフォルスコリン及び7-ジアセトフォルスコリン抽出物を得、
- (b) 水及び有機溶媒でコレウス・フォルスコリ植物から抽出されたイソフォルスコリン及び7-ジアセトフォルスコリンを得、
- (c) 工程(a)及び/又は(b)で得られた量のフォルスコリンを少なくとも一種の生理学上許される担体又は賦形剤と合わせて前もって決められたフォルスコリン含量を有するフォルスコリン組成物を生成することによりフォルスコリン組成物を調製することを特徴とする、コレウス・フォルスコリ植物のフォルスコリン抽出物からのフォルスコリン組成物の調製方法である。

また、本発明は上記方法から調製された組成物だけでなく、こうして調製された組成物の使用方法を含む。

更に、本発明は乾燥コレウス根を微粉碎し、水とアルコール、C1-C4アルコール、二塩化メチレン、トルエン、又はヘキサンの混合物から選ばれた溶媒で抽出し、抽出物を濃縮し、ヘプタン、ペンタン、ヘキサンから選ばれた無極性溶媒で沈殿させ、濾過し、水とアルコールの混合物で逆抽出し、アルコール中で結晶化することからなるイソフォルスコリンの商業的製造方法を開示する。

【0007】

更に、本発明は乾燥コレウス根を微粉碎し、根粉末を45～55の温度及び300バールの圧力で超臨界二酸化炭素及び補助溶媒エタノールで抽出し、エタノール中で結晶化することからなるイソフォルスコリンの商業的製造方法を開示する。

更に、本発明は乾燥コレウス根を微粉碎し、根粉末を45～55の温度及び300バールの圧力で超臨界二酸化炭素及び補助溶媒エタノールで抽出し、リバーゼ酵素で加水分解し、エタノール中で結晶化することからなる7-デアセチルフォルスコリンの商業的製造方法を開示する。

更に、本発明は精油を除去するための乾燥コレウス根の商業的超臨界又は亜臨界抽出方法を開示する。

更に、本発明は超臨界ガス中に存在する種々の量のエタノールを含む超臨界二酸化炭素

10

20

30

40

50

による商業的方法を開示する。その圧力は臨界温度以下で110パールから400パールまでの範囲であった。エタノールは溶媒改良剤として使用された。エタノール量が0.01モル%から10モル%まで変化された広範囲の組成物が使用された。

【実施例】

【0008】

実施例1. 男性におけるフォルスコリン消費と関連するホルモン適合

本発明のランダム化、二重盲検臨床研究は30人の超過体重及び肥満の若い男性（フォルスコリン、n=15；偽薬、n=15）で12週にわたって10%のフォルスコリンビッド（セレウス・フォルスコリ根の標準化抽出物）250mgの経口摂取を調べた。超過体重及び肥満（ $BMI > 26\text{kg/m}^2$ ）の男性における生体組成、テストステロン、代謝速度、及び血圧に関するフォルスコリンの作用。フォルスコリンは偽薬グループと較べてDXAにより測定して体脂肪%（BF%）及び脂肪質量（FM）を有意に減少することにより生体組成の有利な変化を誘発すると示された（ $p < 0.05$ ）。更に、フォルスコリン投与は偽薬と較べて12週の試験について骨質量の有意な増大をもたらした（ $p < 0.05$ ）。偽薬と較べてフォルスコリングループにおける脂肪なし体重に有意な増大の傾向があった（ $p = 0.097$ ）。血清遊離テストステロンレベルは偽薬グループと較べてフォルスコリングループで有意に増大された（ $p < 0.05$ ）。表1及び表2を参照のこと。

生体組成及びフォルスコリン消費、Godard、Johnson、及びRichmond

10

20

30

【0009】

表1. 夫々の時点における体重、LBM、及び脂肪質量を含む生体組成値

	前	中間	後	変化 (前-後)	変化% (前-後)
フォルスコリン					
体重 (kg)	103.98± 14.89	104.23± 15.04	103.91± 15.06	-0.07± 2.39	-0.08± 2.44
LBM(kg)	63.61± 5.94		67.32± 8.29†	3.71± 4.07	5.65± 6.32
脂肪質量(kg)	37.43± 12.65		32.91± 11.29†	-4.52± 5.74*	-11.23± 13.20*
骨質量(kg)	3.41± 0.43		3.68± 0.43†	0.27± 0.31*	8.63± 10.46
偽薬					
体重 (kg)	100.95± 9.30	102.09± 9.75	102.15± 9.65	1.20± 2.33	1.20± 2.35
LBM(kg)	61.82± 6.44		63.39± 7.07†	1.57± 2.56	2.56± 4.39
脂肪質量(kg)	35.65± 9.99		35.14± 10.56	-0.51± 1.91	-1.73± 5.64
骨質量(kg)	3.41± 0.55		3.60± 0.51	0.20± 0.53	7.46± 18.78

10

20

30

40

【0010】

前後の測定からの実際の変化及び変化%がまた含まれる。全ての値は平均-SDとして表される。

時間にわたるグループ間の有意差*及びグループ内の有意差† ($p<0.05$)

生体組成及びフォルスコリン消費、Godard、Johnson、及びRichmond

【0011】

表2. 夫々の時点における全テストステロン値及び遊離テストステロン値

	前	中間	後	変化 (前-後)	変化% (前-後)
フォルスコリン					
全テストステロン (ng/mL)	5.06± 1.21*	5.27± 1.03*	5.75± 1.50*	0.69± 1.26	16.77± 33.77
遊離テストステロン (pg/mL)	15.90± 13.39	15.67± 13.68	16.36± 13.32	0.46± 0.86*	3.47± 8.10
偽薬					
全テストステロン (ng/mL)	4.12± 0.82	3.97± 0.85	4.00± 0.89	-0.11± 0.95	-1.08± 18.35
遊離テストステロン (pg/mL)	13.28± 7.26	12.28± 7.44	12.77± 7.30	-0.51± 1.04	-4.11± 11.48

【0012】

50

前後の測定からの実際の変化及び変化%がまた含まれる。全ての値は平均-SDとして表される。

*グループ間の有意差 (p<0.05)

参考例1. 超過体重の女性におけるフォルスコリンの経口投与の臨床効果

二重盲検かつランダム化された様式で、23人の女性に12週にわたって1日当たり2回でフォルスコリン (10%のコレウス・フォルスコリ抽出物250mg、n=7) 又は偽薬(n=12)とともに彼女らの食事を補充した。生体組成(DEXA)、体重、及び心理測定器具を補充の0週、4週、8週及び12週に得た。有意差がカロリー摂取又はマクロ栄養摂取で観察されなかった。フォルスコリンは体重の獲得 (-0.7±1.8、1.0±2.5kg、p=0.10) 及びスキャンされた質量の獲得 (-0.2±1.3、1.7±2.9kg、p=0.08) を軽減する傾向があった。フォルスコリングループ中の被験者は少ない疲れ(p=0.07)、空腹(p=0.02)、及び満腹(p=0.04)を報告する傾向があった。これらの結果はフォルスコリンが明らかに臨床上の重大な副作用なしに超過体重の女性の体重獲得を軽減することを助け得ることを示唆する。

10

【0013】

参考例2. 肥満の動物モデルに関するイソフォルスコリン、7-デアセチルフォルスコリン及びフォルスコリン抽出物、並びにその組成物の比較効果

その研究を12の動物のグループに分けられた合計84匹の動物について、25-30週の年齢のスイス・アルビノマウス(ハフキン協会、ムンバイ、インド)で行なった。治療中のマウスに炭水化物及び脂肪に富む食事を与えた。食事は対照に対し信頼できる重量獲得を生じた。対照と治療マウスの体重の差が10gを超えた場合にのみ、薬物治療を開始した。夫々のグループ中のマウスに、1日2回の、胃挿管により、6週の期間にわたってイソフォルスコリン抽出物、10%の7-デアセチルフォルスコリン抽出物及びフォルスコリン抽出物(1mg/ml)の毎日の一定用量を与えた。6週の終了時に、体重測定及びフラブ(flab)測定を行なった後に、グループ当たり6匹のマウスを眠らせた。血液を心臓穿刺により抜き取り、直ちに遠心分離して血漿を分離し、コレステロールレベル、トリグリセリドレベル、グルコースレベル、チロキシンT3、T4及びTSHレベルについて分析した。

20

腹部の脂肪及び甲状腺を組織病理学のために固定した。脂肪組織の別々のサンプルを集め、合計脂質含量について分析した。夫々のグループからの残りのマウスを治療の最初の6週中に与えられたのと同じ食事で続けた。このグループを更に6週にわたってこの様式で管理し、その終了時に非観血的パラメーター、例えば、体重及びフラブをもう一度評価した。

30

結果：対照及び治療マウスの両方が6週の治療期間中の胃挿管の操作に耐えた。抽出物10%のイソフォルスコリン、10%の7-デアセチルフォルスコリン及び10%のフォルスコリンがマウスの集団により良く寛容された。6週の終了時に、ランダムに選ばれた、夫々のグループからのマウスを眠らせ、切開して(a)組織病理学のための脂肪組織及び甲状腺を切除し、(b)一般解剖を調べ、器官、例えば、腸、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、生殖器等の何らかの変化を記録した。動物のいずれもが異常な解剖学的特徴を示さないことが観察された。

腹部の脂肪は異なるグループで興味のある特徴を示す。例えば、偽薬又は薬物治療中の対照グループのマウスは脂肪組織の両側の小葉中に腹部脂肪分布の良好な量を示した。肥満の偽薬グループからの動物はかなり多量の腹部脂肪を有し、両側の脂肪組織小葉が腹腔の1/3以上に延びていた。一方で、10%のイソフォルスコリン、10%の7-デアセチルフォルスコリン及び10%のフォルスコリンで治療された肥満グループの動物は実際に腹部脂肪を排出し、これは10%のフォルスコリン及び10%のイソフォルスコリンのグループで一層顕著であった。動物のこれらのグループでは、腹膜脂肪だけでなく、子宮と密接に関連する脂肪付着のかなりの損失があった。腎臓及び卵巣に近い脂肪組織が適切であることが明らかであったが、偽薬治療中の肥満グループと較べて少なかった。

40

【0014】

50

表3 実験マウスの体重の毎週の記録における治療の効果

治療	平均体重(n=12) (単位g)							
	0週	1週	2週	3週	4週	5週	6週	0-6週の間の変化%
対照-偽薬	25.23 ±2.80	26.26 ±4.0	26.41 ±3.28	26.18 ±2.31	26.90 ±3.08	27.4 ±3.09	28.33 ±2.64	+12
肥満-偽薬	36.69 ±2.71	37.72 ±2.28	37.36 ±2.29	37.18 ±2.27	35.64 ±2.69	35.5 ±2.68	35.6 ±3.10	-0.003
肥満-抽出物1	37.18 ±3.48	36.81 ±3.25	34.93 ±3.80	33.00 ±4.54	31.86 ±4.09	31.69 ±4.66	29.61 ±5.77**	-20.37
肥満-抽出物2	36.11 ±3.21	36.32 ±3.55	35.08 ±3.88	34.36 ±4.01	32.15 ±3.91	31.87 ±4.81	30.78 ±5.96**	-14.76
肥満-抽出物3	37.33 ±4.02	36.73 ±3.67	34.88 ±4.31	34.58 ±3.76	32.67 ±3.87	32.21 ±3.34	31.54 ±4.76**	-15.51

【0015】

**分散の一方分析(ANOVA)による重量の有意な減少

抽出物1: 10%のフォルスコリンを含む

抽出物2: 10%の7-デアセトフォルスコリンを含む

抽出物3: 10%のイソフォルスコリンを含む

上記表に見られるように、全ての治療グループで合計体重の有意な減少があり、変化%はフォルスコリングループで最大である。

【0016】

表4 実験マウスの腹部フラブの毎週の記録における治療の効果

治療	平均腹部フラブ(n=12) (単位mm)							
	0週	1週	2週	3週	4週	5週	6週	0-6週の間の変化%
対照-偽薬	0.81 ±0.12	0.91 ±0.09	0.92 ±0.10	0.93 ±0.09	0.94 ±0.11	0.97 ±0.12	0.99 ±0.11	+22.22
肥満-偽薬	1.24 ±0.12	1.39 ±0.08	1.32 ±0.09	1.33 ±0.07	1.26 ±0.11	1.11 ±0.09	1.11 ±0.12	-13.00
肥満-抽出物1	1.42 ±0.15	1.27 ±0.12	1.20 ±0.14	1.11 ±0.11	0.99 ±0.11	0.91 ±0.07	0.82 ±0.11**	-42.22
肥満-抽出物2	1.38 ±0.14	1.26 ±0.17	1.22 ±0.15	1.16 ±0.12	1.08 ±0.13	0.98 ±0.11	0.88 ±0.09**	-34.81
肥満-抽出物3	1.35 ±0.16	1.30 ±0.14	1.28 ±0.14	1.17 ±0.13	1.10 ±0.12	0.94 ±0.11	0.85 ±0.10**	-38.41

【0017】

**は分散の一方分析(ANOVA)における統計上の有意を示す

抽出物1: 10%のフォルスコリンを含む

抽出物2: 10%の7-デアセトフォルスコリンを含む

抽出物3: 10%のイソフォルスコリンを含む

上記表に見られるように、全ての治療グループで腹部フラブの有意な減少があり、変化%はフォルスコリングループで最大である。

【0018】

表5 6週の治療後の実験マウスの脂肪組織及び脂肪含量における治療の効果

10

20

30

40

50

グループ	脂肪組織の平均重量	平均容積 (ml)	脂肪の平均重量 (g)	脂肪組織の比密度	脂肪の比密度
対照-偽薬	0.18±0.09	0.3±0.14	0.12±0.05	0.61	0.4
肥満-偽薬	0.29±0.10	0.4±0.14	0.21±0.07	0.73	0.52
肥満-抽出物1	0.18±0.13	0.4±0.2	0.12±0.09	0.45	0.30
肥満-抽出物2	0.21±0.14	0.4±0.16	0.16±0.06	0.54	0.40
肥満-抽出物3	0.20±0.15	0.38±0.18	0.13±0.08	0.50	0.36

10

20

30

40

【0019】

抽出物1：10%のフォルスコリンを含む

抽出物2：10%の7-デアセトフォルスコリンを含む

抽出物3：10%のイソフォルスコリンを含む

参考例3. 本発明のフォルスコリン（コレウス・フォルスコリ根の標準化10%抽出物）の *in vitro* の予備臨床及び臨床上の毒物学的研究

急性毒性研究

急性毒性研究において、雄及び雌のウィスターラットに体重1kg当り2,000mgのフォルスコリンの単一経口用量を与えた（Graver, 2000）。死亡が生じなかった。しかしながら、下痢、肛門性器の領域の汚れ、並びに口及び肛門性器領域の湿潤が報告された。組織病理学的の病変が検死後に観察されなかった。LD₅₀は体重1kg当り>2,000mgであると報告された。de Sousaら(1983)による先の研究はフォルスコリンの急性LD₅₀が夫々マウス及びラットで経口投与により3,100mg/kg及び2,550mg/kg、また腹腔内投与された場合には105mg/kg及び92mg/kgであると示した。

ラットにおける亜慢性毒性研究

5匹のSDラット/性別のグループに28日の期間にわたって強制飼養により1日当り体重1kg当り0、100、300、又は1,000mgのC.フォルスコリ10%抽出物の用量を投与した（Bhinde, 2004）。ラットの二つの追加のグループ（5匹/性別/グループ）に28日にわたって1日当り体重1kg当り0又は1,000mgの用量で抽出物を投与し、その後に14日の回復期間にわたって観察して可能な効果の可逆性を評価した。臨床上の徵候及び死亡率の毎日の観察、並びに体重及び食物消費の毎週の測定を行なった。眼の検査を投薬期間の開始時及び終了時並びに回復期間の終了時に行なった。血液学的パラメーター、生化学的パラメーター、及び尿パラメーターを投薬期間及び回復期間の終了時に評価した。全ての動物を検死にかけ、器官の組織病理学的試験を行なった。毒物学的作用がいずれの用量でも測定パラメーターのいずれにも観察されなかった。C.フォルスコリの10%抽出物の非観察作用レベル(NOEL)は試験した最高の用量である、1日当り体重1kg当り1,000mgであると考えられた。このNOELは意図されるヒト用量（1日当り体重1kg当り約8.3mg）の適切な高い倍量（120倍）に相当する。

【0020】

突然変異誘発性研究

本発明は5,000μg/プレートまでの用量で、代謝活性化の存在下及び不在下の両方で、サルモネラ・ティフィムリウム株TA98、TA100、TA1535、及びTA1537、並びにエシェリキア・コリ株WP2 uvrAを使用する独立の反復アッセイとともに細菌逆突然変異アッセイで突然変異誘発性ではないと報告された（Wagner及びKlug, 2001）。

臨床研究

重量損失に関する本発明の効力を調べる幾つかの臨床研究が行なわれ、表1に要約され

50

る。安全性に関するパラメーターがまた監視されたことを注目することが重要であるが、効力がこれらの試験の主目的であった。臨床上重大な相互作用が代謝マーカー、血液脂質、筋肉及び肝臓の酵素、電解質、赤血球、白血球、ホルモン（インスリン、TSH、T3、及びT4）、心拍数、血圧、又は副作用の毎週の報告に見られなかった。

10

20

30

40

表6 コレウス・フォルスコリ抽出物の臨床研究の要約					
被験者の数	C. フォルスコリ抽出物の用量 (mg/日) 〔フォルスコリンの用量(mg/日)〕	研究 デザイン	研究 長 さ	測定結果	文献
フォルスリーン(登録商標)の臨床研究					
14人の超過体重被験者(男性1人、女性13人)	250 [25]	開放フィールド研究	12週	収縮期及び拡張期の血圧又は脈拍数に重大な作用なし;重大な副作用なし	Tsuguyoshiら, 2001
6人の超過体重の女性	500 [50]	開放フィールド研究	8週	収縮期及び拡張期の血圧又は脈拍数に重大な作用なし	Badmaevら, 2002
16人の超過体重の男性(8人/グループ)	500 [50]	ランダム化、二重盲検、偽薬対照研究	8週	体重、心拍数、平均静脈圧、又は収縮期及び拡張期の血圧に重大な作用なし	Agena, 未公表
19人の女性 〔n=12(対照) ; n=7(試験)〕	500 [50]	ランダム化、二重盲検、偽薬対照研究	12週	代謝マーカー、血液脂質、筋肉及び肝臓の酵素、電解質、赤血球、白血球、ホルモン(インスリン、TSH ^a 、T ₃ ^b 、T ₄ ^c)、心拍数、血圧、又は報告された副作用においてグループ間に有意な差がない	Kreiderら, 2004
60人の肥満の男性及び女性(30人/グループ)	500 [50]	ランダム化、二重盲検、偽薬対照研究	12週	増大されたHDL ^d コレステロール及び合計:HDLコレステロールの減少された比を除いて、血圧、肝臓、腎臓、及び甲状腺の機能又は血液脂質プロファイルに重大な作用なし	Bhagwatiら, 2004
30人の超過体重又は肥満の男性 (15人/グループ)	500 [50]	ランダム化、二重盲検、偽薬対照研究	12週	対照に較べてフォルスコリングループで体脂肪率及び脂肪質量にかなりの減少並びに血清遊離テストステロンの有意な増大;体重又は収縮期及び拡張期の血圧に重大な作用なし;副作用の発生が報告されなかつた	Godardら, 2005

表6 コレウス・フォルスコリ抽出物の臨床研究の要約

被験者の数	C. フォルスコリ抽出物の用量 (mg/日) 〔フォルスコリンの用量(mg/日)〕	研究 デザイン	研究 長 さ	測定結果	文献
50人の超過 体重又は肥 満の男性及 び女性(25人 /グループ)	500 [50]	ランダム化、 二重盲検、 偽薬対照、 マルチセンタ ー研究	12 週	対照と較べてフォルス リーン(登録商標)グル ープで脂肪なし体重 の%に有意な増大、体 重、生体質量指数、及 び体脂肪含量%に減少 ；腎臓機能試験(尿素 及びクレアチニン)、 肝臓機能試験(ビリル ビン、SGOT ^a 、SGPT ^f)、 又は甲状腺機能試験(T SH、T ₃ 、T ₄)で重大な作 用なし；血清全コレス テロール、HDLもしくは LDL ^g コレステロール、又 はトリグリセリドレベル に重大な変化なし； 重大な副作用なし	Kamath ら、 未公表

10

20

20

30

40

40

【0023】

- ^a 甲状腺刺激ホルモン
- ^b トリヨードチロニン
- ^c チロキシン
- ^d 高密度リボタンパク質
- ^e 血清グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ
- ^f 血清グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ
- ^g 低密度リボタンパク質

調製実施例1：イソフォルスコリンの商業的製造方法

本発明はまたコレウス・フォルスコリ植物のフォルスコリン抽出物からのイソフォルスコリン組成物の調製方法を含む。その方法はその植物の微粉碎された根を水、C1-C4アルコール、MDCのような塩素化溶媒、トルエンもしくはヘキサンから選ばれた溶媒で抽出することを伴い、又は溶媒は水とアルコールの混合物であり、その中で好ましい抽出媒体はトルエンである。濃縮されたトルエン抽出物を型ヘプタン、ペンタン、ヘキサンの一層無極性の溶媒で沈殿させ、濾過し、濾液を10:90~90:10の比の水性アルコールの混合物で逆抽出して所望の分子イソフォルスコリンを得、更にそれをアルコールで結晶化して所望の純度を得る。

【0024】

調製実施例2：7-デアセチルフォルスコリンの商業的製造方法

上記実施例からの全抽出物を溶媒媒体(アルコール、トルエン又はヘキサンを含むが、これらに限定されない)に溶解し、12時間にわたって攪拌下で37℃で0.1-10%、好ましくは1-5%の濃度の固定酵素リパーゼで処理する。反応が一旦完結すると、その物質を10:90~90:10の比の水性アルコールの混合物で逆抽出して所望の分子7-デアセチルフォルスコ

50

リンを得、更にそれをアルコールで結晶化して所望の純度を得る。

調製実施例3：二酸化炭素抽出によるイソフォルスコリン及び7-デアセチルフォルスコリンの商業的製造方法

エタノール、アセトン又は酢酸エチルの如きエントレイナーを用いて、又は用いずに二酸化炭素を使用する超臨界流体抽出がイソフォルスコリン及び7-デアセチルフォルスコリンをコレウス植物の根から抽出することが記載される。抽出物を25から120まで、好ましくは45-55の範囲の温度で得、補助溶媒、好ましくは5%~80%のエタノール、更に好ましくは30-100%のエタノールを使用し、又は使用しないで、抽出流体圧力を1-5時間、好ましくは3時間にわたって1-4kg/時間、好ましくは2kg/時間の二酸化炭素流量で100~300バール、好ましくは300バールに維持した。得られた抽出物を液体媒体中でリバーゼ酵素で加水分解し、エタノールから結晶化して所望の純度の7-デアセチルフォルスコリンを得る。

【0025】

調製実施例4：二酸化炭素抽出によるフォルスコリン、イソフォルスコリン、7-デアセチルフォルスコリン、1-デオキシフォルスコリン、9-デオキシフォルスコリン及び1,9-ジデオキシフォルスコリンの商業的製造方法

コレウス・フォルスコリの根及び茎はフォルスコリン、イソフォルスコリン及び7-デアセチルフォルスコリンの豊富な源である。加えて、1-デオキシフォルスコリン、9-デオキシフォルスコリン及び1,9-ジデオキシフォルスコリンの如き少量成分がまた油とともに存在する。

超臨界方法は極性に依存するこれらの成分の差別的抽出に基づいている。二酸化炭素の極性は抽出方法で幾つかの重要なパラメーターを変えることにより変化し得る。二酸化炭素は73.8バールの臨界圧力及び31.06の臨界温度を有する。これが実験パラメーターの選択において可能な広い変化を可能にする。第一のパラメーターは圧力である。抽出ガスの圧力の変化が抽出溶媒の性質を変える。第二のパラメーターは温度範囲である。超臨界二酸化炭素の極性を変える際の第三の重要な変数は補助溶媒の添加である。幾つかの補助溶媒が可能であり、本作業で使用された。溶媒改良剤は約0.01モル%から10.0モル%までを構成し、MeOH、EtOH、PrOH、イソ-PrOH、BuOH、ベンジルアルコール、アセトン、アセトフェノン、N-メチル-2-ピロリドン、メチルエチルケトン、DMSO、DMF、エチレンギリコール、及びアセトニトリルの如き溶媒を含んでいた。エタノールの使用が本作業において特に採用され、好ましい。また、ガスの流量だけでなく、植物物質の粒子サイズが抽出効率に影響する。補助溶媒が超臨界二酸化炭素の抽出能に最大の効果を有する。

植物の根又は茎の部分を水で良くきれいにし、次いで日光又は密閉オーブン中で乾燥させることにより水分を含まずに良く乾燥させた。

【0026】

実際の方法では、植物の乾燥部分を最初に超臨界又は亜臨界二酸化炭素で抽出してその中に存在する油を除去する。得られる植物部分は非常に粉末状の外観であった。超臨界ガス中に存在するエタノールの量を変えて、これを超臨界二酸化炭素で再度抽出する。圧力は臨界温度以下で110バールから400バールまでの範囲であった。エタノールを溶媒改良剤として使用した。エタノールの量が0.01モル%から10モル%まで変化された広範囲の組成を使用した。

上記方法により調製されたフォルスコリン、イソフォルスコリン、7-デアセチルフォルスコリン、1-デオキシフォルスコリン、9-デオキシフォルスコリン及び1,9-ジデオキシフォルスコリン組成物は安定である。組成物を通常の周囲の貯蔵条件だけでなく、促進貯蔵条件に暴露することにより、組成物の安定性を測定した。この研究中、その品質を安定性指示パラメーターについて試験した。その研究につき、抽出物はそれが通常の周囲の貯蔵条件下で貯蔵される場合に、5年以上の期間にわたって安定である。

本発明はこの方法により製造された生成物（即ち、組成物）を含む。生成物は通常約1%から約40%までのフォルスコリンを含み得るが、100%までの純粋なフォルスコリンが可能である。好ましい量は約5%から約20%まで、更に好ましくは約8%から約15%まで

10

20

30

40

50

、最も好ましくは約10%のフォルスコリンである。

本明細書に開示された本発明の妥当な改良は良く当業者の範囲内にあり、また本発明の範囲内にあることが意図されている。本発明の範囲は本明細書に示された特別の例により限定されないことが意図されているが、むしろ特許請求の範囲に従って解されるべきである。

フロントページの続き

(72)発明者 ヴラディミール バドマエフ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10314 スティタン アイルランド フォレスト ヒル 口
ード 1440-6

(72)発明者 ムハンメド マジード
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08854 ピスカタウェイ マシュー コート 31
F ターム(参考) 4C062 HH55
4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04 NA14 ZC04 ZC10 ZC11
4C088 AB38 AC11 BA09 BA10 CA06 CA08 CA10 CA19 NA14 ZC03

【外國語明細書】

SPECIFICATION

Composition for physiological increase of male and female hormones with diterpene forskolin and its derivatives

BACKGROUND OF THE INVENTION

Most weight loss pharmaceutical compositions and nutraceutical aids are designed to decrease the amount of body fat in an individual by decreasing the individual's appetite for food, decreasing the amount of food absorption in the individual, slowing down the rate of fatty acid synthesis within the body, or increasing the rate of catabolism of fatty acids. The following are some examples of weight loss products and their mechanisms. Dexfenfluramine increases the brain levels of serotonin, a neurotransmitter and neurohormone that quells the appetite. Sibutramine also increases the levels of serotonin, as well as noradrenaline, and works to quell the appetite. Neuropeptide Y inhibitors curb the appetite, as well as stimulating the body to burn more sugars and less fat. Bromeriptine mimics the neurotransmitter dopamine, and may reduce blood sugar and fat production by the liver. Leptin, a hormone generated by adipocytes, affects the hypothalamus. Cholecystokinin, a hormone and neurotransmitter, acts to reduce appetite. Butabindide blocks an enzyme that inactivates cholecystokinin. Orlistat interferes with pancreatic lipase, which results in poor absorption of dietary fat. Insulinotropin is a glucagon-like hormone which prevents obesity by slowing down the emptying of the stomach. Bta-243 stimulates beta-adrenergic receptors on adipocytes, with a resulting increase in the burning of fatty acids. Troglitazone is a synthetic hormone which signals muscle cells to utilize fat for energy, rather than sugars. Cytokine regulators change the activity of hormone-like cytokines and alter the communication among cells, resulting in weight loss. Hydroxycitric acid acts as an inhibitor of enzyme citrate lyase, which subsequently slows down the synthesis of fatty acids and increases the rate at which fatty acids are burned.

The average amount of body fat in the American male is 22 to 25%, and in the American female, the average amount of fat is 33 to 35%. These values are far above optimal values, which are 15 to 19% for 20-29 year old males and 19 to 23% for 20-29 year old females.

Corresponding values for 40-49 year olds are 17 to 21% and 21 to 25%, respectively; and for 60 year olds, the corresponding values are 19 to 23% and 23 to 27%, respectively. In highly overweight individuals, fat tissue can constitute up to 70% of body weight.

The remaining percentage of body composition corresponds to the *lean* body mass. *Lean* body mass is composed of muscle, vital organs, bone, connective and other non-fatty tissues in the body, and most of the body water. The body's metabolic rate is in direct proportion to the amount of *lean* body mass. Therefore, considering the *lean* body mass is important for any weight loss strategy.

The aforementioned weight control means do not take into account the importance of maintaining or increasing the *lean* body mass in the process of weight loss. In fact, regimens to decrease body fat often contribute to the catabolic wasting of *lean* body mass. Increased *lean* body mass regulates body metabolism and helps in losing weight, as well as maintaining the accomplished weight reduction. On the other hand, diminished *lean* body mass slows down body metabolism and results in difficulties in maintaining an appropriate, healthy body weight. Thus, an ideal weight management approach should be to reduce body weight to acceptable levels by restoring the optimal proportions of fat to *lean* body mass. By maintaining or increasing the *lean* body mass while simultaneously reducing body fat, the weight loss regimen would serve the general purpose of improving the overall health of the individual.

Maintaining or increasing the *lean* body mass (for example, skeletal muscles) is one of the important considerations for any weight loss strategy because *lean* body mass determines the rate of metabolism and the body's thermogenic response to food, and food induced thermogenesis and the metabolic rate, in turn, control body weight by an increase in the catabolism of body fat. This is so because thermogenesis is preferentially fueled by fatty acids derived from stores of body fat and from food. In addition, a high rate of thermogenesis contributes to more food being absorbed and to the preferential build-up of *lean* body mass, rather than adipose tissue.

One of the critical components of lean body mass maintenance and prevention of body composition decline is having a sufficient supply of endogenous testosterone, estrogen and human growth hormone. Testosterone and estrogens are the end products of a number of hormonal reactions in somatotroph axis. For example, the somatotroph axis for testosterone starts with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) which is secreted by the hypothalamus and controls the pulsatile secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) by the anterior pituitary. Luteinizing hormone regulates the production and secretion of testosterone by the Leydig cells of the testes, and FSH stimulates spermatogenesis.

Aging is associated with decline in the somatotroph axis, decline in production of estrogen and testosterone, increase of detrimental forms of hormones e.g. dihydrotestosterone (DHT) – events that have been considered to cause many of the catabolic sequelae of normal aging. For example, loss of bone mass (osteoporosis) with age is an example of loss of lean body mass and results in deterioration in body composition in geriatric individuals. Decreases in GH (growth hormone(s), exemplified but not limited to IGF-I, HGH) secretion may partially explain the age-related changes in metabolism, bones, muscles, cardiovascular system, central nervous system, the immune system and sense of well-being. Owing to clinical similarities between aging and growth hormone(s) deficiency, the relative GH insufficiency of elderly subjects has been postulated as one important factor contributing to their frailty.

Another example of detrimental changes in body composition is in low functions of gonads. Males with hypogonadism and low levels of serum testosterone have negative alterations in body composition, such as decreased muscle mass, increased percentage of body fat, and alterations in body fat distribution. Independently of hypogonadism decreased lean body mass, increased body fat and total body weight contribute to hormonal imbalance and lower levels of serum testosterone. In addition serum levels of testosterone and estrogen correlate negatively with the levels of serum cortisol, especially in overweight and obese individuals.

The invention comprises diterpene froskolin obtained from roots of *Coleus Forskohlii*, Briq.

(Syn. *C. barbatus* Benth., *Plectranthus barbatus*, Andr. also *P. forskohlii* and Willd., *P. comosus* Willemse.), a member of the mint family (Fam. Lamiaceae) and its natural derivatives isoforskolin and 7-deacetylorskolin. Forskolin has been reported to possess antihypertensive activity, positive inotropic effects, and to inhibit platelet aggregation (de Souza *et al.*, 1983; Ammon and Müller, 1985). The mechanism of action of forskolin is thought to be related to its stimulatory action on adenylate cyclase, increasing the intracellular level of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), which mediates a number of biological responses (de Souza *et al.*, 1983; Ammon and Müller, 1985; Dohadwalla, 1985; Seamon, 1985). Numerous pharmacological studies on the various effects of forskolin have been conducted in laboratory animals and humans following topical, intravenous (i.v.), intraarterial, intraperitoneal (i.p.), intratracheal (i.t.), and inhalation treatment. Physiological effects of cAMP, which also have been demonstrated by forskolin, include inhibition of platelet aggregation, increased adipocyte lipolysis *in vitro*, positive inotropic effects on heart muscle, potentiation of insulin secretion by the pancreas, increased secretion of thyroid hormones, increased steroidogenesis by the adrenal glands, increased adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release by the pituitary gland, and decreased intraocular pressure in topical application (Dubey *et al.*, 1981; Caprioli and Sears, 1983; Malaisse and Malaisse-Lagae, 1984; Ammon and Müller, 1985; Dohadwalla, 1985; Potter *et al.*, 1985). The secretion ability of aged rat Leydig cells was found lower than that of young rat Leydig cells with or without forskolin stimulation (Deng *et al.*, 2005). Forskolin also has been reported to induce bronchodilation in guinea pigs (i.v. doses of 1 mL/kg body weight for 10 minutes and i.t. administration of 30 µg) and in asthmatic patients (inhalation of 1 to 10 mg forskolin, as dry powder), with no significant side effects (Lichey *et al.*, 1984; Kreutner *et al.*, 1985; Bauer *et al.*, 1993). Both isoforskolin and forskolin have suppressing effects on ocular hypertension in rabbits (Li *et al.*, 2000). The 1-acetyl- 7-deacetylorskolin activated adenylyl cyclase in cultured human endothelial cells, whereas 1-acetyl-7-deacetylorskolin did not (Sasaki *et al.*, 1995). The 7-deacetylorskolin was prepared to provide water-soluble derivatives of the potent cardioactive diterpenoid forskolin (Khandelwal *et al.*, 1988). Forskolin but not isoforskolin or 7-deacetylorskolin has been also shown to increase lean body mass in overweight and obese human subjects (Majeed, Badmaev, Rajendran US patent 1998).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention demonstrates for the first time that administration of forskolin orally to overweight and obese young males increases levels of serum testosterone.

The present invention relates to a composition for physiologically increase serum levels of testosterone, estrogen or HGH, which comprises forskolin, isoforskolin or 7-deacetyl forskolin. The present invention also relates to a method comprising of administering a human being forskolin, isoforskolin or 7-deacetyl forskolin extracted from Coleus forskohlii or related species to physiologically increase serum levels of testosterone, estrogen, HGH.

The present invention further relates to a safe, physiological, method of increasing serum testosterone, estrogen and HGH in prevention of anticipated body composition deterioration as in the process of aging, among those with hormonal deficiencies or among those with high risk of being overweight and obese. A method to improve mental and physical stamina is disclosed. Compositions suitable for the invention are also disclosed, comprising about 1 to about <95% forskolin and or its derivatives in combination with at least one physiologically acceptable carrier or excipient.

A method of preparing a forskolin and its derivatives from Coleus forskolii plant is further disclosed, as well as a forskolin and its derivatives compositions prepared by the method.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE PRESENT INVENTION

It is preferable that forskolin, isoforskolin or 7-deacetyl forskolin be used those extracted from Coleus forskohlii or related species

It is preferable that the composition is in a form to be administered in a daily dose of about 10 to about 100 mg. Furthermore, it is preferable that the composition contains about 1 to about 100% forskohlin. Preferred amounts are about 5 to about 20% forskohlin, more preferred about 8 to about 15%, most preferably about 10%.

The composition of the present invention can be used in prevention of body composition deterioration in subjects in need thereof, and in improvement of mental and physical stamina.

Yet another subject matter of the invention is a method of preparing a forskolin composition from a forskolin extract of *Coleus forskohlii* plant, comprising:

- (a) providing forskolin, isoforskolin and 7-diacetoforskolin extract of *Coleus forskohlii* plant in supercritical extraction process;
- (b) providing isoforskolin and 7-diacetoforskolin extracted from *Coleus forskohlii* plant with water and organic solvents;
- (c) preparing a forskolin composition by combining the amount of forskolin obtained in steps (a) and/or (b) with at least one physiologically acceptable carrier or excipient to produce a forskolin composition having a predetermined forskolin content.

The present invention also includes compositions prepared from the above method, as well as methods using the compositions thus prepared.

The present invention further discloses a commercial process for making isoforskolin consisting of: pulverizing dried *Coleus* roots; extraction with a solvent selected from a mixture of water and alcohol, C1-C4 alcohols, methylene dichloride, toluene, or hexane; Concentration of the extract and precipitation with a non-polar solvent selected from heptane, pentane, hexane; filtration; back extraction with a mixture of water and alcohol; and crystallization in alcohol.

The present invention further discloses a commercial process for making isoforskolin consisting of: pulverizing dried Coleus roots; extraction of the root powder with supercritical carbon dioxide and cosolvent ethanol at a temperature of 45° to 55° C and pressure 300 bar; and crystallization in ethanol.

The present invention further discloses a commercial process for making 7-deacetylforskolin consisting of pulverizing dried Coleus roots; extraction of the root powder with supercritical carbon dioxide and cosolvent ethanol at a temperature of 45° to 55° C and pressure 300 bar; hydrolysis with lipase enzyme; and Crystallization in ethanol.

The present invention further discloses a commercial process for super or subcritical extraction of dried Coleus roots to remove essential oil.

The present invention further discloses a commercial process with supercritical carbon dioxide with varying amounts of ethanol present in the supercritical gas. The pressure ranged from 110 bar to 400 bar below the critical temp. Ethanol was used as the solvent modifier. A wide range of composition was used wherein ethanol quantity was altered from 0.01 mol% to 10 mol%.

EXAMPLE 1. Hormonal Adaptations associated with forskolin consumption in men.

The randomized, double-blind clinical study of the invention examined oral ingestion of 250 mg of 10% forskolin bid (standardized extract of Coleus forskohlii roots) for 12 weeks in 30 overweight and obese young men (forskolin, n=15; placebo, n=15). The effect of forskolin on body composition, testosterone, metabolic rate, and blood pressure

in overweight and obese (BMI > or = 26 kg/m²) men. Forskolin was shown to elicit favorable changes in body composition by significantly decreasing body fat percentage (BF%) and fat mass (FM) as determined by DXA compared with the placebo group (p < or = 0.05). Additionally, forskolin administration resulted in a significant increase in bone mass for the 12-week trial compared with the placebo group (p < or = 0.05). There was a trend toward a significant increase for lean body mass in the forskolin group compared with the placebo group (p = 0.097). Serum free testosterone levels were significantly increased in the forskolin group compared with the placebo group (p < or = 0.05). Table 1 and Table 2.

Body composition and Forskolin Consumption, Godard, Johnson, and Richmond

Table 1. Body composition values including body weight, LBM, and fat mass at each time-point					
	Pre	Mid	Post	Change (pre-post)	Percent change (pre-post)
Forskolin					
Body weight (kg)	103.98 ± 14.89	104.23 ± 15.04	103.91 ± 15.06	-0.07 ± 2.39	-0.08 ± 2.44
LBM (kg)	63.61 ± 5.94		67.32 ± 8.29†	3.71 ± 4.07	5.65 ± 6.32
Fat mass (kg)	37.43 ± 12.65		32.91 ± 11.29†	-4.52 ± 5.74*	-11.23 ± 13.20*
Bone mass (kg)	3.41 ± 0.43		3.68 ± 0.43†	0.27 ± 0.31*	8.63 ± 10.46
Placebo					
Bodyweight (kg)	100.95 ± 9.30	102.09 ± 9.75	102.15 ± 9.65	1.20 ± 2.33	1.20 ± 2.35
LBM (kg)	61.82 ± 6.44		63.39 ± 7.07†	1.57 ± 2.56	2.56 ± 4.39
Fat mass (kg)	35.65 ± 9.99		35.14 ± 10.56	-0.51 ± 1.91	-1.73 ± 5.64
Bone mass (kg)	3.41 ± 0.55		3.60 ± 0.51	0.20 ± 0.53	7.46 ± 18.78

The actual change from pre- to post-measurement and the percent change are also included.

All values are presented as means- SD.

* Significant difference between groups and † significant difference within groups across time (p≤0.05).

Body composition and Forskolin Consumption, Godard, Johnson, and Richmond

Table 2. Total testosterone and free testosterone values at each time-point

	Pre	Mid	Post	Change (pre-post)	Percent change (pre-post)
Forskolin					
Total testosterone (ng/mL)	5.06 ± 1.21*	5.27 ± 1.03*	5.75 ± 1.50*	0.69 ± 1.26	16.77 ± 33.77
Free testosterone (pg/mL)	15.90 ± 13.39	15.67 ± 13.68	16.36 ± 13.32	0.46 ± 0.86*	3.47 ± 8.10
Placebo					
Total testosterone (ng/mL)	4.12 ± 0.82	3.97 ± 0.85	4.00 ± 0.89	-0.11 ± 0.95	-1.08 ± 18.35
Free testosterone (pg/mL)	13.28 ± 7.26	12.28 ± 7.44	12.77 ± 7.30	-0.51 ± 1.04	-4.11 ± 11.48

The actual change from pre- to post-measurement and the percent change are also included.

All values are presented as means - SD.

* Significance between groups ($p \leq 0.05$).

REFERENTIAL EXAMPLE 1. Clinical effects of oral administration of forskolin in overweight women.

In a double blind and randomized manner, 23 females supplemented their diet with forskolin (250 mg of 10% Coleus forskohlii extract, n=7) or a placebo (n=12) two times per day for 12-wks. Body composition (DEXA), body weight, and psychometric instruments were obtained at 0, 4, 8 & 12 weeks of supplementation. No significant differences were observed in caloric or macronutrient intake. Forskolin tended to mitigate gains in body mass (-0.7±1.8, 1.0±2.5 kg, $p=0.10$) and scanned mass (-0.2±1.3, 1.7±2.9 kg, $p=0.08$). Subjects in the forskolin group tended to report less fatigue ($p=0.07$), hunger ($p=0.02$), and fullness ($p=0.04$). Results suggest that forskolin may help mitigate weight gain in overweight females with apparently no clinically significant side effects.

REFERENTIAL EXAMPLE 2. Comparative effect of Isoforskolin , 7-deacetylforskolin and Forskolin extract, and the composition on animal model of obesity. The study was done on Swiss Albino mice (Haffkine's Institute ,Mumbai, India), aged between 25-30 weeks, on a total of 84 animals divided into 12 animals groups. The mice under treatment were fed with diet rich in carbohydrates and fats. The diet produced reliable weight gain over controls. Drug treatment was started only when the difference between the body weights of control and the treated mice exceeded 10g. The mice in respective groups, were given a daily fixed dose of Isoforskolin Extract, 10% 7-deacetylforskolin extract and Forskolin extract (1mg/ml) for a period of six weeks, by means of gastric intubation, twice a day . At the end of sixth week, six mice per group were put to sleep after taking body weight and flab measurements. The blood was drawn by cardiac puncture and immediately centrifuged to separate the plasma and analyzed for Cholesterol, tryglycerides , glucose, Thyroxine T3, T4 and TSH levels.

Abdominal fat and thyroid were fixed for histopathology. A separate sample of adipose tissue were collected and analyzed for total lipid content. The remaining mice from each group were continued on the same diet as given during the first six weeks of treatment. This group was maintained in this manner for additional six weeks at the end of which non-invasive parameters such as body weight and flab were once again assessed.

Results: Both control and treatment mice tolerated the procedure of gastric intubation through out the six week treatment period. The extracts 10% isoforskolin, 10% 7-diacetoforskolin and 10% forskolin were well tolerated by the population of mice. At the end of six weeks , six animals from each group, randomly selected, put to sleep and dissected to (a) excise adipose tissue and thyroid for histopathology (b) examine general anatomy and noting the changes, if any, in organs such as gut, heart, lungs, liver, pancreas, kidney, kidneys, reproductive organs etc. It was observed that none of the animals exhibited any abnormal anatomical features.

The abdominal fat shows interesting features in different groups: for example the control group mice under placebo or drug treatment showed good amount of abdominal fat distribution in bilateral lobes of adipose tissue. The animals from obese placebo group had significantly large quantity of abdominal fat with bilateral adipose tissue lobes

extending into more than one third of the abdominal cavity. On the other hand, obese group animals treated with 10% isoforskolin, 10% 7-diacetylorskolin and 10% forskolin had practically exhausted the abdominal fat which was more pronounced in 10% forskolin and 10% isoforskolin group. In these groups of animals, there were significant loss of peritoneal fat as well as the fatty deposition in close association with uteri. Adipose tissue close to the kidney and ovary appeared to be adequate, though less in comparison with obese group under placebo treatment.

Table 3. Effect of treatment on the weekly record of body weights of experimental mice

Treatment	Average body weight (n=12) (in g)							
	0 Week	1 Week	2 Week	3 Week	4 Week	5 Week	6 Week	% Change between 0-6 weeks
Control-Placebo	25.23 ±2.80	26.26 ± 4.0	26.41 ±3.28	26.18 ±2.31	26.90 ± 3.08	27.4 ±3.09	28.33 ± 2.64	+12
Obese Placebo	36.69 ± 2.71	37.72 ±2.28	37.36 ±2.29	37.18 ± 2.27	35.64 ±2.69	35.5 ± 2.68	35.6 ± 3.10	-0.003
Obese-Extract 1	37.18 ±3.48	36.81 ±3.25	34.93 ±3.80	33.00 ± 4.54	31.86 ± 4.09	31.69 ± 4.66	29.61 ± 5.77**	-20.37
Obese-Extract 2	36.11 ±3.21	36.32 ±3.55	35.08 ±3.88	34.36 ± 4.01	32.15 ± 3.91	31.87 ± 4.81	30.78 ±5.96**	-14.76
Obese-Extract 3	37.33 ±4.02	36.73 ±3.67	34.88 ±4.31	34.58 ±3.76	32.67 ± 3.87	32.21 ± 3.34	31.54 ± 4.76**	-15.51

** Significant reduction in weight by One Way Analysis of Variance (ANOVA)

Extract 1 : Contains 10% Forskolin

Extract 2 : Contains 10% 7-diacetylorskolin

Extract 3 : Contains 10% Isoforskolin

As seen in the above table, there is significant reduction in the total body weight in all the treatment group, the percentage change being maximum in Forskolin group.

Table 4. Effect of treatment on the weekly record of Abdominal flap of experimental mice

Treatment	Average Abdominal Flap (n=12) (in mm)							
	0 Week	1 Week	2 Week	3 Week	4 Week	5 Week	6 Week	% Change between 0-6 weeks
Control-Placebo	0.81 ±0.12	0.91 ± 0.09	0.92 ±0.10	0.93 ±0.09	0.94 ± 0.11	0.97 ± 0.12	0.99 ± 0.11	+22.22
Obese Placebo	1.24 ± 0.12	1.39 ±0.08	1.32 ±0.09	1.33 ± 0.07	1.26 ± 0.11	1.11 ± 0.09	1.11 ± 0.12	-13.00
Obese-Extract 1	1.42 ±0.15	1.27 ±0.12	1.20 ±0.14	1.11 ± 0.11	0.99 ± 0.11	0.91 ± 0.07	0.82 ± 0.11**	-42.22
Obese-Extract 2	1.38 ±0.14	1.26 ±0.17	1.22 ±0.15	1.16 ± 0.12	1.08 ± 0.13	0.98 ± 0.11	0.88 ± 0.09**	-34.81

Obese-Extract 3	1.35 ±0.16	1.30 ±0.14	1.28 ±0.14	1.17 ±0.13	1.10 ±0.12	0.94 ±0.11	0.85 ±0.10**	-38.41
-----------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	-----------------	--------

** Indicates statistical significance in a One Way Analysis of Variance (AVOVA)

Extract 1 : Contains 10% Forskolin

Extract 2 : Contains 10% 7-diacetoforskolin

Extract 3 : Contains 10% Isoforskolin

As seen in the above table, there is significant reduction in the abdominal fat in all the treatment group, the percentage change being maximum in Forskolin group.

Table 5. Effect of treatment in adipose tissue and fat content of experimental mice after six week treatment.

Groups	Average weight of Adipose Tissue	Average Volume (ml)	Average Weight of Fat (g)	Specific Density of Adipose Tissue	Specific Density of Fat
Control-Placebo	0.18± 0.09	0.3± 0.14	0.12± 0.05	0.61	0.4
Obese Placebo	0.29± 0.10	0.4± 0.14	0.21± 0.07	0.73	0.52
Obese-Extract 1	0.18± 0.13	0.4± 0.2	0.12± 0.09	0.45	0.30
Obese-Extract 2	0.21± 0.14	0.4± 0.16	0.16± 0.06	0.54	0.40
Obese-Extract 3	0.20± 0.15	0.38±0.18	0.13± 0.08	0.50	0.36

Extract 1 : Contains 10% Forskolin

Extract 2 : Contains 10% 7-diacetoforskolin

Extract 3 : Contains 10% Isoforskolin

REFERENTIAL EXAMPLE 3. In Vitro, preclinical and clinical toxicology study of forskolin of the invention (standardized 10% extract of Coleus forskohlii roots) .

Acute Toxicity Studies

In an acute toxicity study, male and female Wistar rats were given a single oral dose of 2,000 mg forskolin/kg body weight (Graver, 2000). No deaths occurred; however, diarrhea, soiling of the anogenital area, and wetness of the mouth and anogenital area were reported. No histopathological lesions were observed following necropsy. The LD₅₀ was reported to be >2,000

mg/kg body weight. Earlier studies by de Sousa et al (1983) showed the acute LD₅₀ of forskolin to be 3,100 and 2,550 mg/kg by oral administration and 105 and 92 mg/kg body weight when administered intraperitoneally, in mice and rats, respectively.

Subchronic Toxicity Study in Rats

Groups of 5 Sprague-Dawley rats/sex were administered doses of *C. forskohlii* 10% extract of 0, 100, 300, or 1,000 mg/kg body weight/day by gavage for a period of 28 days (Bhide, 2004). Two additional groups of rats (5/sex/group) were administered the extract at doses of 0 or 1,000 mg/kg body weight/day for 28 days, and were observed for a 14-day recovery period thereafter to assess the reversibility of any possible effects. Daily observations of clinical signs and mortality, and weekly measurements of body weight and food consumption were conducted. Ophthalmic examinations were conducted at the beginning and end of the dosing period and at the end of the recovery period. Hematological, biochemical, and urinary parameters were assessed at the end of the dosing and recovery periods. All animals were subjected to necropsy, and histopathological examinations of the organs were conducted. No toxicological effects were observed in any of the measured parameters at any dose. The no-observed-effect level (NOEL) of *C. forskohlii* 10% extract was considered to be 1,000 mg/kg body weight/day, the highest dose tested. This NOEL represents an appropriate high multiple (120-fold) of the intended human dose (approximately 8.3 mg/kg body weight/day).

Mutagenicity Study

The invention was reported not to be mutagenic in the bacterial reverse mutation assay with an independent repeat assay using *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and *Escherichia coli* strain WP2 *uvrA*, both in the presence and absence of metabolic activation, at doses of up to 5,000 µg/plate (Wagner and Klug, 2001).

Clinical Studies

A number of clinical studies investigating the efficacy of the invention for weight loss have been conducted and are summarized in Table 1. It is important to note, although efficacy was the primary purpose of these trials, that parameters related to safety were also monitored. No clinically significant interactions were seen in metabolic markers, blood lipids, muscle and liver enzymes, electrolytes, red cells, white cells, hormones (insulin, TSH, T3, and T4), heart rate, blood pressure, or weekly reports of side effects.

Table 6 Summary of Clinical Studies of *Coleus forskohlii* Extracts

Number of Subjects	Dose of <i>C. forskohlii</i> Extract (mg/day) [dose of forskolin (mg/day)]	Study Design	Study Length	Measured Outcome(s)	Reference
Clinical Studies of ForsLean®					
14 overweight subjects (1 male, 13 female)	250 [25]	Open-field study	12 wk	No significant effects on systolic and diastolic blood pressure or pulse rate. No significant adverse effects.	Tsuguyoshi et al., 2001
6 overweight women	500 [50]	Open-field study	8 wk	No significant effects on systolic and diastolic blood pressure or pulse rate.	Badmaev et al., 2002
16 overweight men (8/group)	500 [50]	Randomized, double-blind, placebo-controlled study	8 wk	No significant effects on body weight, heart rate, mean arterial pressure, or systolic and diastolic blood pressure.	Agena, unpublished
19 women [n=12 (controls); n=7 (test)]	500 [50]	Randomized, double-blind, placebo-controlled study	12 wk	No significant differences between groups in metabolic markers, blood lipids, muscle and liver enzymes, electrolytes, red blood cells, white blood cells, hormones (insulin, TSH ^a , T ₃ ^b , T ₄ ^c), heart rate, blood pressure, or reported side effects.	Kreider et al., 2004
60 obese men and women (30/group)	500 [50]	Randomized, double-blind, placebo-controlled study	12 wk	No significant effects on blood pressure, liver, kidney, and thyroid function or blood lipid profile, with the exception of increased HDL ^d cholesterol and decreased ratio of total:HDL cholesterol.	Bhagwat et al., 2004
30 overweight or obese men (15/group)	500 [50]	Randomized, double-blind, placebo-controlled study	12 wk	Significant decreases in body fat percentage and fat mass and significant increases in serum free testosterone in the forskolin group compared to controls. No significant effects on body weight or systolic and diastolic blood pressure. The incidence of adverse effects was not reported.	Godard et al., 2005

Table 6 Summary of Clinical Studies of *Coleus forskohlii* Extracts

Number of Subjects	Dose of <i>C. forskohlii</i> Extract (mg/day) [dose of forskolin (mg/day)]	Study Design	Study Length	Measured Outcome(s)	Reference
50 overweight or obese men and women (25/group)	500 [50]	Randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center study	12 wk	Significant increase in percentage of lean body mass, decrease in body weight, body mass index, and percentage body fat content in ForsLean® group compared to controls. No significant effects on renal function tests (urea and creatinine), liver function tests (bilirubin, SGOT ^a , SGPT ^b), or thyroid function tests (TSH, T ₃ , T ₄). No significant changes in serum total cholesterol, HDL or LDL ^c cholesterol, or triglyceride levels. No significant adverse effects.	Kamath <i>et al.</i> , unpublished

^a Thyroid-stimulating hormone^b Triiodothyronine^c Thyroxine^d High-density lipoprotein^e Serum glutamic-oxaloacetic transaminase^f Serum glutamic-pyruvic transaminase^g Low-density lipoprotein

Preparation Example 1: Commercial process for making isoforskolin:

The present invention also includes a method of preparing a is forskolin composition from a forskolin extract of Coleus forskohlii plant. The method involves extracting the pulverized roots of the plant with a solvent selected from water, C1-C4 alcohols, chlorinated solvents like MDC, toluene or hexane or solvent is a mixture of water and alcohol of which the preferred extracting medium is toluene. The concentrated toluene extract is precipitated with more non-polar solvents of the type heptane, pentane, hexane; filtered, and the filtrate is back extracted with mixtures of aqueous alcohols in ratios of 10:90 to 90:10 to obtain the desired molecule isoforskolin which is further crystallized with alcohols to obtain the desired purity.

Preparation Example 2: Commercial process for making 7-deacetylforskolin:

Total extract from the above example is dissolved in a solvent medium which includes but is not limited to alcohols, toluene or hexane and treated with immobilized enzyme lipase in concentrations of 0.1-10%, preferably 1-5%, at 37°C under stirring for 12hrs. Once the reaction is complete, the material is back extracted with mixtures of aqueous alcohols in ratios of 10:90 to 90:10 to obtain the desired molecule 7- deacetylforskolin which is further crystallized with alcohols to obtain the desired purity.

Preparation Example 3Preparation: Commercial process for making Isoforskolin and 7-deacetylforskolin by Carbon dioxide extraction: Supercritical fluid extraction using carbon dioxide with and without entrainer such as ethanol, acetone or ethyl acetate extract Isoforskolin and 7-deacetylforskolin from the roots of Coleus plant are described. The extracts were obtained at temperatures ranging from 25° to 120°C, preferably between 45°- 55°C, the extraction fluid pressure was maintained between 100 to 300 bar preferably at 300 bars with or without co-solvents, preferably 5% to 80% ethanol, preferably 30-100% ethanol, for 1-5 hrs, preferably for 3 hrs and at carbon dioxide flow rate of 1-4 kg/h, preferably at 2 kg/hr. The extract obtained is hydrolyzed with lipase

enzyme in a liquid media and crystallized out from ethanol to obtain 7-deacetyl forskolin of desired purity.

Preparation Example 4 Commercial process for making forskolin, isoforskolin, 7-deacetyl forskolin, 1-deoxyforskolin, 9-deoxyforskolin and 1,9-dideoxyforskolin by carbon dioxide extraction:

The roots and stem of *Coleus Forskollii* are rich sources of Forskolin, Isoforskolin and 7-Deacetyl forskolin. In addition minor constituents such as 1-deoxyforskolin, 9-deoxyforskolin and 1,9-dideoxyforskolin are also present along with oil.

The supercritical method is based on differential extraction of these constituents dependant on polarity. The polarity of carbon dioxide can be altered by changing several important parameters in the extraction process. Carbon dioxide has a critical pressure of 73.8 bar and a critical temperature of 31.06° C. This allows wide variations possible in the selection of experimental parameters. First parameter is pressure. Variation in the pressure of the extracting gas changes the properties of the extracting solvent. The second one is temperature range. The third important variable in altering the polarity of the supercritical carbon dioxide is addition of cosolvents. Several cosolvents are possible and were employed in the present work. Solvent modifiers constituted about 0.01% to 10.0 mol% and included solvents such as MeOH, EtOH, PrOH, iso-PrOH, BuOH, benzyl alcohol, acetone, acetophenone, N-methyl-2-pyrrolidone, Methyl ethyl ketone, DMSO, DMF, Ethylene glycol, and Acetonitrile. The use of ethanol is particularly adopted and preferred in the present work. Also flow rate of the gas as well as the particle size of the plant material affect the extraction efficiency. Cosolvent has the maximum effect on the extraction ability of supercritical carbon dioxide.

The roots or stem parts of the plant were cleaned well with water and were then dried well devoid of moisture either by drying in the sun or in an enclosed oven.

In the actual method the dry parts of the plant are initially extracted with super or subcritical carbondioxide to remove the oil present in it. The resultant plant part appeared

very powdery. This is again extracted with supercritical carbon dioxide with varying amounts of ethanol present in the supercritical gas. The pressure ranged from 110 bar to 400 bar below the critical temp. Ethanol was used as the solvent modifier. A wide range of composition was used wherein ethanol quantity was altered from 0.01 mol% to 10 mol%.

The forskolin, isoforskolin, 7-deacetyl forskolin, 1-deoxyforskolin, 9-deoxyforskolin and 1,9-dideoxyforskolin compositions prepared by the above method are stable. The stability of the compositions has been determined by subjecting the compositions to normal ambient storage conditions, as well as to accelerated storage conditions. During this study, the quality has been tested for stability indicating parameters. As per the study, the extract is stable for a period of not less than 5 years, when it is stored under normal ambient storage conditions.

The present invention includes products (i.e., compositions) produced by this method. The products can usually contain about 1 to about 40% forskolin, although up to 100% pure forskolin is possible. Preferred amounts are about 5 to about 20% forskolin, more preferred about 8 to about 15%, most preferably about 10%.

Reasonable modifications of the inventions disclosed herein are well within the scope of those skilled in the art, and are also intended to be within the scope of the present invention. The scope of the present invention is not intended to be limited by the specific examples set out herein, but rather is to be interpreted according to the following claims.

CLAIMS

- 1.** A composition for physiologically increase serum levels of testosterone, estrogen or HGH, which comprises forskolin, isoforskolin or 7-deacetyl forskolin.
- 2.** The composition of claim 1, which is used to physiologically increase target tissue levels of testosterone, estrogen or HGH.
- 3.** The composition of claim 1 or 2, which comprises 1-deoxyforskolin, 9-deoxyforskolin and 1,9-dideoxyforskolin.
- 4.** A commercial process for making isoforskolin consisting of: pulverizing dried Coleus roots; extraction with a solvent selected from a mixture of water and alcohol, C1-C4 alcohols, methylene dichloride, toluene, or hexane; Concentration of the extract and precipitation with a non-polar solvent selected from heptane, pentane, hexane; filtration; back extraction with a mixture of water and alcohol; and crystallization in alcohol.
- 5.** A commercial process for making isoforskolin consisting of: pulverizing dried Coleus roots; extraction of the root powder with supercritical carbon dioxide and cosolvent ethanol at a temperature of 45° to 55° C and pressure 300 bar; and crystallization in ethanol.
- 6.** A commercial process for making 7-deacetyl forskolin consisting of pulverizing dried Coleus roots; extraction of the root powder with supercritical carbon dioxide and cosolvent ethanol at a temperature of 45° to 55° C and pressure 300 bar; hydrolysis with lipase enzyme; and Crystallization in ethanol.
- 7.** A commercial process for super or subcritical extraction of dried Coleus roots to remove essential oil.
- 8.** A commercial process with supercritical carbon dioxide with varying amounts of ethanol present in the supercritical gas under the pressure ranged from 110 bar to 400 bar below the critical temp.

9. The composition of anyone of claims 1 to 3 wherein the composition is in the form to be administered in a daily dose of about 10 to about 100 mg.

10. The composition of any one of claims 1 to 3 which contains about 1 to about 100% forskohlin.

Abstract

A composition for physiological increase of male and female hormones, e.g. testosterone, estrogen and HGH in an individual is disclosed, comprising an effective amount of forskolin and or its derivatives. Compositions suitable for the invention are also disclosed, comprising about 1 to up to 100% forskolin and or its derivatives in combination with at least one physiologically acceptable carrier or excipient. A method of preparing a forskolin and its derivatives from Coleus forskolii plant is further disclosed, as well as a forskolin and its derivatives compositions prepared by the method.