

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 85 973

REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal da Alemanha.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE DITERPENOS DO TIPO LABDANO, ESPECIALMENTE DE FORSCOLINA, A PARTIR DE COLEUS FORSKOHLII".

INVENTORES: Prof.Dr. Ernst Reinhard, Rainer Mersinger e Andrea Mandler.

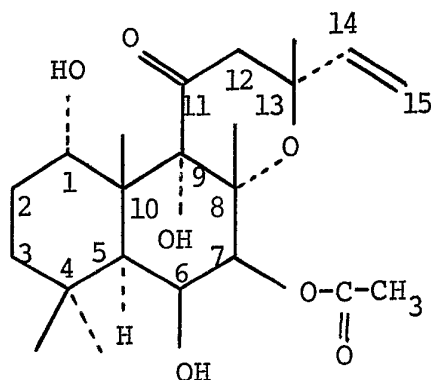
Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. República Federal da Alemanha, em 25 de de Outubro de 1986, sob o nº P 36 36 397.9.

Memória descritiva referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemã, (inventores: Prof. Dr. Ernst Reinhard, Rainer Mersinger e Andrea Mandler, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE DITERPENOS DO TIPO LABDANO, ESPECIALMENTE DE FORSCOLINA, A PARTIR DE COLEUS FORSKOHLII".

MEMÓRIA DESCRITIVA

A planta de Coleus Forskohlii Briq. da família das Lamiaceae, que tem o seu habitat natural na Índia, contém vários diterpenos do tipo labdano. Destes os que se apresentam em maior quantidade são a 1,9-didesoxi-forscolina (DDF) e a forscolina (BHAT et al, Tetrahedron Letters 19 (1977) 1669-1672). O teor em forscolina referido ao peso de matéria seca é para toda a planta de cerca de 0,05% e para as raízes cerca de 0,1% (SHAH et al, Planta Medica 39 (1980), 183-185).

A forscolina (= 7 β -acetoxi-8,13-epoxi-1- α ,6 β ,9 α -trihidroxilabda-14-eno-11-ona) tem a seguinte fórmula estrutural:



Decisivo para o interesse da planta *Coleus Forskolii* são os excelentes efeitos farmacológicos da forskolina. Esta actua positivamente, inotropicamente, aumentando a frequência cardíaca e baixando a pressão cardíaca (LINDNER et al, *Arzneim. Forsch./Drug Research* 28 (I) Volume 2 (1978) 284-289). Esta e numerosas outras acções são avaliadas por uma activação da adenilatciclase das membranas que conduz a um aumento da concentração do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) intracelular (METZGER H., LINDNER E., *Arzneim. Forsch./Drug Research* 31 (II) Volume 8 (1981) 1248-1250; SEAMON K.B., DALY J.W., *J.Cycl. Nucl. Res.* 7 (4) (1981) 201-224; DE SOUZA N. et al., *Med. Res. Rev.* 3 (1983) 201-219). Deste modo a forskolina tem uma importância dupla: por um lado como medicamento, por outro como um excelente meio auxiliar para investigação de acções hormonais que são desencadeadas através do cAMP, como "second messenger".

Até agora a forskolina é obtida principalmente a partir de exemplares silvestres, em parte também de plantas cultivadas, de *Coleus forskhlii* por extracção das raízes secas.

O processo de acordo com a presente invenção descrito adiante representa agora uma nova possibilidade de obtenção de diversos diterpenos, mas particularmente da forskolina.

Para isso mantêm-se culturas celulares de *Coleus forskohlii* como culturas em suspensão. No chamado "meio de obtenção" não há a formação de derivados de forskolina, ou apenas uma formação insignificante. Para estimular a produção os agregados de células são transferidas para um "meio de indu-

ção" que se distingue do meio de obtenção sobretudo no que se refere à fracção de fitohormonas. Num período de tempo de 2 a 6 semanas a formação de diterpenos alcança o seu máximo e obtêm-se concentrações de 0,005-0,06% de forscolina, referidas ao material celular seco.

A vantagem deste novo método de produção é a independência da preparação da substância relativamente à época do ano e a factores climáticos; não está, além disso, associada à localização na Índia e reduzem-se consequentemente também riscos económicos e políticos.

O processo de acordo com a invenção será descrito a seguir pormenorizadamente. Preparam-se primeiro, por métodos conhecidos, culturas de plantas de *Coleus forskohlii*. Depois de algumas passagens (=períodos de cultura) sobre meios nutrientes solidificados com agar, os agregados celulares podem ser transferidos para meios líquidos e serem ali mantidos como culturas em suspensão.

As condições de cultura apropriadas para a cultura de obtenção são:

- Armazenagem em recipientes de vidro, por exemplo balões de Erlenmeyer
- Arejamento por agitação numa máquina de agitação circular com 80-150 rpm (rotações por minuto)
- Temperatura 18-38°C
- Luz permanente, escuro permanente, ou ciclos luz-escuro.

Como meios de obtenção podem ser utilizados meios correntes de cultura de células vegetais, por exemplo o meio Gamborgs B5 (GAMBORG, D.L., Plant Physiol. 45, 372 (1970)) ou o meio MS (MURASHIGE, T.I SKOOG, F., Plant Physiol. 28, 473-497 (1962)) com adição de fitohormonas, por exemplo auxinas, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol-3-butírico (IBA) ou o ácido naftilacético (NAA) numa concentração apropriada, por exemplo de 0,2 a 5mg/litro, de preferência de 0,5 a 2mg/litro, e/ou citoquininas, como quinetina ou 6-benzilaminopurina (BAP) numa concentração apropriada, por exemplo de 0,05mg a 2mg/litro, de preferência de 0,1 a 0,5mg/litro.

O passo decisivo para a estimulação

da produção de forscolina consiste na colocação das células num "meio de trabalho ou indução". Este meio distingue-se do meio de obtenção por, ou

- a) Não conter qualquer fitohormona, ou
 - b) Em vez de conter auxinas com acção fortemente indiferenciada, como por exemplo 2,4-D, conter uma ou mais de outras auxinas como por exemplo IBA ou NAA, ou
 - c) Não conter qualquer auxina, mas apenas fitoquinina, ou
 - d) Conter auxinas,
- e/ou citoquinina em concentrações mais baixas do que no meio de obtenção.

O meio de indução é renovado em ciclos de 7 a 30 dias e depois de cada passagem uma parte do material celular é recolhida para obtenção da forscolina.

Durante a fase de produção realiza-se a cultura, de preferência em condições de escuridão permanente.

Nas primeiras passagens de indução observa-se primeiro um crescimento da cultura, ainda praticamente não modificada, e a formação de derivados de forscolina limita-se frequentemente a pequenas quantidades de 1,9-didesoxiforscolina (DDF) e vestígios de outros diterpenos. Na segunda ou terceira passagem de indução alcança-se já o teor máximo de forscolina e de outros derivados. Forma-se o espectro completo de diterpenos que se encontra também na raiz das plantas.

A continuação da realização da fase de produção é possível em balões de Erlenmeyer numa duração de vários meses. Além disso o teor de forscolina e o crescimento da cultura são fortemente dependentes de se trabalhar num meio isento de hormonas (→ fase de produção, cerca de 3 passagens) ou de se trabalhar na presença de fitohormonas na forma de uma combinação auxina/citoquinina. Por exemplo, para uma produção a longo prazo é apropriado um meio com 1,0mg/litro de IBA e 0,2mg/litro de BAP.

Para obtenção do material celular contendo diterpenos em grande escala cultiva-se a cultura em fermentadores comerciais num meio de indução. A pré-cultura (isto

é, a passagem ou passagens antes do começo de um ensaio de indução) para um ensaio destes realiza-se de preferência em balões de Erlenmeyer, mas pode também ser realizada num fermentador do qual o meio de obtenção pode ser eliminado de forma apropriada.

Depois do termo de um ensaio de produção separam-se as células e o meio de cultura, e este último é descartado, visto que contém apenas quantidades mínimas de diterpenos. As células são secas e extraídas, analogamente às raízes, com solventes orgânicos (tolueno, diclorometano, metanol e outros) (ver por exemplo patente Alemã nº 2 557 784). A partir do extracto bruto isolam-se finalmente, por cromatografia, por exemplo em colunas de sílica-gel, a forskolina e eventualmente outros derivados de labdano, por exemplo 1,9-didesoxiforskolina e 1-desoxiforskolina.

A determinação quantitativa é realizada por exemplo por GLC, HPLC (INAMDAR et al., J. Pharm. Sci. 69 (1980) 1449-1451; Planta Medica 50 (1984) 30-34) ou DC-Scanning.

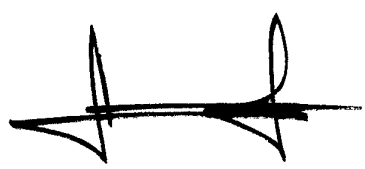
EXEMPLO 1

Indução de uma suspensão à luz

Utiliza-se uma cultura em suspensão de *Coleus forskohlii* mantida em exposição contínua à luz.

Pré-cultura

Quantidades:	16g de material celular (peso em fresco) num balão de Erlenmeyer de 1 litro com 300 ml de meio
Meio:	B5 (meio de cultura de células vegetais segundo GAMBORG, Plant Physiol. <u>45</u> (1970) 372) com 1,0mg/litro de 2,4-D e 0,2mg/litro de quinetina
Temperatura:	24°C
Frequência de agitação:	100rpm
Luz:	luz contínua
Duração de passagem:	14 dias



Taxa de multiplicação: 12

Fase de indução ou fase de produção

Meio: meio B5 com 0,4mg/litro de IBA

Luz: escuridão contínua

Temperatura: 24°C

Frequência de agitação: 100rpm

Para outras indicações ver o quadro

1 a seguir:

QUADRO 1

Exemplo 1, indução de uma suspensão à luz (= cultura de suspensão, cultivada em luz contínua) em 3 passagens sucessivas

	1ª passagem de indução	2ª passagem de indução	3ª passagem de indução
Quantidade de material celular (peso em fresco por 300 ml de meio)	15 g	16 g	24 g
Duração da passagem	15 Tage	13 Tage	12 Tage
Taxa de multiplicação *	10,1	6,0	4,6
Forscolina (% de peso em seco)	(+)	0,0516	0,0239
DDF (% de peso em seco)	0,0181	0,0542	0,0209

* Factor de multiplicação da massa celular referido às células liofilizadas.



Tratamento e determinação quantitativa

- liofilização das células recém-recolhidas depois da separação do meio nutriente
- pulverização do material celular em almofariz de porcelana
- extração dos diterpenos com tolueno (2 horas, 50°C) mediante rotação em evaporador rotativo, não evacuado
- filtração e concentração do filtrado em evaporador rotativo, até à secura (T=50°C)
- tomada do extracto bruto em metanol e banho de ultra sons.

A determinação quantitativa dos derivados de forskolina realizou-se depois da separação por cromatografia de camada delgada e detecção por meio de DC-Scanning:

- eluente = tolueno - acetato de etilo 85:15
- desenvolvimento = 2 x 15 cm
- placas = sílica-gel 60 F₂₅₄ - placas prontas
- detecção = reagente anisaldeído/ácido sulfúrico segundo STAHL, banho-maria: em seguida aquecimento a 130-140°C durante cerca de 5 minutos
- Scanner = firma Desaga (Shimadzu Dual CS-930) comprimento de onda 500 nm.

EXEMPLO 2

Fermentação com suspensão iluminada, produção em meio isento de hormonas

Com este exemplo mostra-se que a cultura de *Coleus forskohlii* - cultura em suspensão em condições de indução - também é possível em grande escala. Como recipiente de cultura utilizou-se um fermentador de 20 litros Airlift (WAHL J., Dissertation Tübingen 1977) com a possibilidade de manter constante automaticamente o teor de oxigénio dissolvido no meio (pO₂).

Primeiro realiza-se no fermentador uma passagem de crescimento em meio de obtenção normal (ver Exemplo 1), em seguida a suspensão de células é retirada até ficar

um resto de 4 litros e o fermentador é de novo cheio com o meio B5 até ao volume de trabalho de 19 litros.

Na primeira passagem de indução que se segue agora o crescimento da cultura é ainda muito forte; só após cerca de 13 dias se atinge um volume decrescente (PCV) de 95%. Nas células detectam-se depois disto pequenas quantidades de DDF, mas não a forscolina.

Para o prosseguimento do ensaio retira-se de novo a suspensão celular até um resíduo de 3,5 litros e substitui-se por meio B5 isento de hormonas, recente. Nesta segunda passagem de indução dá-se uma formação reforçada de diterpenos que alcança o seu máximo de 0,0053% de forscolina e 0,0116% de DDF no 9º dia, que representa portanto o ponto ótimo para recolha do material celular. Com durações mais prolongadas da fermentação reduz-se o teor de diterpenos constantemente, em virtude de uma morte parcial da cultura.

Dados para a fermentação

Cultura:	suspensão à luz de <i>Coleus forskohlii</i>
Pré-cultura em balões:	15 dias, quantidade 16-17g de FG em 300ml de meio de obtenção B5 (peso em fresco = peso das células húmidas depois de escorrido o meio)
Temperatura:	24°C
Volume de trabalho:	19 litros
Sacarose/glucose:	por adição de solução de sacarose (30%) mantém-se constante um índice de glucose residual 0,5%.

Passagem de crescimento (luz do dia difusa)

Meio:	B5 (1,0mg/litro de 2,4-B e 0,2mg/litro de quinetina)
Inóculo: (dose inoculada)	2,4 litros = 8 balões de pré-cultura
Duração:	16 dias
pO ₂ :	35%, a partir do 14º dia sobe até 50%

primeiro: passagem de indução (escuridão permanente)

Meio: B5, isento de hormonas
Inóculo: 4 litros de suspensão da passagem de crescimento
Duração: 13 dias
pO₂: 35%
anti-espumante: adição num total de cerca de 250ml de solução de polipropileno-glicol.

segundo: passagem de indução (escuridão permanente)

Meio: B5, isento de hormonas
Inóculo: 3,5 litros da suspensão da primeira passagem de indução
Duração: 26 dias
pO₂: de 70% até 40%, decrescente
Taxa de arejamento: vvm = 0,06-0,10 (=70-110 litros de ar por hora e por 19 litros do volume de trabalho)

Teor de diterpenos (%-p/p)	Forscolina	DDF
Dia 7	0,0035	0,0092
" 8	0,0032	0,0093
" 9	0,0053	0,0116
" 11	0,0016	0,0102

EXEMPLO 3

Indução de uma suspensão à luz, isolamento de diterpenos

Utiliza-se uma cultura em suspensão de *Colus forskohlii* obtida em luz contínua.

Pré-cultura: como no Exemplo 1

Fase de indução ou produção: como no Exemplo 1

Com as seguintes diferenças

Meio: B5, isento de hormonas
Quantidades: (segunda passagem de indução) 22,5g

Duração das passagens:

e 29,5g de FG/300ml de meio
primeira passagem de indução, 15
dias segunda passagem de indução 11
dias.

No fim da segunda passagem de indu-
ção as células são recolhidas para isolamento dos diterpenos.

Extracção:

2,26g de células liofilizadas com
tolueno (ver exemplo 1)

Extracto bruto:

68,6mg = 3,0% - apenas parcialmente
solúvel em metanol,

A obtenção na forma pura dos deriva-
dos de forskolina é conseguida por separação por cromatografia
em coluna.

Coluna:

Labomatic, cerca de 50ml, cheia com
sílica-gel 30 um

Fase móvel:

diclorometano-acetato de etilo 8:1

Solução de extracção:

metanol, como dissolvente, é substi-
tuído pela fase móvel.

Quantidade de substância a
separar:

cerca de 25mg (isto é cerca de 50%
do extracto bruto solúvel inicial)

A quantidade total de substâncias
eluíveis de 12,8mg produz entre outros:

0,7mg de forskolina

1,0mg de 1,9-didesoxi-forskolina (DDF)

0,4mg de 1-desoxi-forskolina.

A confirmação da identidade das frag-
ções individuais é realizada por GLC, HPLC (INAMDAR et al., 1980
e 1984) ou por cromatografia de camada delgada a duas dimensões.

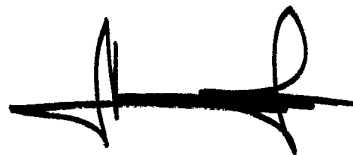
Placas de DC:

HPTLC, sílica-gel 60 F₂₅₄ 10 x 10cm

Eluente:

I. Diclorometano-acetato de etilo
8 : 1

II. Éter diisopropílico-clorofórmio
7 : 3.



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para obtenção de diterpenos do tipo labdano, caracterizado pelo facto de se cultivarem culturas de células em suspensão de *Coleus forskohlii* num meio de cultura de obtenção, na presença de fitohormonas apropriadas, se induzir em seguida na cultura de células a formação de diterpenos por substituição por um meio nutriente (meio de indução) que se distingue do meio de obtenção no que se refere à natureza ou à concentração das fitohormonas utilizadas, e se isolarem os diterpenos de forma conhecida por si.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de ser utilizado como meio de obtenção um meio de culturas de células vegetais corrente, com adição de auxinas numa concentração de 0,2-5mg/litro, e/ou citoquininas numa concentração de 0,05-2mg/litro.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de o meio de indução se distinguir do meio de obtenção por

- a) Não conter fitohormonas ou
- b) Em vez de auxinas de acção fortemente indiferenciada, como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), conter uma ou mais de



outras auxinas, ou

- c) Não conter auxinas mas conter apenas uma ou mais citoquininas, ou
- d) Conter uma ou mais auxinas e/ou citoquininas em concentração menor do que no meio de obtenção.

- 4^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de no meio de obtenção se utilizarem como auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético e/ou ácido naftilacético, e de estes serem substituídos no meio de indução por ácido indol-3-butírico ou outras auxinas de acção menos indiferenciada, ou serem removidos sem substituição.

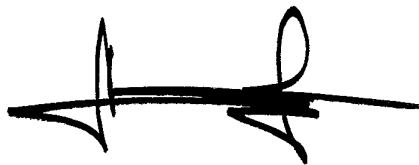
- 5^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de se utilizarem culturas submersas.

- 6^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de o processo ser realizado à luz, em escuro, ou em ciclos luz/escuro.

- 7^a -



- 7^a -

Processo de acordo com a reivindica
ção 1 caracterizado pelo facto de o processo ser realizado a tem
peraturas de 18 a 38°C.

- 8^a -

Processo de acordo com a reivindica
ção 1 caracterizado pelo facto de a duração de uma fase de indu
ção ser de 7 a 30 dias.

- 9^a -

Processo de acordo com a reivindica
ção 1 caracterizado pelo facto de decorrerem várias fases de in
dução sucessivas nas quais uma parte das células induzidas para
produção de diterpenos é em cada caso cultivada de novo em meio
de indução fresco.

- 10^a -

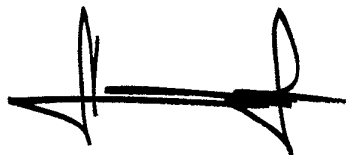
Processo de acordo com a reivindica
ção 1 caracterizado pelo facto de se obter forskolina.

A requerente declara que o primeiro
pedido desta patente foi apresentado na República Federal Alemã
em 25 de Outubro de 1986, sob o nº. P 36 36 397.9.

- 14 -

Lisboa, 22 de Outubro de 1987.

A handwritten signature in black ink, consisting of a horizontal line with several loops and flourishes above and below it.



RESUMO

"PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE DITERPENOS DO TIPO LABDANO, ESPECIALMENTE DE FORSCOLINA, A PARTIR DE COLEUS FORSKOHLII"

A invenção refere-se a um processo para obtenção de diterpenos do tipo labdano, que compreende cultivarem-se culturas de células em suspensão de *Coleus forskohlii* num meio de cultura de obtenção, na presença de fitohormonas apropriadas, se induzir em seguida na cultura de células a formação de diterpenos por substituição por um meio nutriente (meio de indução) que se distingue do meio de obtenção no que se refere à natureza ou à concentração das fitohormonas utilizadas, e se isolarem os diterpenos de forma conhecida por si.