

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 1997.07.08	(73) Titular(es): TASMANIAN ALKALOIDS PTY. LTD. 160 BIRRALEE ROAD WESTBURY, TAS 7303AU
(30) Prioridade(s): 1996.07.11 US 678208	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.04.27	(72) Inventor(es): ANTHONY JOHN FIST AU CHRISTOPHER JAMES BYRNE AU WAYNE LYLE GERLACH AU
(45) Data e BPI da concessão: 2016.11.09 032/2017	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO Nº 50, 9º ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO MELHORADA DE TEBAÍNA E ORIPAVINA POR PAPAVER SOMNIFERUM**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA DE PAPOULA DE REPRODUÇÃO ESTÁVEL DE PAPAVER SOMNIFERUM QUE CONTÉM TEBÁINA E ORIPAVINA QUE CONSTITUI CERCA DE 50% EM PESO OU MAIS DA COMBINAÇÃO DE ALCALOIDES QUE CONSISTE EM MORFINA, CODEÍNA, TEBÁINA E ORIPAVINA, O MÉTODO COMPREENDENDO OS PASSOS DE: A) EXPOR PELO MENOS UMA SEMENTE DE PAPOULA DE PAPAVER SOMNIFERUM A UM AGENTE MUTAGENIZANTE, B) CULTIVAR PELO MENOS UMA SEMENTE DE PAPOULA PARA PRODUZIR UMA PLANTA QUE CONTÉM UMA FOLHA OU UMA CÁPSULA DE PAPOULA IMATURA, OPCIONALMENTE ATRAVÉS DE VÁRIAS GERAÇÕES AUTO-FERTILIZADAS, C) FAZER A AMOSTRAGEM DA FOLHA OU DA CÁPSULA DE PAPOULA RELATIVAMENTE À PRESENÇA DE TEBÁINA, ORIPAVINA, MORFINA E CODEÍNA, E D) REPETIR OS PASSOS A) A C) ATÉ QUE SEJA OBTIDA UMA PLANTA DE PAPOULA DE PAPAVER SOMNIFERUM QUE CONTENHA TEBÁINA E ORIPAVINA QUE CONSTITUI CERCA DE 50% EM PESO OU MAIS DA COMBINAÇÃO DE ALCALOIDES QUE CONSISTE EM MORFINA, CODEÍNA, TEBÁINA E ORIPAVINA, E A PLANTAS QUE PODEM SER OBTIDAS POR ESTE MÉTODO.

RESUMO

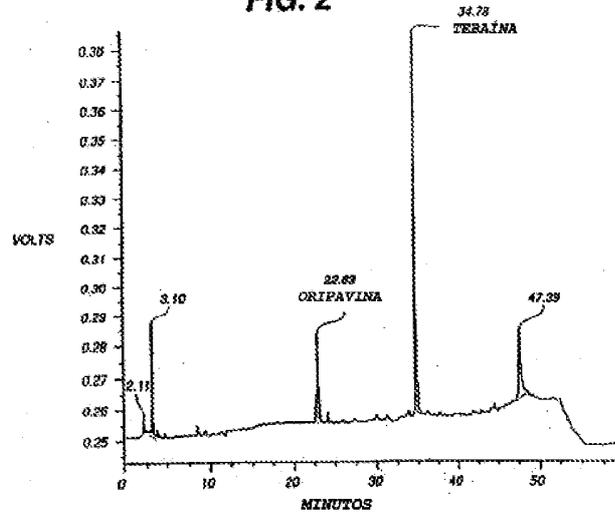
"PRODUÇÃO MELHORADA DE TEBAÍNA E ORIPAVINA POR *PAPAVER SOMNIFERUM*"

A invenção refere-se a um método para produzir uma planta de papoula de reprodução estável de *Papaver somniferum* que contém tebaína e oripavina que constitui cerca de 50% em peso ou mais da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina, o método compreendendo os passos de:

- a) expor pelo menos uma semente de papoula de *Papaver Somniferum* a um agente mutagenizante,
- b) cultivar pelo menos uma semente de papoula para produzir uma planta que contém uma folha ou uma cápsula de papoula imatura, opcionalmente através de várias gerações auto-fertilizadas,
- c) fazer a amostragem da folha ou da cápsula de papoula relativamente à presença de tebaína, oripavina, morfina e codeína, e
- d) repetir os passos a) a c) até que seja obtida uma planta de papoula de *Papaver Somniferum* que contenha tebaína e oripavina que constitui cerca de 50% em peso ou mais da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina,

e a plantas que podem ser obtidas por este método.

FIG. 2



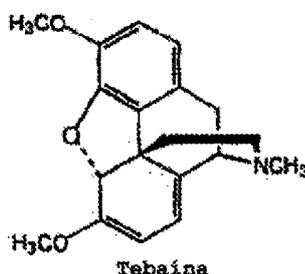
DESCRIÇÃO

"PRODUÇÃO MELHORADA DE TEBAÍNA E ORIPAVINA POR *PAPAVER SOMNIFERUM*"

A presente invenção refere-se à produção melhorada de tebaína e oripavina. Mais particularmente, a presente invenção refere-se à utilização de uma planta de papoula *Papaver somniferum* mutagenizada para produzir tebaína e oripavina com maior rendimento.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os 14-hidroxiomorfinanos, tais como, oxicodona, naloxona, naltrexona, nalbufina e nalmefeno são derivados de opiáceos importantes devido ao seu comportamento como potentes antagonistas de analgésicos e / ou narcóticos. As vias sintéticas mais práticas para a preparação destes fármacos utilizaram o alcaloide, tebaína, como um material de partida. Outros derivados de opiáceos importantes tais como os compostos em ponte anel-C buprenorfina e etorfina são também mais praticamente preparados a partir de tebaína.



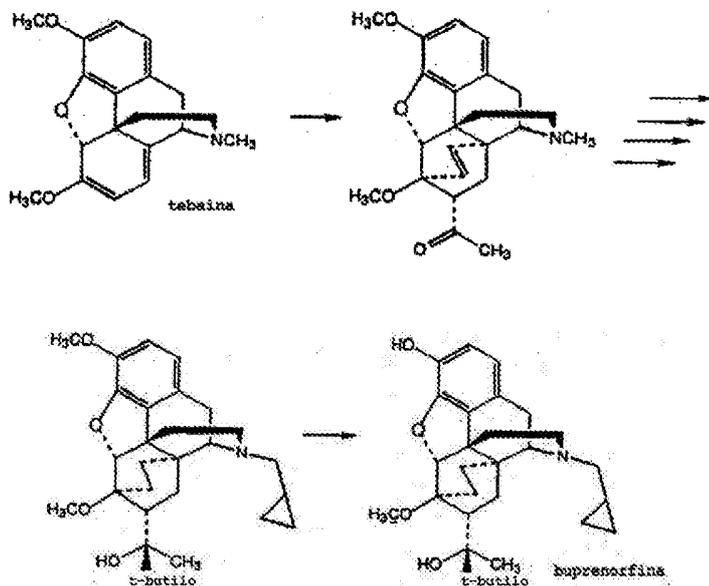
De acordo com um processo convencional, a tebaína é oxidada a 14-hidroxicodeinona por utilização de ácido m-cloroperbenzóico numa mistura de ácido acético / ácido

trifluoroacético ou por uma mistura de peróxido de hidrogénio e ácido fórmico. A 14-hidroxicodeína é cataliticamente reduzida a oxicodona. A oxicodona é um produto vendido para utilização como analgésico e sua produção consome grandes quantidades de tebaína.

A oxicodona pode ser, por sua vez, O-desmetilada com tribrometo de boro para originar oximorfona. Após o bloqueio dos grupos hidroxilo com um agente de bloqueio adequado, tal como, grupos acetilo, o derivado oximorfona é feito reagir com brometo de cianogénio numa desmetilação de von Braun para originar um derivado de N-cianodihidronormorfinona que é depois hidrolisado a 14-hidroxi-dihidronormorfinona (noroximorfona). O noroximorfona pode ser prontamente convertida em compostos nal por N-alquilação com halogeneto de alquilo apropriado, ou acilação com halogeneto de acilo ou anidrido apropriado, seguida por redução. Um processo mais geralmente aplicável, converte a oxicodona do processo acima em noroxicodona pela N-desmetilação de von Braun seguida por conversão num composto 3-O-metil-nal utilizando N-alquilação com um halogeneto de alquilo apropriado ou por alquilação com um halogeneto de alquilo apropriado, ou acilação com halogeneto de acilo ou anidrido apropriado, seguido de redução. O composto 3-O-metil-nal é feito reagir a um composto nal por O-desmetilação.

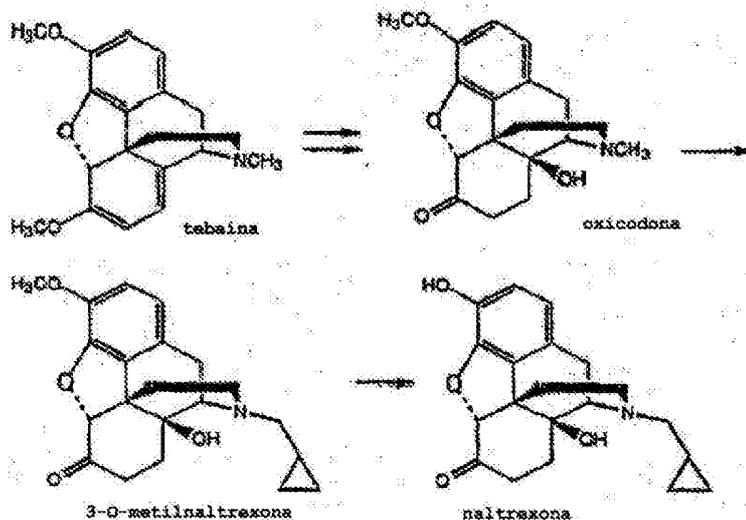
Uma síntese utilizando tebaína para produzir o opiáceo em ponte com anel C, buprenorfina, é mostrada no Esquema A1:

Esquema de Fluxo A1



Outra síntese utilizando tebaina para produzir o 14-hidroximorfinano, a naltrexona como representante dos compostos nal, é mostrada no Esquema A2.

Esquema de Fluxo A2

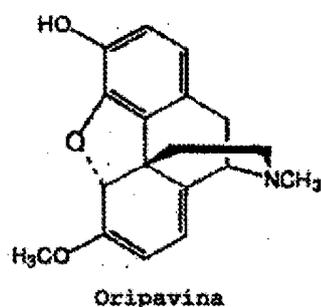


Embora estas sínteses sejam eficazes, a disponibilidade de tebaína é limitada e o seu custo elevado. O elevado custo da tebaína contribui para o elevado custo dos 14-hidroximorfinanos seus derivados.

Uma razão para a disponibilidade limitada de tebaína, e seu elevado custo, é que a síntese total é difícil. As Pat. U.S. números 4 613 668 e 4 795 813 discutem a escassez de tebaína e ensinam a síntese total, ou síntese alternativa, dos 14-hidroximorfinanos. No entanto, a procura de tebaína permanece.

Uma segunda razão para a disponibilidade limitada de tebaína, e seu elevado custo, é que a fonte primária de tebaína é a extração da planta de papoula, *Papaver somniferum*. A morfina é o principal alcaloide que se acumula em cápsulas de *Papaver somniferum*. Assim, o fornecimento de tebaína está, em grande medida, limitado a alguma fração da procura de morfina.

São conhecidas outras vias sintéticas para a preparação dos 14-hidroximorfinanos utilizando o alcaloide, oripavina, como um material de partida.

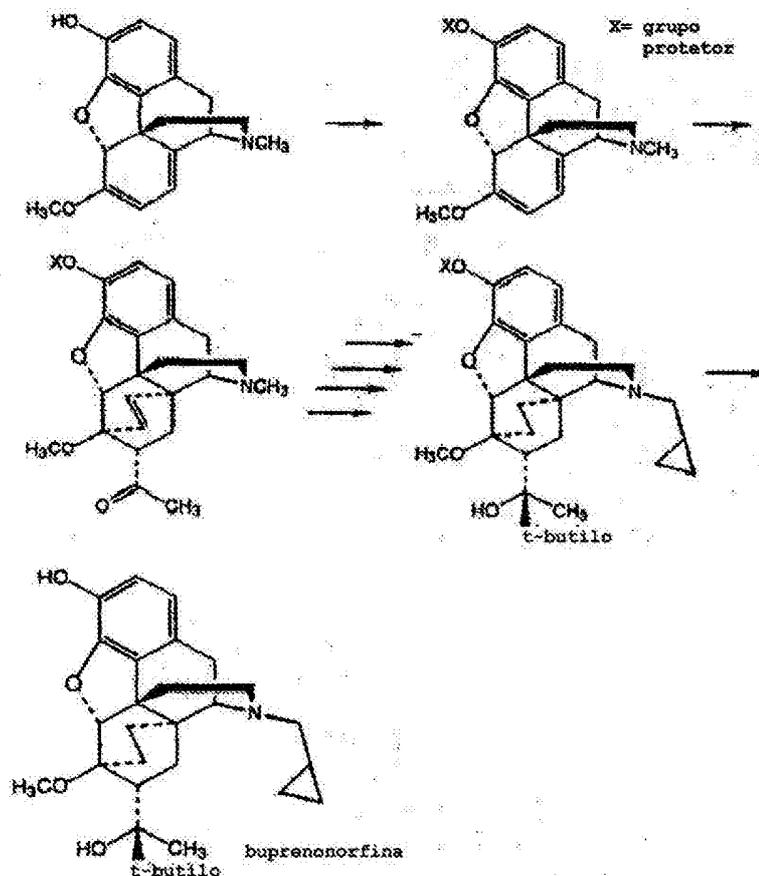


A oripavina não foi utilizada como um material de partida para os 14-hidroximorfinanos em qualquer sentido prático porque não é recuperável a partir de *Papaver somniferum* em

qualquer rendimento prático. Assim, não existe presentemente falta deste material, mas somente porque nunca foi desenvolvida qualquer procura para ele.

Uma síntese utilizando oripavina para produzir o opiáceo em ponte com anel C, buprenorfina, é mostrada no Esquema A3.

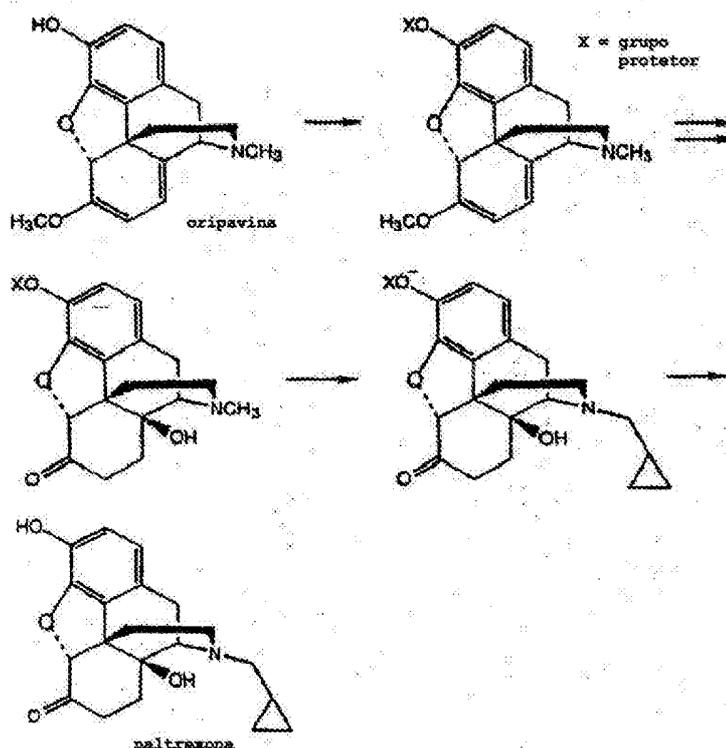
Esquema de Fluxo A3



Em comparação com a síntese a partir de tebaína, esta síntese tem um passo adicional. No entanto, o grupo protetor, X, pode ser escolhido a partir de grupos, tais como acetilo, benzoílo ou trialquilsililo de modo que a remoção de X na última etapa pode ser uma reação de rendimento elevado e rápida em comparação com a desmetilação necessária com a utilização de tebaína.

Outra síntese utilizando oripavina para produzir o 14-hidroxiomorfinano, a naltrexona como representativa dos compostos nal, é mostrada no Esquema A4.

Esquema de Fluxo A4



Em comparação com a síntese a partir de tebaína, esta síntese tem um passo adicional. Contudo, como acima, o grupo protetor, X, pode ser escolhido a partir de grupos, tais como, acetilo, benzoílo ou trialquilsililo de modo que a remoção de X na última etapa pode ser uma reação de rendimento elevado e rápida em comparação com a desmetilação requerida com a utilização de tebaína.

Os alcaloides são extraídos das cápsulas de papoula de *Papaver somniferum* por dois métodos comerciais. Num método, a cápsula imatura é cortada e o látex recolhido a partir da ferida. O látex seco ao ar é ópio que, de acordo com o

Índice Merck, 11ª edição, contém alcaloides nas quantidades apresentadas na Tabela I. Num segundo método, as cápsulas de papoula maduras e as hastes de cápsula de papoula são recolhidas e debulhadas para remover as sementes e formar uma palha. Quando necessário, a palha é seca até um teor de água inferior a 16%. A extração de solvente ou água é utilizada para remover os alcaloides da palha. Para as variedades de *Papaver somniferum* normalmente cultivadas pelos Requerentes aqui, a palha, numa base seca, contém alcaloides nas quantidades apresentadas na Tabela I.

	TABELA I	
	ópio	Palha
Morfina, %	10 - 16	1 - 3
codeína, %	0,8 - 2,5	0,05 - 0,3
oripavina, %	0 - 0,1	0 - 0,65
tebaína, %	0,5 - 2	0,15 - 0,65

Como pode ser visto, o rendimento de tebaína e oripavina é confundido com o de outros alcaloides.

Quando se utiliza solvente ou água ou fluido supercrítico, tal como CO₂, é utilizada a extração para remover os alcaloides da palha, tal método, tal como praticado, envolve a produção de "Concentrado de Palha de Papoula". O Concentrado de Palha de Papoula é definido como "O material que surge quando a palha de papoula entrou em um processo para a concentração dos seus alcaloides, quando tal material é disponibilizado no comércio" (MULTILINGUAL DICTIONARY OF NARCOTIC DRUGS AND PSYCHOTROPIC SUBSTANCES UNDER INTERNATIONAL CONTROL) United Nations, New York, 1983). Não incompatível com a definição anterior, o Concentrado de Palha de Papoula é definido como "o extrato bruto de palha de papoula em forma líquida, sólida ou em pó

que contém os alcaloides fenantreno da papoula de ópio", 45 Registo Federal U.S. 77466, 24 de Novembro, 1980. Quando na forma líquida, o líquido é de preferência concentrado antes de entrar no comércio. O Concentrado de Palha de Papoula é geralmente preferido na forma de pó que resulta simplesmente da remoção do solvente ou água após extração da palha de papoula. Em um sentido mais estrito, o concentrado de palha de papoula deverá conter os alcaloides de *Papaver somniferum* substancialmente em suas proporções brutas. No entanto, mais amplamente, alguns dos alcaloides, ou porções dos mesmos, poderão ser eliminados do Concentrado de Palha de Papoula desde que pelo menos dois dos componentes alcaloides permaneçam nas suas proporções brutas, um para o outro.

É o objetivo da presente invenção produzir palha de papoula de *Papaver somniferum* que contenha maiores rendimentos de tebaína e / ou oripavina. É outro objetivo da presente invenção produzir tal palha de papoula que não contenha codeína ou morfina.

É um objetivo da presente invenção produzir ópio de *Papaver somniferum* tendo rendimentos aumentados de tebaína e / ou oripavina. É outro objetivo da presente invenção produzir tal ópio sem possuir codeína ou morfina.

É um objetivo da presente invenção produzir um concentrado de palha de papoula de *Papaver somniferum* que possua rendimentos aumentados de tebaína e / ou oripavina. É outro objetivo da presente invenção produzir tal concentrado de palha de papoula sem codeína ou morfina.

É ainda outro objetivo da presente invenção providenciar um processo melhorado para a produção de tebaína e / ou

oripavina. O processo melhorado utiliza uma planta de papoula mutagenizada de *Papaver somniferum* que providencia tebaína e / ou oripavina com rendimento melhorado.

Também é revelado aqui um método pelo qual o rendimento de tebaína e / ou oripavina de uma planta de papoula de *Papaver somniferum* pode ser melhorado.

Ainda outro objetivo da presente invenção é proporcionar uma planta de papoula de *Papaver somniferum* com um rendimento melhorado de tebaína e / ou oripavina sem morfina ou codeína.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se com uma planta de papoula de *Papaver somniferum* que possui uma peculiaridade tal que, ao se colher as suas cápsulas de papoula, a referida planta produz uma palha de papoula que contém tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides constituída por morfina, codeína, oripavina, não existindo morfina ou codeína na combinação de alcaloides, podendo a referida planta ser obtida por um método que compreende os passos de: a) fazer crescer a planta *P. somniferum* a partir de sementes de ATCC 97652, e b) reproduzir as referidas plantas, mantendo assim a peculiaridade.

A invenção refere-se também a um método para a produção de palha de papoula de *Papaver somniferum* que contém rendimentos aumentados de tebaína e / ou oripavina, que compreende os passos de: a) produzir uma planta de *Papaver somniferum* de acordo com a invenção, e b) colher cápsulas de papoula de *Papaver somniferum* para produzir uma palha que contenha tebaína e oripavina que constitui 100% em peso

da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina, não havendo morfina ou codeína na combinação de alcaloides.

É assim revelada aqui palha de papoula melhorada de uma *Papaver somniferum* de reprodução estável para a extração de tebaína e / ou oripavina, possuindo a palha debulhada tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina. A palha aqui descrita não possui morfina ou codeína na combinação de alcaloides.

A invenção refere-se também a um método para a produção de ópio de *Papaver somniferum* possuindo rendimentos aumentados de tebaína e / ou oripavina que compreende os passos de:

- a) produzir uma planta de *Papaver somniferum* de acordo com a invenção,
- b) recolher e secar o látex das cápsulas de papoula imaturas da planta de *Papaver somniferum* para produzir ópio que contenha tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina, não existindo morfina ou codeína na combinação de alcaloide.

É assim revelado aqui um ópio melhorado de um *Papaver somniferum* de reprodução estável para a extração de tebaína e / ou oripavina, tendo o ópio tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina. O ópio aqui revelado não possui morfina ou codeína na combinação de alcaloides.

É também aqui revelado um concentrado melhorado de palha de papoula de um *Papaver somniferum* de reprodução estável para

a extração de tebaína e / ou oripavina, o concentrado de palha de papoula que contém tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina. O concentrado de palha de papoula aqui descrito não possui morfina ou codeína na combinação de alcaloides.

É também proporcionado pela presente invenção um primeiro método para a produção de tebaína e / ou oripavina que compreende os passos de:

- a) recolher cápsulas de papoula da planta de *Papaver somniferum* de acordo com a invenção para produzir uma palha que contém tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina e
- b) extrair quimicamente a tebaína e / ou a oripavina a partir da palha.

De acordo com este primeiro método da invenção, não existe morfina ou codeína na combinação de alcaloides.

É também proporcionado pela presente invenção um segundo método para a produção de tebaína e / ou oripavina que compreende os passos de:

- a) recolher e secar o látex das cápsulas de papoula imaturas de uma planta de *Papaver somniferum* de acordo com a invenção para produzir ópio que contém tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina e
- b) extrair quimicamente a tebaína e / ou a oripavina a partir do ópio.

De acordo com este segundo método da invenção, não há morfina ou codeína na combinação de alcaloides.

É também aqui revelado um terceiro método para melhorar o rendimento de tebaína e / ou oripavina de um *Papaver somniferum* de reprodução estável, compreendendo o método os passos de:

- a) expor pelo menos uma semente de papoula de *Papaver somniferum* a um agente mutagenizante,
- b) fazer crescer pelo menos uma semente de papoula para produzir uma planta com uma folha ou uma cápsula de papoula imatura, opcionalmente através de várias gerações auto-fertilizadas,
- c) efetuar a amostragem da folha ou da cápsula de papoula relativamente à presença de tebaína, oripavina, morfina e codeína, e
- d) repetir os passos a) a c) até se obter uma planta de papoula de *Papaver somniferum* que contém tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina.

De acordo com este terceiro método, não existe morfina ou codeína na combinação de alcaloides.

Também é revelado aqui um suporte de *Papaver somniferum* de acordo com a invenção que, após a colheita das suas cápsulas de papoula, originará uma palha de papoula possuindo tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina, cada uma numa base de peso seco, ou alternativamente, que após a recolha e secagem do látex a partir das suas cápsulas de papoula imaturas, originará um

ópio que possui tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina. Não existe morfina ou codeína na combinação alcaloide.

A invenção também se relaciona com um método para a produção de um 14-hidroxiomorfinano farmacologicamente útil, o referido método compreende a produção de tebaína e / ou oripavina pelo primeiro ou segundo métodos referidos acima, e a conversão química da referida tebaína e / ou oripavina no 14-hidroxiomorfinano desejado. De acordo com este método, o referido 14-hidroxiomorfinano poderá ser selecionado a partir do grupo que consiste de oxicodona, naloxona, naltrexona, nalbufina, nalmefina e buprenorfina.

É também aqui revelada a utilização de tebaína ou oripavina isolada da palha de papoula tal como aqui descrito ou partir do ópio como aqui descrito no fabrico de um 14-hidroxiomorfinano. O referido 14-hidroxiomorfinano poderá ser selecionado a partir do grupo que consiste de oxicodona, naloxona, naltrexona, nalbufina, nalmefina e buprenorfina.

É também aqui revelado um método para produzir uma planta de papoula de *Papaver somniferum* que possui tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina, o método compreendendo os passos de:

- a) expor pelo menos uma semente de papoula de *Papaver somniferum* a um agente mutagenizante,
- b) fazer crescer pelo menos uma semente de papoula para produzir uma planta que possui uma folha ou uma cápsula de papoula imatura, opcionalmente através de múltiplas gerações auto-fertilizadas,

c) fazer a amostragem da folha ou da cápsula de papoula relativamente à presença de tebaína, oripavina, morfina e codeína, e

d) repetir os passos a) até c) até se obter uma planta de papoula de *Papaver somniferum* que possui tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina.

Este método poderá adicionalmente compreender um passo de polinização cruzada de plantas obtidas no passo (d) com plantas normais como parte de um programa de reprodução controlada. As plantas que podem ser obtidas pela implementação destes métodos são também aqui reveladas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Utilizando as plantas mutagenizadas de *Papaver somniferum* como aqui descrito, as pessoas peritas na técnica sabem facilmente como cultivá-las, reproduzi-las, recolher o látex ou a palha seca e purificar a tebaína e / ou a oripavina. Como uma capacitação da presente invenção, as sementes para as plantas mutagenizadas de *Papaver somniferum*, como aqui descrito, têm sido depositadas sob o Tratado de Budapeste com a American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, EUA, em 9 de Julho, 1996, sob Adesão No ATCC 97652, e serão disponibilizadas aquando da maturação deste pedido numa patente. A disponibilidade destas sementes não deve ser interpretada como uma licença para a prática desta invenção em violação dos direitos concedidos sob a autoridade de qualquer governo de acordo com suas leis de patente ou dos direitos de criador. Independentemente da habilitação providenciada por este depósito, as pessoas

peritas na técnica de mutagenização de sementes podem obter a semente aqui descrita empregando o processo de mutagénesse como descrito adiante.

A produção de sementes mutagenizadas é bem conhecida na técnica. Os métodos de mutagénesse de sementes, bem como mutagénicos adequados para utilização nestes métodos, tais como, metanossulfonato de etilo (EMS), são descritos no *Manual on Mutation Breeding*, 2nd ed., I.A.E.A., Viena 1977 ou em *Plant Breeding, Principles and Prospects*, Chapman and Hall, London 1993. Para sementes mutagenizadas por raios X, as sementes hidratadas podem ser tratadas com 20000 rad, (30 cm da fonte durante 45 minutos usando um filtro). A mutagénesse de raios X é descrita e comparada com a mutagénesse de EMS por Filippetti, A. et al., "Improvement of Seed Yield in *Vicia Faba* L. By Using Experimental Mutagenesis II Comparison of Gamma-Radiation and Ethyl-Methane-Sulphonate (EMS) in Production of Morphological Mutants", *Euphytica* 35 (1986) 49-59. As sementes mutagenizadas por DEB, diepoxibutano, podem ser obtidas por imersão das sementes em água durante a noite, seguidamente embebidas em DEB 22 mM durante 4 horas, seguido por lavagem extensiva. Agentes mutagénicos adicionais incluem sulfureto de etilo-2-cloroetilo, 2-cloroetil-dimetilamina, óxido de etileno, etilenoimina, sulfonato de dimetilo, sulfonato de dietilo, propanossulfona, beta-propiolactona, diazometano, N-metil-N-nitrosouretano, laranja de acridina e azida de sódio. Os requerentes aqui empregam e preferem o EMS como mutagénico.

A mutagénesse utilizando EMS está bem descrita na literatura. O *Manual on Mutation Breeding*, supra, relata um processo de mutagénesse por EMS preferido para sementes de cevada, como praticado por K. Mikaelson. Neste processo

preferido, as sementes são preparadas, pré-embebidas, tratadas com o mutagénio e pós-lavadas.

Na preparação, as sementes de tamanho uniforme são selecionadas e colocadas em sacos de malha de polietileno, cerca de 200 sementes. Subsequentemente, as sementes são mantidas num exsiccador sobre uma solução de glicerol a 60%, que dá às sementes um teor de humidade de cerca de 13%. Em pré-imersão, os sacos de sementes são transferidos para copos de precipitação com água destilada ou desionizada e embebidos durante 16-20 horas a uma temperatura de 20-22 °C. O período de pré-imersão é importante para a absorção ou difusão do mutagénio. A pré-imersão deverá ser suficiente para promover a difusão do mutagénio na semente e, ao mesmo tempo, estimular o tecido do meristema embrionário para iniciar a síntese do DNA. É neste ponto que a elevada frequência de mutação pode ser alcançada com danos mínimos nos cromossomas. Para serem tratados com o mutagénio, os sacos de semente são transferidos para copos de precipitação que contém uma solução de EMS em água destilada ou desionizada. Para cevada e trigo, as frequências de mutação máximas são obtidas sob condições de tratamento em que a concentração de EMS é 0,05-0,1 M, a temperatura do banho é de 30-35 °C e o tempo de exposição das sementes ao banho é de 0,5-2 horas. Os tratamentos relativamente fracos são preferidos no varrimento de massa para se conseguir uma mutação máxima com dano fisiológico mínimo. Tais tratamentos dão melhor germinabilidade e sobrevivência, menos redução do crescimento da planta e menos esterilidade em comparação com tratamentos mais fortes. Uma pós-lavagem integral em água após o tratamento EMS é essencial. Esta pós-lavagem pode ser levada a cabo em água corrente da torneira, preferencialmente não inferior a 15 °C, durante um período não inferior a 4 horas. A EMS deve ser removida por pós-lavagem, a fim de evitar efeitos

secundários incontroláveis pelo mutagénio. Após a pós-lavagem, as sementes devem ser plantadas o mais rapidamente possível. Se as sementes não podem ser plantadas logo após o processo de mutagénese, devem ser imediatamente secas regressando a um teor de humidade de cerca de 13%. Isto pode ser conseguido por simples secagem ao ar das sementes à temperatura ambiente e humidade relativa razoavelmente baixa.

As pessoas peritas na técnica reconhecerão que este método de mutagénese preferido para sementes de cevada e trigo pode ser facilmente modificado para sementes de papoula. No caso das sementes de papoula, verificou-se ser útil e conveniente, pelos inventores desta invenção, dispensar a dessecação, prolongar o tempo de pré-imersão até 48 horas e baixar a temperatura do banho do tratamento mutagénico até à temperatura ambiente. Outras modificações serão evidentes para os profissionais peritos.

Após as sementes terem sido expostas ao mutagénio, as sementes são cultivadas até à maturidade em condições controladas e auto-polinizadas. As sementes da planta madura são tomadas e pelo menos uma semente é plantada para crescer uma geração M2. A geração M2 é rastreada relativamente à produção de alcaloides. É claro que é possível rastrear a geração M1, mas há várias vantagens no rastreamento da geração M2. Em primeiro lugar, o rastreio da geração M2 assegura que a característica resultante da mutagénese pode ser herdada. Em segundo lugar, por crescimento da geração M2, a robustez básica da planta é comprovada antes do rastreio. Em terceiro lugar, as características resultantes da mutagénese são geralmente herdadas, *i.e.*, não serão homozigóticos na geração M2, *i.e.*, não serão mascarados por um gene dominante. As plantas M2 podem ser cultivadas para produzir uma cápsula imatura, mas é possível poupar tempo e trabalho se as

plantas forem rastreadas numa fase de crescimento mais precoce. É recomendado que as plantas sejam rastreadas num ponto começando no estágio de 10 folhas, até o estágio "crescimento rápido", onde a planta atinge cerca de 6 polegadas de altura. O processo de rastreio em si é o mais intensivo em mão de obra. Assim, para melhorar o retorno do trabalho, apenas as plantas que parecem saudáveis devem ser rastreadas.

No processo de rastreio, o objetivo é medir cada planta relativamente ao teor de morfina, codeína, tebaína e oripavina. Isto pode ser conseguido extraíndo, por exemplo, uma folha seca num tampão líquido ou dissolvendo uma amostra de látex num tampão. As soluções de tampão são colocadas em placas de 96 poços e alimentadas mecanicamente através de qualquer dos HPLC de alto rendimento disponíveis no mercado.

As plantas com teor de alcaloides interessante são adicionalmente cultivadas e examinadas com mais pormenor. De acordo com o procedimento aqui descrito, uma segunda amostra é tomada a partir de cerca de 1/20 plantas para clarificar os resultados do rastreio inicial. Uma planta que possui elevada tebaína e oripavina e substancialmente nenhuma morfina ou codeína foi encontrada após rastreio de aproximadamente 8000 plantas.

Conforme indicado acima, é obtido pela presente invenção, uma palha de papoula debulhada ou ópio que possui tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina. Não há morfina ou codeína na combinação alcaloide.

As características desejadas, *i.e.*, teor tebaína e de oripavina elevado *versus* teor de morfina ou codeína, uma vez estabelecidos são altamente hereditários. Para manter as características desejadas, deve-se ter cuidado para evitar a polinização cruzada com plantas normais, a menos que tal polinização cruzada seja parte de um programa de melhoramento controlado.

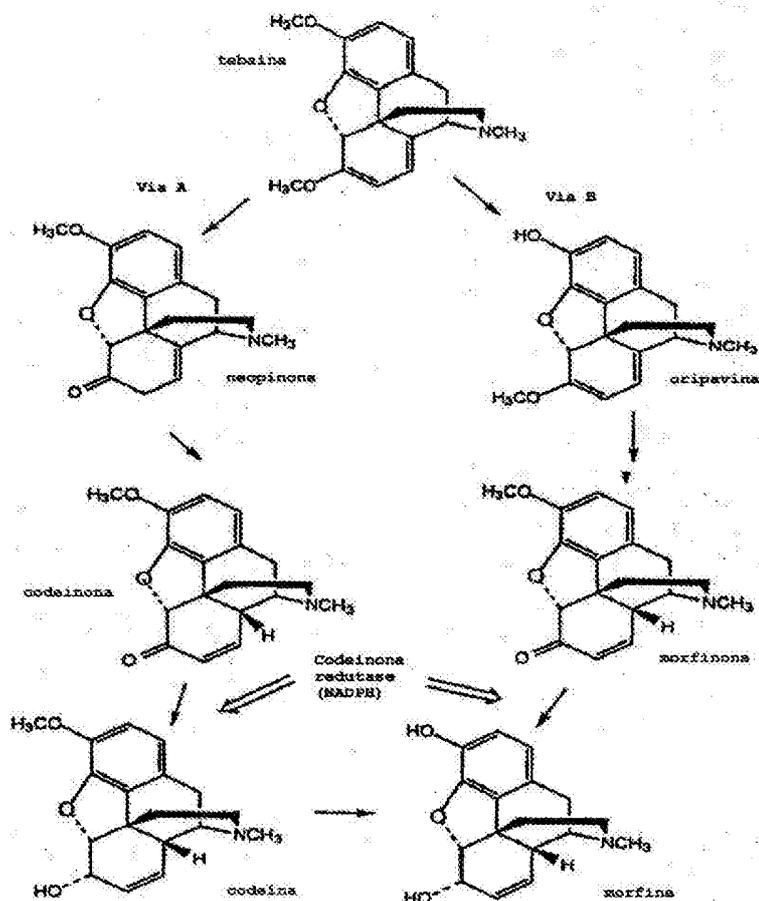
A teoria segundo a qual se verificou que a mutagênese é capaz de aumentar o teor de tebaína e / ou oripavina da *Papaver somniferum* em relação ao teor de morfina e codeína não é capaz de produzir uma explicação certa ou definitiva neste momento. A mutagênese poderá ter resultado no aumento de determinada atividade enzimática de uma maneira qualitativa ou quantitativa convertendo, por exemplo, morfina em morfinona. Alternativamente, a mutagênese poderá ter modificado a via de biossíntese de várias maneiras para minimizar a produção de morfina e codeína. Apesar do fato de que respostas definitivas não estarem disponíveis, existem boas razões para acreditar que a resposta correta é conhecida.

O *Papaver somniferum* é postulado como tendo duas vias biossintéticas a partir da tebaína até morfina como mostrado no Esquema de Fluxo B. A via A, através de neopinona, codeinona e codeína foi proposta por Parker, H.I., J. Am. Chem. Soc., 94, 1276-1282 (1972). A via B, através de oripavina e morfinona foi proposta por Brochmann-Hanssen, E., Planta Med., 50, 343-345 (1984). A codeinona e o morfinona variam apenas na presença de um grupo metilo na posição 3 da codeinona. Acredita-se que a enzima codeinona redutase (NADPH) seja ativa em ambas as vias, reduzindo a codeinona em codeína e morfinona em morfina. A codeinona redutase foi isolada, sua atividade é

descrita e suas propriedades físicas são caracterizadas por Lenz, R., and Zenk, MH, Eur. J. Biochem, 233, 1, 132-139 (1995).

Pelos métodos aqui descritos, foi obtida uma variedade de *Papaver somniferum* que não possuía substancialmente morfina ou codeína. Tanto a Via A como a Via B foram tornadas inoperacionais para produzir morfina. É altamente improvável que a produção ou atividade de duas enzimas diferentes, uma ativa em cada via, fosse simultaneamente inibida numa dada planta mutagenizada. É muito mais provável que seja inibida a produção ou atividade da única enzima que é ativa em ambas as vias. A codeinona redutase é a única enzima ativa conhecida em ambas as vias. Poderá ser obtida reprodução estável de *Papaver somniferum* através de técnicas de ADN recombinante. As técnicas para modificar ou apagar regiões específicas de sequências de ADN são bem conhecidas dos peritos na técnica.

Esquema de Fluxo B



A recuperação da tebaína e / ou oripavina a partir da palha seca ou do ópio de *Papaver somniferum* é um processo bem estabelecido na técnica. Até agora, a tebaína tem sido extraída desta planta como parte do processo de extração da morfina e codeína. Num processo, a palha é tratada com uma pequena quantidade de cal e água para amaciar as cápsulas e para formar uma base livre de alcaloides. A extração em contracorrente da palha amaciada com metanol, etanol ou outro solvente adequado forma um extrato de solvente / água ou "miscela" que contém os alcaloides, com morfina a uma concentração de cerca de 1 g/L em que a palha é obtida a partir de *Papaver somniferum* padrão. O volume da miscela é reduzido cerca de 30 x sob vácuo para produzir um concentrado aquoso. A tebaína é extraída a partir do

concentrado aquoso utilizando uma extração líquido/líquido com tolueno, ajustando o pH para a melhor separação da tebaína. A tebaína é recuperada a partir do tolueno. Evidentemente, a recuperação da tebaína a partir do *Papaver somniferum* melhorado aqui providenciado será facilitada pelo facto da concentração da tebaína na miscela ser muito maior do que a de outros alcaloides e assim pode ser mais facilmente recolhida por precipitação. Também, na ausência substancial de morfina e codeína, a tebaína pode ser diretamente extraída a partir da palha utilizando tolueno. No caso da oripavina, não tem sido recuperado separadamente numa escala comercial, contudo, poderá ser recuperada oripavina a partir de um concentrado aquoso por ajuste a pH básico e extraído com solvente orgânico tal como tolueno. A oripavina permanecerá na fase aquosa e a tebaína será encontrada no solvente orgânico. A oripavina pode seguidamente ser recuperada a partir da fase aquosa ajustando o pH para precipitar a oripavina.

Os exemplos seguintes são apresentados como ilustrações específicas da invenção reivindicada. Entender-se-á, contudo, que a invenção não está limitada aos detalhes específicos apresentados nos Exemplos.

EXEMPLOS

Foram obtidas sementes de *Papaver somniferum* de tamanho aproximadamente uniforme, secas até cerca de 8% de LOD (perda por secagem) e colocadas num saco de malha de polietileno com um peso de cerca de 5 gramas ou cerca de 12 500 por saco. As sementes foram pré-embebidas em copos de precipitação com água destilada que contém CaSO_4 4 mM à temperatura ambiente durante cerca de 36 horas. Imediatamente após a fase de pré-embeber, os sacos de sementes foram imersos num banho mutagénico que contém quer

0,3% v/v (-0,028 M) ou 0,5% v/v (-0,047 M) de metanossulfonato de etilo (EMS) à temperatura ambiente durante trinta minutos. Imediatamente a seguir ao banho mutagénico, os sacos de sementes foram pós-lavados em água corrente da torneira durante um período de quatro horas. Após a pós-lavagem, as sementes foram mantidas húmidas e plantadas dentro de uma hora.

As sementes foram plantadas em parcelas exteriores e cultivadas até à maturidade. A técnica de plantio empregue foi em todos os aspetos normal para o trabalho de ensaio da papoula, e semelhante ao cultivo comercial da papoula. As sementes foram semeadas usando um "semeador cónico" ou uma perfuradora da parcela de ensaio. A profundidade da semente foi de cerca de 1 cm. Foi utilizado fertilizante que contém N, P e K. As parcelas foram irrigadas imediatamente após a semeadura. As flores de papoula foram auto-polinizadas e a maioria das flores foram cobertas com sacos de papel de papel "kraft" branqueado branco para evitar a polinização cruzada. As sementes foram colhidas a partir das plantas que cresceram vigorosamente e pareciam saudáveis. Só muito poucas estavam pálidas e apresentaram crescimento fraco. Uma segunda geração, M2, foi cultivada a partir das sementes colhidas. Estas sementes foram plantadas em tabuleiros que contém 200 plantas. A última fila de cada tabuleiro foi reservada para uma variedade de papoula com tebaína elevada conhecida para servir como um controlo. Quando as plantas M2 estavam entre o estágio de 10 folhas e o estágio de "crescimento rápido", cerca de 6 polegadas de altura, foram rastreadas relativamente ao teor de alcaloide.

O processo de rastreio foi basicamente um processo de três passos. No primeiro passo, uma folha foi cortada a partir

de uma planta M2 e cerca de 0,5 μL de látex foi recolhido na ferida. O látex foi diluído num tubo de microcentrífuga com 250 μL de tampão. O tampão continha 0,2 M de fosfato de amónio, 20% de etanol, e apresentava um pH de 4,5. O tubo de microcentrífuga foi brevemente mantido num agitador de vórtice para garantir a mistura. No segundo passo, a solução tamponada foi centrifugada para eliminar substancialmente os sólidos em suspensão e cerca de 200 μL foram decantados para um tubo de analisador automático de 40 mm x de 8 mm. 250 μL de tampão adicional, foram adicionados a cada tubo de analisador automático de forma que a agulha de amostragem do analisador automático poderia alcançar a solução. No terceiro passo, os tubos de analisador automático foram carregados num carrossel de 96 tubos com uma amostra padrão que contém morfina, codeína, tebaína, e papaverina e o carrossel foi inserido no módulo de injetor automático do sistema de HPLC da Waters. A fase móvel de HPLC foi metanol aquoso (cerca de 30%) que contém tampão acetato de amónio (0,08-0,12 M), pH 4-5. O caudal da fase móvel foi de 0,8-1,5 mL / minuto. Uma coluna Partisphere SCX (4,6 x 125 mm) da Whatman foi utilizada a uma temperatura de 40 °C. Um detetor de UV 440 da Waters foi usado para detetar os picos a 254 nm. Os dados foram interpretados e recolhidos numa Millennium Data Station da Waters. O sistema foi utilizado para analisar morfina, codeína, oripavina, tebaína e papaverina.

Foram normalmente rastreadas cerca de 900 plantas por semana. Destas, cerca de 50 foram novamente testadas para confirmar os perfis de alcaloides. De cerca de 18000 plantas rastreadas, 365 foram transplantadas e cresceram até a maturidade como sendo de interesse adicional.

A planta D233, uma planta de geração M2 designada "Norman", foi testada pela primeira vez e não mostrou nenhum pico no cromatograma para a morfina, a única planta encontrada com zero de morfina. Oito dias após a amostra inicial, um novo teste utilizando o mesmo procedimento, mas com um sistema de HPLC de gradiente mostrou um pico muito pequeno de morfina. Norman foi replantada juntamente com uma variedade de papoula com tebaína elevada, uma planta de controlo como descrito acima, no mesmo estágio de desenvolvimento e ambas as plantas foram deixadas produzir uma cápsula imatura. Uma amostra de látex foi recolhida a partir da cápsula de ambas as plantas e testada com um sistema de HPLC de gradiente. Quatro semanas após a amostra inicial, um novo teste de Norman usando o mesmo procedimento, mas de novo com um sistema de HPLC de gradiente, não apresentou qualquer morfina e codeína. Norman foi auto fertilizada por recobrimento das flores com um pedaço de papel de seda preso com um fio revestido de plástico. As cápsulas de Norman e a planta de controlo foram colhidas na maturidade, a amostra inicial foi tomada após cerca de 8 a 9 semanas. Norman produziu 3 cápsulas, providenciando, em peso fresco, cerca de 2,4 g de palha (o material da cápsula debulhado) e cerca de 3,5 g de sementes. A palha de ambas, Norman e a planta de controlo foram extraídas utilizando uma extração de cal para a morfina e uma extração de ácido para a tebaína, codeína e oripavina. A extração de cal, a extração de ácido e o procedimento de análise são descritos adiante sob o título "Procedimento de Extração de Alcaloide". A análise do extrator, assumindo um teor de água de cerca de 5% na palha seca, é reportada na Tabela II, em que o valor apresentado é a percentagem em peso de palha seca.

Tabela II

	NORMAM (M ₂)	CONTROLO	CULTURA TÍPICA
morfina, %	zero	1,79	1,44*
codeína, %	zero	0,37	0,10*
oripavina, %	0,43	0,02	0,03*
tebaína, %	1,60	0,26	0,15*
Total, %	2,03	2,44	1,72*

Os valores da Tabela II são a média de duas amostras, com a exceção daqueles marcados com o asterisco (*), os quais são estimativas grosseiras. O valor reportado "cultura típica", é uma amostra a partir da colheita da Tasmânia de 1995.

Utilizando as sementes obtidas a partir de Norman, como descrito acima, foi plantada uma geração M3 Norman, auto-fertilizada, colhida e testada juntamente com uma planta de controlo da variedade tebaína alta como também descrito. A análise do extrator, assumindo um teor de água de cerca de 5% na palha seca, é reportado na Tabela III, em que o valor apresentado é a percentagem em peso da palha seca.

Tabela III

	NORMAM (M ₃)	CONTROLO
morfina, %	zero	2,23
codeína, %	0,05	0,41
oripavina, %	0,74	0,07
Tebaína, %	1,68	0,30
Total, %	2,47	3,01

Os valores da Tabela III são a média de duas amostras.

Processo de Extração de Alcaloide

Todas as amostras foram analisadas num sistema de HPLC de gradiente possuindo uma coluna C18 Altima da Alltech de 5

micrómetros, 4,6 vezes, 250 nm, com um volume de injeção de 5 microlitros, operando a 284 nm e a uma temperatura de 40 °C. Para todos os cálculos:

Asa = Área de Amostra

C = Concentração do Padrão

Ast = Área do Padrão

LOD = Perda por secagem

1. Extração ácida (por análise de tebaína, codeína, oripavina)

Na extração ácida, 0,100 g de cápsula moída foi misturada com 5 mL de uma solução de ácido acético a 10%, 10% de água e 80% de metanol. Isto foi agitado durante 20 minutos, e seguidamente filtrada. O filtrado foi diretamente injetado no HPLC.

Cálculo:

$$\% \text{ de Alcaloide (base seca)} = \frac{\text{peso alcaloide analisado}}{\text{peso seco da amostra}} * 100$$

$$\text{Peso Alcaloide Analisado} = \frac{\text{Asa}}{\text{Ast}} * \text{C} * \left(\frac{5 + \text{LOD} * 0,1}{100/1000} \right)$$

$$\begin{aligned} \text{Assumindo 5\% de LOD, isto torna-se} \\ = \frac{\text{Asa}}{\text{Ast}} * \text{C} * 0,005005 \end{aligned}$$

$$\text{Peso da amostra} = 0,100 \left(\frac{100 - \text{LOD}}{100} \right)$$

$$\begin{aligned} \text{Assumindo 5\% de LOD, isto torna-se} \\ = 0,095 \end{aligned}$$

Assim,

$$\begin{aligned} \% \text{ de Alcaloide (DWB)} &= (Asa / Ast * C * 0,005005 / 0,095 * \\ &100 = Asa / Ast * C * 5,268 \end{aligned}$$

2. Extração com Cal (para análise de morfina)

Na extração com cal, 0,100 g de cápsula moída foi misturada com 0,020 g de cal e 10 mL de água. Esta foi agitada durante 20 minutos, e seguidamente filtrada. 4 mL do filtrado são transferidos para um balão volumétrico de 5 mL e perfaz-se o volume com solução de ácido oxálico a 20%. Esta foi seguidamente filtrada e o filtrado injetado diretamente no HPLC.

Cálculo

$$\begin{aligned} \% \text{ de Alcaloide (base seca)} &= \text{peso alcaloide analisado} / \\ &\text{peso seco da amostra} * 100 \\ \text{Peso Alcaloide Analisado} &= Asa / Ast * C * 5/4 ((10 + LOD * \\ &0,1/100/1000)) \\ \text{Assumindo 5\% de LOD, isto torna-se} \\ &= Asa / Ast * c * 0,0125 \\ \\ \text{Peso da amostra} &= 0,100 ((100 - LOD) / 100) \\ \text{Assumindo 5\% de LOD, isto torna-se} \\ &= 0,095 \end{aligned}$$

Assim,

$$\begin{aligned} \% \text{ de Alcaloide (DWB)} &= (Asa / Ast * C * 0,0125 / 0,095 * 100 \\ &= Asa / Ast * C * 13,157 \end{aligned}$$

Lisboa, 3 de fevereiro de 2017

REIVINDICAÇÕES

1. Uma planta de papoula de *Papaver somniferum* que possui uma peculiaridade tal que no momento da colheita das suas cápsulas de papoula da referida planta origina uma palha de papoula que possui tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste em morfina, codeína, tebaína e oripavina, não existindo morfina ou codeína na combinação alcaloide, sendo a referida planta obtenível por um método que compreende os passos de:
 - a) cultivar plantas de *P. somniferum* a partir de sementes de ATCC 97652,
 - b) reproduzir as referidas plantas, mantendo a peculiaridade.

2. Um método para a produção de palha de papoula de *Papaver somniferum* possuindo rendimento de tebaína e / ou oripavina aumentado que compreende os passos de:
 - a) produzir uma planta de *Papaver somniferum* de acordo com a reivindicação 1,
 - b) colher cápsulas de papoula da planta *Papaver somniferum* para produzir uma palha que contém tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina, não existindo morfina ou a codeína na combinação alcaloide.

3. Um método de acordo com a reivindicação 2, que compreende adicionalmente o passo de

- sujeitar a referida palha a um processo para a concentração dos seus alcaloides, para produzir um concentrado de palha de papoula que possui tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina, não existindo morfina ou codeína na combinação alcaloide.

4. Um método para a produção de ópio da *Papaver somniferum* possuindo rendimento de tebaína e/ou oripavina aumentados que compreende os passos de:
 - a) produzir uma planta de *Papaver somniferum* de acordo com a reivindicação 1,
 - b) recolher e secar o látex das cápsulas de papoula imatura de plantas de *Papaver somniferum* para produzir ópio que contém tebaína e oripavina que constitui 100% em peso da combinação de alcaloides que consiste de morfina, codeína, tebaína e oripavina, não existindo morfina ou codeína na combinação de alcaloide.

5. Um método para a produção de tebaína e/ou oripavina que compreende os passos de:
 - a) produzir uma palha de papoula, em conformidade com o método da reivindicação 2 ou ópio em conformidade com o método da reivindicação 4 e
 - b) extrair quimicamente a tebaína e / ou a oripavina da palha ou do ópio, respetivamente.

6. Um método para a produção de um 14-hidroximorfinano farmacologicamente útil, o referido método compreende a produção de tebaína e/ou oripavina pelo método da reivindicação 5, e conversão química da referida

tebaína e / ou oripavina no 14-hidroxiomorfinano desejado.

7. Um método de acordo com a reivindicação 6, em que o referido 14-hidroxiomorfinano é selecionado a partir do grupo que consiste de oxicodona, naloxona, naltrexona, nalbufina, nalmefina e buprenorfina.
8. Uso de uma planta de papoula de *Papaver somniferum* de acordo com a reivindicação 1 para a produção de tebaína e / ou oripavina.

Lisboa, 3 de fevereiro de 2017

FIG. 1

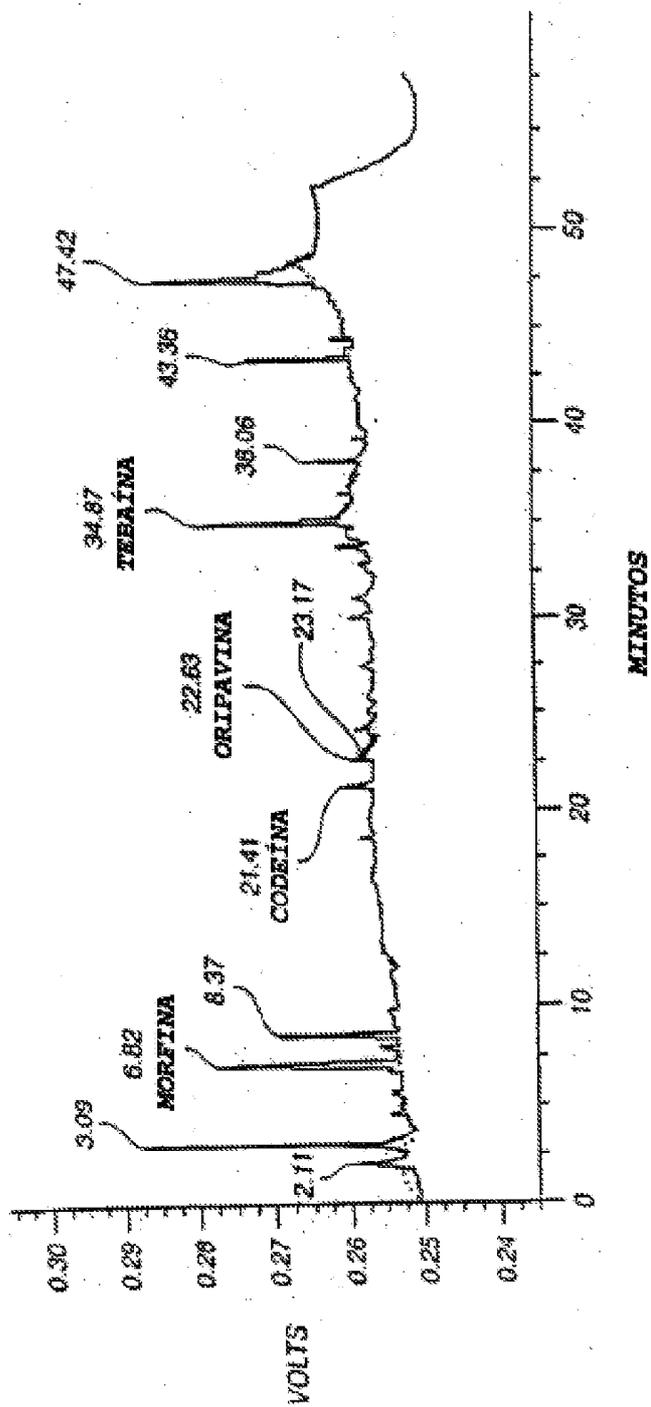


FIG. 2

