29 T
27

Clarke, Modet & Co.
Colombia

E.MAIL: clarkemo@colomsat.net.co
SANTAFE DE BOGOTA, A.A. 92397

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00000788 00026031 Folios: 67
Fecha (AMD): 2000-04-07 17:04:29
Tramite : 282 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2320 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SEÑORES
DIVISION DE SIGNOS DISTINTIVOS
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

COD:08

Ref.: SOLICITUD DE PATENTE EN COLOMBIA
SOLICITUD Nº 00000788
FECHA SOLICITUD: 7 de Enero de 2000

PATENTE: AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PACLITAXEL Y OTROS TAXANOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN DE PREPARACIÓN INDUSTRIAL EN UNA COLUMNA DE RESINA POLIMERICA

SOLICITANTE: JIAN LIU

ASUNTO: CONTESTACION AUTO PRIMER EXAMEN DE FORMA

DILIA RODRIGUEZ D´ALEMAN, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante en el asunto antes mencionado, atentamente me refiero a las observaciones hechas por el Examinador, según Auto número 003 concepto técnico número 319 expedido con respecto a la solicitud antes mencionada.

OPORTUNIDAD

El auto que con el presente escrito se atiende fue notificado por anotación en estado del 2 de marzo del año 2000 por lo que en la fecha estamos dentro de la oportunidad procesal para atender el requerimiento.

DOCUMENTOS

1. En el referido auto se anota la ausencia de documento de poder del solicitante. Atendiendo este requerimiento allegamos adjunto al presente escrito documento de poder debidamente suscrito por el solicitante, persona natural, con toda la cadena de legalización requerida hasta el Ministerio de Relaciones Exteriores y traducción oficial avalada hasta por ese Ministerio.

2. Igualmente se anota la ausencia de la copia certificada del documento de prioridad junto con su traducción simple. Al efecto allego copia certificada del documento de prioridad de la solicitud de patente 09/226,192 del 7 de enero de 1999 procedente de Estados Unidos de América, junto con su traducción simple.

3. Atendiendo las observaciones técnicas y conforme adelante se explica en detalle también se allega junto con este escrito:

Clarke, Modet & Co.
Colombia
E.MAIL: clarkemo@colomsat.net.co
SANTAFE DE BOGOTA, A.A. 92397

a- Nuevo texto de la descripción y nuevo capítulo de reivindicaciones que solicitamos se acepten como sustitutivas de los originalmente presentados.
b- Arte final en las dimensiones y papel requeridos.
c- El documento de poder antes anunciado.
d- El documento de prioridad como antes se explica.

ACLARACIONES TÉCNICAS

Unidades en el Sistema Internacional de Unidades. El examinador observa que las unidades, tanto en la descripción como en las reivindicaciones, deben ser expresadas según el Sistema Internacional de Unidades.

Para atender la observación anterior, presento con este escrito, nuevo texto tanto de la descripción como de las reivindicaciones, en el cual las unidades se expresan en conformidad con la Norma 1000 ICONTEC, que adopta el Sistema Internacional de Unidades.

Atentamente, pido que se tenga en cuenta el texto, tanto de la descripción como del capítulo reivindicatorio, que ahora presento, como sustitutivo de los respectivos capítulos originalmente presentados con la solicitud. El texto que ahora presento, tiene en cuenta la expresión de las unidades en el sistema de unidades requerido.

En las reivindicaciones 2 y 11. Respecto a las reivindicaciones 2 y 11 el Examinador manifiesta que ellas se refieren a la etapa de eliminar impurezas de lignita y flavonoide, pero no se indica con qué material y como se hace la eliminación.

Respecto a la observación anterior, se hace notar que la reivindicación 2 es, en primer lugar, dependiente de la reivindicación 1. Y, en segundo lugar que la reivindicación 15, que es de manera similar dependiente de la reivindicación 1, se expresa que "dicho solvente orgánico comprende una mezcla de acetona y hexano". Se comprenderá consecuentemente, que en la primera etapa, la de eliminar impurezas de lignita o flavonoide, como se expresa igualmente tanto en la reivindicación 2 como en la reivindicación 11, se utiliza, en dicha primera etapa del método, para aislar y purificar análogos de taxano, un solvente orgánico que comprende una mezcla de acetona y hexano.

En conclusión, en la etapa de eliminar impurezas de lignita y flavonoide, de que tratan las reivindicaciones 2 y 11, se utiliza una mezcla solvente orgánica que comprende acetona y hexano.

En cuanto a la manera en que se lleva a cabo tal eliminación, esta se basa en la capacidad de compuestos orgánicos para ser absorbidos sobre una superficie sólida varía ampliamente tanto con la estructura del compuesto como con la naturaleza de la superficie. Como consecuencia, las diferencias en tendencias de absorción se utilizan para separar compuestos. La técnica usual de operación se conoce como cromatografía que es una técnica usual, standard, suficientemente entendida por los expertos en la materia.

Ambigüedad en la reivindicación 10. El Examinador indica que la reivindicación 10 define la presión de manera ambigua porque utiliza términos como "baja presión", sin indicar la referencia respecto a la cual la presión es baja.

Clarke, Modet & Co.
E-MAIL: clarkemo@colomsat.net.co
SANTAFÉ DE BOGOTA, A.A. 92397
COLOMBIA

31 25
29

Para atender a la observación anterior, la reivindicación 10 se modifica para expresar en la misma la presión provista en la columna, en conformidad con la descripción.

Significado del término Celite 545 en la reivindicaciones 7 y 14. Con el término comercial "Celite" se conoce en la industria, desde hace largo tiempo, un material granular, o en forma de píldoras, que varía de color desde blanco, blanco grisáceo o rosado. Este material se origina de sílice diatomácea y tiene la siguiente composición: SiO_2 92,7%; Al_2O_3 3,8%; Fe_2O_3 1,4%; Calcio y magnesio 1%, y sosa 0.9%. La variedad conocida como "Celite 545" es un material absorbente, altamente poroso, que se utiliza en operaciones de purificación y en química analítica. Se ha utilizado para clarificar materiales, como aceites, y como soporte de catalizadores.

Observación relativa a la reivindicación 25. Puesto que la presente solicitud de patente sólo contiene 20 reivindicaciones, esta observación, relativa a una reivindicación 25, no es de ninguna manera aplicable a este caso.

Habiendo atendido a cabalidad las observaciones hechas respecto a la presente solicitud de patente, atentamente pido que se continúe su tramitación.

Señor Jefe,

DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN
GMS/srr
P- 290

32-4
30

AISLACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PACLITAXEL Y OTROS TAXANOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN DE PREPARACIÓN INDUSTRIAL EN UNA COLUMNA DE RESINA POLIMÉRICA.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una técnica de separación y más particularmente, la presente invención se refiere a técnicas para separar paclitaxel y otros taxanos relacionados.

ARTE PREVIO

El paclitaxel es una droga quimioterapéutica bien conocida para el tratamiento de varios cánceres metastásicos. Ha sido probado por la FDA (Food and Drug Administration) y la HPB (Hematologic Product Branch) para el tratamiento de cánceres de ovario y de mama.

El componente es un producto natural, extraído primariamente de la corteza del árbol de tejo del Pacífico, Taxus brevifolia, y también es encontrado en T. Baccata, T. Walichiana, T. Yunnanensis y T. Canadensis.

La concentración del paclitaxel en varias materias primas es típicamente baja, por ejemplo en el orden de entre 0,0004 y 0,01% (p/p) en la corteza del tejo del Pacífico. Dicha baja concentración hace que la extracción y la purificación del componente a un grado farmacéutico a partir de la materia prima sean un gran desafío y, hasta ahora, que no sean

5
2331

prácticas a escala comercial. Se han desarrollado varias técnicas de cromatografía de columna de baja y alta presión, para purificar el paclitaxel a partir de un extracto crudo de materia prima.

El éxito de la cromatografía de baja presión depende en gran medida de la naturaleza de la columna. Con el uso de gel de sílice y trióxido de alúmina se asocian varios problemas, todos los cuales son soportes clásicos de la fase estacionaria en los sistemas de partición. Ellos forman una fase estacionaria estable con la mayoría de los sistemas solventes, pero es un gran absorbente y puede participar en el proceso de separación hasta el punto que sean afectados el comportamiento cromatográfico y la recuperación de muestras.

Los métodos cromatográficos han sido desarrollados para detectar y aislar el paclitaxel de varias especies de Taxus en fases analítica y de preparación. Estos procesos de aislación son conducidos principalmente en una pequeña escala de laboratorio y adolecen de baja selectividad, y alto costo de recuperación y de producción, presentando en consecuencia una seria e insatisfecha necesidad para un método económicamente practicable para la separación del valorable compuesto anti-tumoroso paclitaxel, como así también de otros taxanos cercanamente relacionados, de su análogo cercano cefalomanina.

34 32

Los métodos del arte previo revelan el uso de varios tipos de técnicas cromatográficas para separar paclitaxel y otros taxanos relacionados, incluyendo cromatografía de fase normal y de fase inversa en una columna de gel de sílice o de gel de sílice cohesionado. Los métodos del arte previo terminan con un bajo rendimiento, a un alto costo de producción, o involucran pasos de separación múltiple que dificultan su aplicación a una escala de alta producción industrial.

La patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5.620.875, concedida el 15 de abril de 1997 a Hoffman y otros, es característica del arte previo. El documento enseña la separación del paclitaxel y otros taxanos por extracciones de hexano de pasos múltiples y cromatografía líquida de alto performance (HPLC). El proceso es complejo, de mano de obra intensiva y sólo proporciona moderados rendimientos de los compuestos deseados.

En la patente de los Estados Unidos No. 5.670.673, concedida el 23 de septiembre de 1997 a Rao, se delinea la aislación y la purificación del Taxol y sus análogos. El proceso incluye el uso de cromatografía líquida de fase inversa en un adsorbente con elución de los análogos adsorbidos. Aunque es un proceso meritorio, existen limitaciones con esta técnica en términos de productividad y de pureza de los componentes obtenidos.

La presente invención provee un método de separación simple basado en una columna de resina polimérica que está exenta de las limitaciones de la metodología existente.

OBJETOS DE LA INVENCIÓN

Es, en consecuencia, un objeto de esta invención proveer un método simple y de costo más efectivo para una aislación y purificación económica de los taxanos importantes, tales como el 13-acetil-9-dihidrobaccatin III, 10-deacetilobaccatin III, baccatin III, cefalomanina y paclitaxel.

Los métodos convencionales para la aislación de taxanos, incluyendo el paclitaxel, 13-acetil-9-dihidrobaccatin III y baccatin III, generalmente comprenden los pasos de extractar taxanos de las materias primas con un solvente alcohólico, desgrasar el extracto y separar y purificar el taxano individual por cromatografía.

Un objeto de la presente invención es proveer un método de aislar y purificar análogos de taxano fuerte que contiene taxanos, comprendiendo los pasos de:

extractar una fuente de taxanos en un extractante orgánico;

impregnar un medio absorbente de producto con el extractante y cargar el medio en una columna, conteniendo dicha columna un agente absorbente;

86
39

eluir, en un primer paso, con una sola mezcla de solvente orgánico a una presión de entre 68,94 y 137,88 kPa para generar fracciones conteniendo compuestos de taxano;

cristalizar las fracciones para proveer un compuesto de taxano sólido y un licor madre; concentrar el licor madre; y

eluir, en un segundo paso, con una mezcla de solvente polar el licor madre a través de una resina polimérica para proveer por lo menos un segundo compuesto de taxano.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método de aislar y purificar taxanos a partir de una fuente que contiene taxanos, comprendiendo:

proveer una fuente de taxanos;

extractar los taxanos de la fuente a un medio de extracción orgánico para proveer una capa orgánica que contenga compuestos de taxano;

tratar una materia de soporte con la capa orgánica;

proveer una columna de baja presión conteniendo un agente absorbente;

eluir, en un primer paso, un solvente orgánico a través de la columna para eluir fracciones de taxano purificado;

cristalizar las fracciones para proveer un primer análogo de taxano y un licor madre;

37
35

eluir, en un segundo paso, el licor madre a través de una resina polimérica en una columna cromatográfica para purificar y eluir por lo menos un segundo análogo de taxano y un tercer análogo de taxano; y

recoger análogos de taxano separados.

Es también un objeto adicional de la presente invención proveer un método de aislar y purificar taxanos a partir de una fuente que contenga taxanos, comprendiendo:

proveer una fuente de taxanos;

extractar los taxanos de la fuente a un medio de extracción orgánico para proveer una capa orgánica que contenga compuestos de taxano;

tratar una materia de soporte con la capa orgánica;

proveer una columna de baja presión conteniendo un agente absorbente;

eluir, en un primer paso, a una presión de entre 68,94 y 137,88 kPa un solvente orgánico a través de la columna para eluir fracciones de taxano purificado y remover impurezas de flavonoide y lignano;

cristalizar las fracciones de taxano para proveer un primer análogo de taxano y un licor madre;

eluir, en un segundo paso, a una presión de 206,82 kPa, el licor madre a través de una resina DVD poliestireno en una columna cromatográfica para purificar y eluir por lo menos un segundo análogo de taxano y un tercer análogo de taxano;

+D
38
36

eluir, en un tercer paso, el segundo análogo de taxano y el tercer análogo de taxano a través de una columna de gel de sílice de fase normal para purificar el segundo análogo de taxano y el tercer análogo de taxano; y

recoger análogos de taxano separados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MATERIALIZACIONES PREFERIDAS

La fuente inicial de taxanos fue el material de planta Taxus canadensis, que es abundante en el Este de Canadá. Se utilizaron las ramillas y espinas del Taxus canadensis, o una mezcla de ellas. El material puede ser natural o deshidratado.

La materia prima fue puesta en el piso y extractada con metanol a 60°C durante cinco horas y filtrada. El extracto de metanol fue mezclado con carbón de leña y dejado a temperatura ambiente durante una hora. Éste, entonces, fue filtrado. El filtrado fue concentrado a aproximadamente 15% del volumen original por evaporación. Una mezcla de agua diclorometano 1:1 (v/v) se agregó al concentrado para obtener una porción reducida de paclitaxel (capa orgánica).

La capa orgánica fue concentrada a un volumen reducido e impregnada en un material de soporte, en este caso, el material de soporte es Celite 545.

El material impregnado fue cargado en la parte superior de una columna de preparación industrial, por ejemplo una columna 150 mm x 1500 mm y llenada con un agente absorbente Al_2O_3. La columna fue eluida con una mezcla de hexano:acetona (comienzo 100:0 fin a 45:55) bajo una presión

entre 68,94 y 137,88 kPa. Las fracciones conteniendo taxanos fueron recogidas y analizadas por cromatografía de capa delgada (TLC) y subsecuentemente combinadas de acuerdo a los resultados TLC.

Las fracciones recolectadas fueron entonces concentradas bajo vacío, el material resultante fue disuelto en metanol y mantenido a temperatura ambiente durante la noche. El cristal formado fue filtrado y lavado con metanol, luego recristalizado a partir de acetona. Se obtuvo 13-acetil-9-dihidrocarbattin III como cristal blanco.

El licor madre fue concentrado hasta la sequedad y el residuo fue disuelto en acetona. La solución de acetona fue mezclada con una resina polimérica (Dowex™, poliestireno -DVB). La mezcla fue evaporada en vacío para remover la acetona. El polvo resultante fue sometido a cromatografía de baja presión. La columna cromatográfica de escala industrial (150 mm x 1500 mm) fue rellenada con resina Dowex™ y eluida con acetona:agua (45:55 v/v) a una tasa de flujo de 150 ml/min bajo una presión operativa de 206,82 kPa. Las fracciones aproximadamente 2L cada una fueron recogidas y éstas fueron monitoreadas por TLC y HPLC. Las fracciones que contenían baccatin III y 10-deacetilobacattin III fueron combinadas y evaporadas bajo vacío para remover substancialmente todo del solvente orgánico, luego diluidas con agua y extraídas con CH_2Cl_2. El extracto fue entonces concentrado hasta sequedad y el residuo resultante fue luego disuelto en EtOAc y purificado por columna de gel de sílice de fase normal con hexano:

EtOAc como sistema solvente (comienzo 5:5 fin a 35:65). El baccatin III y el 10-deacetilobaccatin III fueron finalmente obtenidos como polvo blanco con una pureza de más de 98%.

Las fracciones que contenían paclitaxel y cefalomanina fueron combinadas y evaporadas en vacío para remover substancialmente toda la acetona, luego particionarlas entre agua y CH_2Cl_2. La capa orgánica fue separada y evaporada hasta sequedad bajo vacío. El residuo fue disuelto en metanol. A la solución fue agregada aproximadamente 30% (p/v) de agua y la mezcla fue calentada a 60°C durante cinco minutos, y luego mantenida a temperatura ambiente durante la noche. El sólido cristalino crudo de la solución de metanol fue extraído por filtración y secado bajo vacío entre 70°C y 75°C. El sólido fue analizado por HPLC. Consistió aproximadamente en 70% de paclitaxel, 25% de cefalomanina y algunos otros taxanos.

El paclitaxel crudo puede ser procesado de acuerdo a uno de tres procedimientos alternativos. En una primera posibilidad, fue disuelto en acetona y purificado por cromatografía de columna de fase inversa. La columna fue llenada con resina polimérica (resina Diaion, HP2MG) y eluida con acetonitrilo:agua (45:55). El paclitaxel fue obtenido como cristal blanco con una pureza mayor a 99%. La cefalomanina fue obtenida como un polvo blanco a una pureza mayor que el 98%.

Alternativamente, como una segunda aproximación de procesamiento, la purificación de paclitaxel y cefalomanina fue llevada a cabo a través de un proceso de reacción química y luego purificado por cromatografía de columna de fase reversa de gel de sílice aglutinado. La mezcla de paclitaxel crudo y cefalomanina fue disuelta en CH_2Cl_2 o $CHCl_3$ (1:10 p/v), y reaccionado con equivalente 10 de bromo en un frasco redondo puesto en un baño de hielo (entre 0°C y 5°C) durante aproximadamente 40 minutos. La mezcla resultante de paclitaxel y 2",3"-bromocefalomanina fue rápidamente separado por una columna cromatográfica de fase inversa (C_{18} o fenilo), eluyendo solvente CH_3CN:H_2O (45:55). El paclitaxel fue obtenido como cristal blanco en una pureza superior a 99%. La 2",3"-bromocefalomanina fue obtenida como una mezcla de diasterómeros, que fueron reaccionados con zinc activado en ácido acético a temperatura ambiente, y luego purificado por cromatografía de columna de chispa. Para obtener cefalomanina pura que tiene una pureza superior a 95%.

En una tercera alternativa, el paclitaxel y la bromocefalomanina fueron purificados a través de una columna de gel de sílice de fase normal. Los sistemas solventes de elución pueden comprender hexano: EtOAc (comienzo 6:4 fin a 4:6), o CH_2Cl_2:Me_2CO (comienzo 8:2 fin a 65:35) o CH_2Cl_2: EtOAc (comienzo 75:25 fin a 6:4). A partir de este método, se obtuvo paclitaxel como cristal blanco con una pureza por encima del 99%, con cefalomanina en una cantidad de menos de 0,2%.

Habiendo discutido la invención, se hará ahora referencia más precisa a ella por medio de los ejemplos.

EJEMPLO 1

Aproximadamente 200 kilogramos de espinas y ramillas deshidratadas de Taxus canadensis extractadas con 1.000 litros de metanol a 60°C en un extractor multi-funcional industrial durante 5 horas y luego filtrados. Las materias primas fueron extractadas con 700 litros de metanol a una temperatura de entre 55°C y 60°C durante cuatro horas y filtradas. El filtrado fue combinado y mezclado con 10 kilogramos de carbón activado (5% p/p) y mantenido a temperatura ambiente durante una hora, luego filtrado y el carbón activado fue extraído. El filtrado fue luego concentrado a aproximadamente 100 litros en vacío, luego fueron agregados 300 litros de agua:diclorometano (1:1). La capa orgánica fue recogida y la solución acuosa fue extractada dos veces más con 200 litros de diclorometano. La solución de diclorometano fue combinada y evaporada en vacío hasta convertirse en una forma pastosa, y luego disuelta con 20 litros de acetona.

La solución de acetona fue impregnada a 20 kilogramos de Celite 545. El material impregnado fue secado en aire y cargado en el extremo superior de tres columnas cromatográficas industriales de baja presión (dimensión: 150 x 15 cm). Cada columna fue llenada con 15 kilogramos de absorbente de óxido de alúmina (Al_2O_3). Deberá considerarse que la dimensión exacta de las columnas no es crucial en tanto que las mismas sean suficientemente

grandes como para contener la cantidad de Al_2O_3 requerida para la separación. El uso de óxido de alúmina es efectivo para absorber flavonoides y lignanos las que son co-extractadas del material fuente. Estas son también dificultades a resolver y resultan un problema para la pureza final del producto paclitaxel.

Las columnas fueron eluidas con el sistema solvente hexano:acetona (comienzo 100:0 fin en 45:55) bajo una presión entre 68,94 a 133,41 kPa con una tasa de flujo de aproximadamente 150 ml/min.

Las fracciones conteniendo taxanos fueron recolectadas y combinadas conforme a resultados de cromatografía de capa fina (TLC), y fueron luego concentradas bajo presión para eliminar todos los solventes. El material resultantes fue disuelto en metanol y mantenido a temperatura ambiente durante la noche para producir cristales tipo agujas. Los cristales fueron filtrados y recristalizados de la acetona para producir adicionalmente cristales tipo aguja identificados como 13-acetil-9-dihidrobacattin III; teniendo una pureza de más de 96% (148 gramos) (0,074% basado en la materia prima).

El líquido madre de la cristalización de 13-acetil-9-dihidrobacattin fue concentrado hasta la sequedad bajo vacío. El residuo fue disuelto en tres litros de acetona. La solución de acetona fue mezclada con 1,5 kilogramos de una resina copolímera, poliestireno-divinilbenzeno. La mezcla fue

evaporada para eliminar el solvente y el polvo resultante fue cargado en la parte superior de una columna cromatográfica industrial de baja presión llena de resina copolímera poliestireno-divinilbenzeno, y eluido con 45% de acetona en agua a una tasa de flujo de 150 ml/min bajo una presión de operación por debajo de 206,82 kPa. Fracciones de 2L cada una fueron recogidas y monitoreadas por TLC y HPLC.

Las fracciones que contenían paclitaxel y cefalomanina fueron recombinadas y evaporadas en vacío para eliminar la mayor parte de la acetona, luego diluidas con agua desionizada y extractadas tres veces con 2,5 litros de diclorometano. La capa orgánica fue concentrada hasta la sequedad bajo vacío; el residuo fue disuelto en un litro de metanol.

A la solución de metanol, fue agregada aproximadamente 30% (p/v) de agua y la mezcla fue calentada a 60°C durante unos minutos y luego mantenida a temperatura ambiente durante la noche. El sólido cristalino crudo de la solución de metanol fue extraído por filtrado y secado en un horno de vacío a una temperatura de entre 70°C y 75°C. El sólido consistió en aproximadamente 70% de paclitaxel y 25% de cefalomanina en un producto de 31 gramos.

El paclitaxel crudo (30 g) fue disuelto en 200 ml de acetonitrilo y diluido con 250 ml de agua desionizada y bombeado a la parte superior de la columna cromatográfica de baja presión (tamaño: 10 x 150 cm) la que fue

llenada con una resina polímera (Diaion, resina de polimetacrilato de macroporos). Luego de que la muestra fuera bombeada, la columna fue eluida con un gradiente de fase de 35, 40, 45, y 50% de acetonitrilo en agua. El cambio de solvente fue indicado por los resultados de TLC y HPLC de las fracciones.

Las fracciones de aproximadamente IL cada una fueron recogidas y monitoreadas por análisis de TLC y HPLC. La tasa de flujo fue de 75 ml/min. Las fracciones de columna que contenían paclitaxel o cefalomanina fueron recombinadas individualmente. Se permitió que las dos soluciones combinadas fueran mantenidas a una temperatura de aproximadamente 5ºC hasta que fuera completada la cristalización de los compuestos.

Los cristales fueron filtrados separadamente y amabas soluciones fueron recristalizadas a partir de metanol en agua a 65ºC.

El paclitaxel fue obtenido como cristales blancos tipo aguja con una pureza superior al 99% y un producto de 18,5 g (0,009%).

La cefalomanina fue obtenida como agujas blancas con una pureza de más de 98% y un producto de 6,5 g (0,003%).

Las fracciones que contenían baccatin III y 10-deacetilbaccatin III de los pasos anteriores fueron combinadas y evaporadas bajo vacío para

eliminar substancialmente acetona, luego particionadas entre tres litros de agua y diclorometano (1:1 v/v). La capa orgánica fue concentrada hasta la sequedad y el residuo estuvo sujeto a cromatografía de fase normal. La columna usada tenía una dimensión de 10,16 cm x 121,92 cm, fue rellenada de gel de sílice (200-300 malla). El solvente de elución fue un gradiente de fase de hexano:etilacetato (comienzo 50:50, fin a 35:65). Las fracciones de aproximadamente 1.000 ml cada una fueron recolectadas y monitoreadas por TLC.

Las fracciones conteniendo baccatin III o 10-deactilbaccatin III fueron recogidas separadamente y combinadas de acuerdo a los resultados TLC, y luego concentradas hasta la sequedad.

La parte de baccatin III fue disuelta en 200 ml de metanol y mantenida en un refirgerador durante la noche. Los cristales blancos formados fueron obtenidos por filtración y recristalizados a partir de metanol para producir baccatin III como cristales blancos en un producto de 7,5 g (0,003%).

El 10-deacetilbaccatin III crudo fue disuelto en 150 ml de acetona y luego diluido con 150 ml de hexano. La mezcla fue mantenida a temperatura ambiente durante la noche. Los cristales blancos formados fueron filtrados y recristalizados del mismo solvente para producir 10-deacetilbaccatin III como cristales blancos. El producto fue 15 gr (0,007%).

47 · 19
45

EJEMPLO 2

Usando aparatos similares y la metodología como la utilizada en el Ejemplo 1, fue obtenido paclitaxel crudo. El paclitaxel crudo fue disuelto en 300 ml de diclorometano, el cual fue agregado a un frasco de fondo redondo de tres cuellos de 1.000 ml. El frasco fue repuesto en un baño de hielo y la solución agitada con un agitador magnético. Cuando la temperatura alcanzó aproximadamente 5ºC, una solución de bromo (10 equivalentes) en diclorometano (1:1 v/v) fue agregada lentamente con agitación. El ratio de cefalomanina a bromo fue de 1 a 10 moles.

El brominado fue monitoreado por análisis TLC entre cinco y diez minutos. LA mezcla de la reacción fue entonces diluida con 300 ml de diclorometano y transferido a un embudo separatorio después de que la reacción fuera completada (el tiempo de realización requirió entre 40 y 50 minutos). A la mezcla de reacción se le agregaron 350 ml de 10% de tiosulfato de sodio acuoso ($Na_2S_2O_3$) para absorber cualquier exceso de bromo. La capa de diclorometano fue separada y lavada con agua y salmuera, y luego, concentrada hasta la sequedad bajo vacío. Se obtuvo un polvo marrón claro.

EJEMPLO 3

La materia cruda (10 g) del Ejemplo 2 fue disuelta en 120 ml de acetonitrilo el cual fue diluido con 150 ml de agua desionizada. La solución

fue bombeada a la parte superior de una columna cromatográfica de fase inversa (5 x 100 cm) llena de C18 gel de sílice aglutinado.

La columna fue eluída con acetonitrilo:agua (45:55) bajo una presión de operación de entre 206,82 y 275,76 kPa. La tasa de flujo fue de 30 ml/min. Las fracciones fueron recogidas (250 ml cada una), monitoreadas por TLC y combinadas.

Cada porción conteniendo paclitaxel fue refrigerada durante la noche; los cristales formados fueron filtrados y recristalizados de metanol 70%. El paclitaxel fue obtenido como cristales blancos de tipo aguja teniendo una pureza superior a 99% en un producto de 6:1 g.

Las fracciones conteniendo 2",3"-bromocefalomanina fueron combinadas, particionadas entre agua y diclorometano. La capa orgánica fue recogida y evaporada hasta la sequedad bajo vacío. El residuo fue disuelto en 150 ml de metanol, el cual fue diluido con 50 ml de agua para obtener cristales tipo aguja. Los cristales no blancos fueron recristalizados de metanol:agua para producir 2",3"-bromocefalomanina como cristales blancos.

Dos gramos de 2",3"-bromocefalomanina fueron disueltos en 30 ml de AcOH y fue agregado zinc recientemente activado (2g). La mezcla fue agitada durante tres horas a temperatura ambiente y la reacción fue

monitoreada por TLC. Después que el análisis mostrara que la reacción fue completada, la mezcla se particionó entre diclorometano y 10% $NaHCO_3$ (300 ml, 2:1). La capa orgánica fue lavada con agua y concentrada hasta la deshidratación. El producto crudo fue purificado por cromatografía de chispa para dar cefalomanina como polvo blanco.

EJEMPLO 4

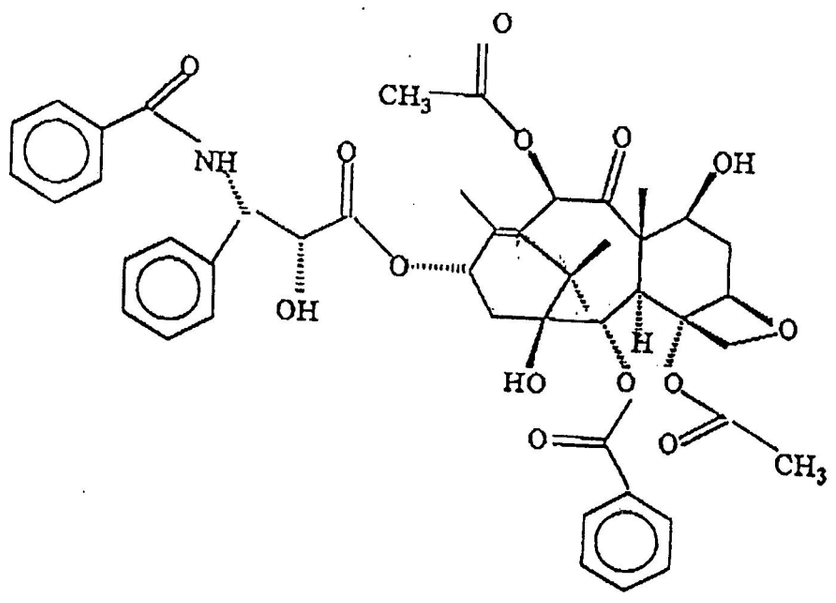
El material crudo (10 g) del Ejemplo 2 fue disuelto en 120 ml de diclorometano. La capa orgánica fue concentrada hasta la sequedad y el residuo fue sometido a cromatografía de fase normal. La dimensión de la columna usada fue de 10,16 cm x 121,92 cm; la columna estaba llena de gel de sílice (entre 200 y 300 malla). El solvente de elución fue un gradiente de fase de diclorometano:acetato de etilo (comienzo 75:25 fin a 6.4); para la separación de paclitaxel y 2",3"-bromocefalomanina también puede ser usado un sistema de solventes de hexano,acetato de etilo (comienzo 6:4 fin a 4:6) y diclorometano:acetona (comienzo 8:2 fin a 65:35). Fueron recogidas las fracciones de aproximadamente 500 ml cada una, y monitoreadas por TLC.

Las fracciones que contenían paclitaxel y 2",3"-bromocefalomanina fueron separadamente recogidas y combinadas conforme a los resultados de TLC, luego concentradas hasta la sequedad.

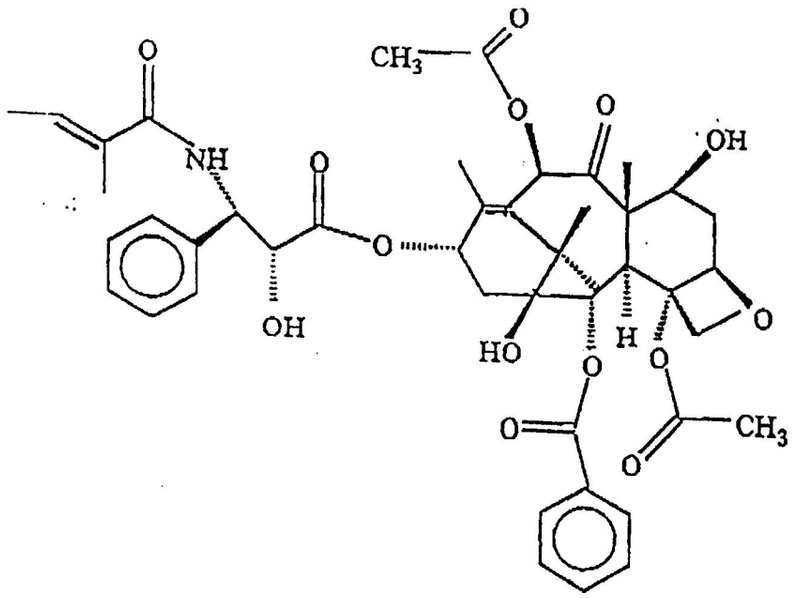
La parte de paclitaxel fue disuelta en 100 ml de metanol y diluida con 35 ml de agua, luego se mantuvo refrigerada. Los cristales blancos formados fueron filtrados y recristalizados a partir de metanol:agua para producir paclitaxel (5,5 g) como cristales blancos.

La 2",3"-bromocefalomanina crudo fue disuelta en 50 ml de acetona y luego diluido con 50 ml de hexano. La mezcla fue mantenida a temperatura ambiente durante la noche. Los cristales blancos formados fueron filtrados y recristalizados desde el mismo solvente para producir 2",3"-bromocefalomanina como cristales blancos.

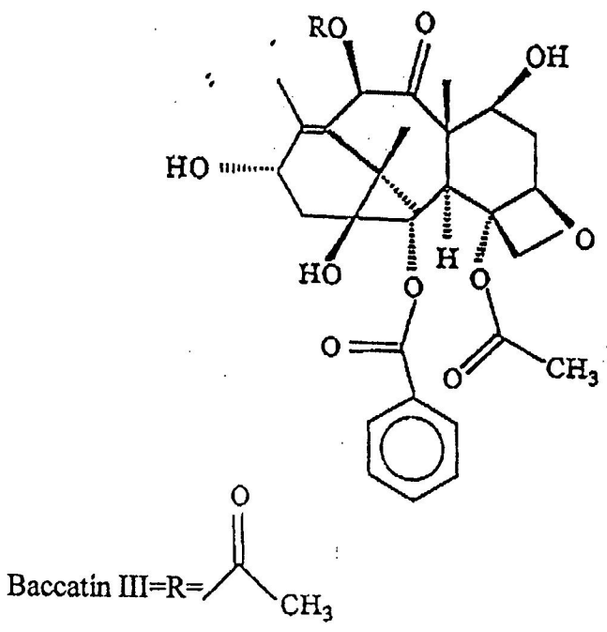
Los siguientes ejemplos ilustran los componentes en forma estructural.



Paclitaxel

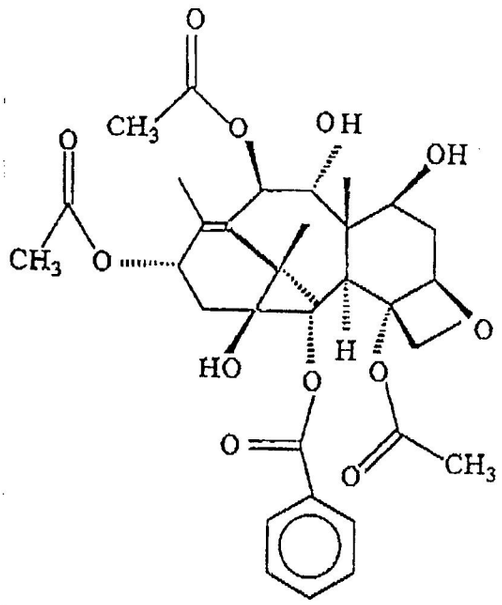


Cefalomanina



Baccatin III=R=

10-deacetilbaccatin IV= R = H



Aunque las realizaciones de la invención han sido descriptas más arriba, no está limitada a ellas y será evidente para aquellos experimentados en el arte que numerosas modificaciones forman parte de la presente invención siempre que ellas no se aparten del espíritu, naturaleza y alcance de la invención reivindicada y descripta.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para aislar y purificar análogos a partir de una fuente que contiene taxanos comprendiendo los pasos de:

extractar una fuente de taxanos en un extractante orgánico;

impregnar un medio absorbente de producto con el extractante y cargar el medio en una columna, conteniendo dicha columna un agente absorbente;

eluir, en un primer paso, con una sola mezcla de solvente orgánico a una presión de entre 68,94 y 137,88 kPa para generar fracciones conteniendo compuestos de taxano;

cristalizar las fracciones para proveer un compuesto de taxano sólido y un licor madre; concentrar el licor madre; y

eluir, en un segundo paso, con una mezcla de solvente polar el licor madre a través de una resina polimérica para proveer por lo menos un segundo compuesto de taxano.

2. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, incluyendo adicionalmente el paso de eliminar impurezas de lignano y flavonoide en dicha primera etapa.

3. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicha fuente de dichos taxanos consiste en una fuente de planta.

54
52

4. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 3, en donde dicha fuente de planta está seleccionada de un miembro del grupo que comprende Taxus brevifolia, Taxus Baccata, Taxus Walichiana, Taxus Yunnanensis y Taxus Canadensis.

5. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 3, en donde dichos taxanos incluyen por lo menos 13-acetil-9-dihidrobaccatin III, deacetilbaccatin III, baccatin III, cefalomanina, paclitaxel.

6. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho extractante orgánico comprende diclorometano.

7. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho medio absorbente de producto comprende Celite 545.

8. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho agente absorbente comprende óxido de aluminio.

9. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicha mezcla de solvente orgánico de la primera etapa comprende hexano y acetona.

10. Un método de aislar y purificar taxanos a partir de una fuente que contiene taxano, el cual comprende:

55-
53

proveer una fuente de taxanos;

extraer dichos taxanos de dicha fuente en un medio de extracción orgánico para proveer una capa orgánica que contenga compuestos de taxano;

tratar una materia de soporte con la capa orgánica;

proveer una columna de presión comprendida entre 68,94 y 137,88 kPa, que contiene un agente absorbente;

eluir, en un primer paso, un solvente orgánico a través de la columna para eluir fracciones de taxano purificado;

cristalizar dichas fracciones para proveer un primer análogo de taxano y un licor madre;

eluir, en un segunda etapa, dicho licor madre a través de una resina polimérica en una columna cromatográfica para purificar y eluir por lo menos un segundo análogo de taxano y un tercer análogo de taxano; y

recoger análogos de taxano separados.

11. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 10, incluyendo la etapa para eliminar impurezas de lignita y flavonoide en dicha primera etapa.

12. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 10, incluyendo adicionalmente la etapa de moler dicha fuente de taxanos y extraer con metanol.

13. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 12, incluyendo adicionalmente la etapa de mezclar extracto con carbón de leña, filtrar y evaporar para formar un concentrado.

14. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 13, en donde dicho material de soporte consiste en Celite 545.

15. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho solvente orgánico comprende una mezcla de acetona y hexano.

16. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 15, ebn donde dicho solvente orgánico es pasado por dicha columna a una presión de entre 68,94 y 137,88 kPa.

17. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, incluyendo adicionalmente el paso de recoger y analizar dichas fracciones de taxano por cormatografía de capa fina.

18. Un método de aislación y purificación de taxanos a partir de una fuente que contiene taxanos, comprendiendo:

proveer una fuente de taxanos;

extractar los referidos taxanos de dicha fuente a un medio de extracción orgánico para proveer una capa orgánica que contenga compuestos de taxano;

57 24
55

tratar una materia de soporte con la capa orgánica;

proveer una columna de baja presión conteniendo un agente absorbente;

eluir, en un primer paso, a una presión de entre 68,94 y 137,88 kPa un solvente orgánico a través de dicha columna para eluir fracciones de taxano purificado y remover impurezas de flavonoide y lignano;

cristalizar las fracciones de taxano para proveer un primer análogo de taxano y un licor madre;

eluir, en una segunda etapa, a una presión de 206,82 kPa, el licor madre a través de una resina DVD poliestireno en una columna cromatográfica para purificar y eluir por lo menos un segundo análogo de taxano y un tercer análogo de taxano;

eluir, en una tercera etapa, el segundo análogo de taxano y el tercer análogo de taxano a través de una columna de gel de sílice de fase normal para purificar el segundo análogo de taxano y el tercer análogo de taxano; y

recoger análogos de taxano separados.

19. El método como se ha expuesto en la reivindicación 18, en donde dicho segundo análogo de taxano comprende baccatin III y dicho tercer análogo comprende 10-deacetilbaccatin III.

19. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 18, en donde dichos análogos tienen una pureza de por lo menos 18%.

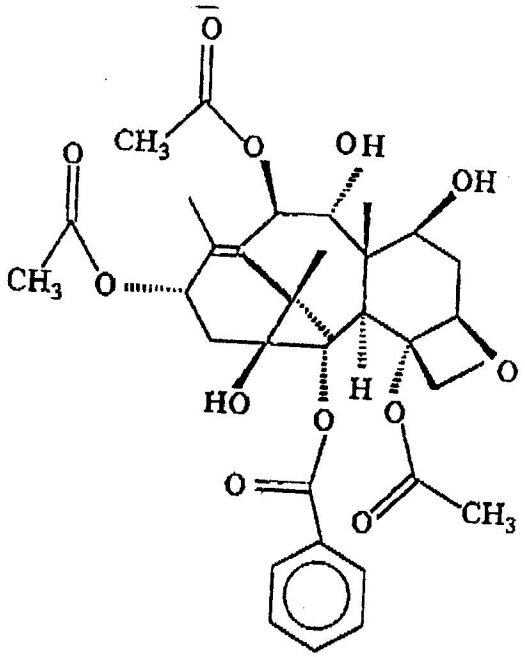
58-30
56

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Un método de alta producción y alta pureza para obtener análogos de taxano a partir de una fuente que contiene taxano. El método emplea una membrana de resina polimérica para separar los análogos a baja presión sin el uso de etapas de separación/purificación costosas actualmente provistas en el aire.

Nota:
los folios 59 y 60;
Los Artes 6x6 cm y 12x12 cm fueron retiradas
para archivar y publicar respectivamente.

Marzo 06/02



PA 201037

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

February 01, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: ***09/226,192***
FILING DATE: ***January 07, 1999***

TRADUCCION OFICIAL
HILDA A. ...
INTERPRETE OFICIAL
DES No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

P. SWAIN
Certifying Officer

35

63
59

Attorney's Docket No. 96199-U.S.

JC549 U.S. PTO
09/226192
01/07/99

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UTILITY PATENT
APPLICATION TRANSMITTAL LETTER

JC408 U.S. PTO
01/07/99

BOX PATENT APPLICATION
Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Transmitted herewith for filing is the utility patent application of Jian Liu for ISOLATION AND PURIFICATION OF PACLITAXEL AND OTHER RELATED TAXANES BY INDUSTRIAL PREPARATIVE LOW PRESSURE CHROMATOGRAPHY ON A POLYMERIC RESIN COLUMN.

Enclosed are:

[ ] 0 sheets of [ ] formal [ ] informal drawing(s).
[ ] A claim for foreign priority under 35 U.S.C. 119/365 in
[ ] a separate document [ ] the declaration.
[ ] A certified copy of the priority document.
[ ] An Associate Power of Attorney.
[X] 2 verified statement(s) of small entity status.

The declaration of the inventor(s) [X] is enclosed [ ] will follow:

The fee has been calculated as follows:

A.	Basic Application Fee			$ 760.00
B.	Total Claims 20 minus 20 = -	x $ 22.00	=	$ -
C.	Independent Claims 3 minus 3 = -	x $ 82.00	=	$ -
D.	If multiple dependent claims present, add	$ 270.00	=	$ -
E.	Total Application Fee (Total A, B, C & D)		=	$ 760.00
F.	If verified statement of small entity status is enclosed, fifty percent reduction of Total Application Fee (50% x E)		=	$ 380.00
G.	Application Fee Due (E minus F)		=	$ 380.00
H.	Assignment Recording Fee of $40.00 if assignment document enclosed		=	$ 40.00
I.	TOTAL FEE (G plus H)		=	$ 420.00

[X] Two cheques in the amount of $380.00 and $40.00 are attached.
[ ] Charge $____ to Deposit Account No. 13-1717.

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees under 37 C.F.R. SSI.16, 1.17 and 1.21 which may be required by this paper, or to credit any overpayment, to Deposit Account No. 13-1717. A duplicate copy of this paper is enclosed.

Respectfully submitted,

Paul Sharpe
Marks & Clerk
P.O. Box 957, Station B
Ottawa, Ontario, CANADA K1P 5S7
Telephone: (613) 236-9561

By: _____
PAUL SHARPE, REG. NO. 38,493

64 30
60

ISOLATION AND PURIFICATION OF PACLITAXEL AND OTHER RELATED TAXANES BY INDUSTRIAL PREPARATIVE LOW PRESSURE CHROMATOGRAPHY ON A POLYMERIC RESIN COLUMN

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a separation technique and more particularly, the present invention relates to techniques to separate paclitaxel and related taxanes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Paclitaxel is a well known chemotherapeutic drug for treatment of various metastatic cancers. It has been approved by FDA and HPB for the treatment of ovarian and breast cancers.

The compound is a natural product, primarily extracted from the bark of the Pacific yew tree, Taxus brevifolia, and is also found in T. baccata, T. walichiana, T. yunnanensis and T. canadensis.

The concentration of paclitaxel in various raw materials is typically low, for example, on the order of between 0.0004 and 0.01% (w/w) in the bark of Pacific yew. Such low concentration render the extraction and purification of the compound to pharmaceutical grade from raw materials very challenging, and heretofore impractical on a commercial scale. Various normal phase chromatography and reverse phase chromatography as well as low and high pressure column chromatography techniques have been developed to purify paclitaxel from a crude extract of raw material.

The success of low pressure chromatography greatly depends on the nature of the column. Various problems are associated with the use of silica gel and alumina trioxide, all of which are classical supports of the stationary phase in partition systems. They form a stable stationary phase with most solvent systems, but it is a strong absorbent and may participate in the separation process to the extent that chromatographic behaviour and recovery of samples are affected.

Chromatographic methods have been developed to detect and isolate paclitaxel from various Taxus species on analytical and preparative basis. These isolation processes are mainly conducted on a small laboratory scale and suffer from low selectivity, recovery and

high production cost, thereby presenting a serious and unfulfilled need for an economically practicable method for separating the valuable anti-tumor compound paclitaxel from its close analog cephalomanine as well as other closely related taxanes.

Prior art methods disclose the use of various types of chromatographic techniques to separate paclitaxel and related taxanes, including normal phase and reverse phase chromatography on a silica gel or bonded silica gel column. The prior art methods are end up at low yield, high production cost or involved multiple separation steps which were difficult to scale up to large industrial scale production.

Characteristic of the prior art is United States Patent No. 5,620,875, issued April 15,1997, to Hoffman et al. The document teaches the separation of paclitaxel and other taxanes by multiple step hexane extractions and high performance liquid chromatography (HPLC). The process is involved, labor intensive and only provides moderate yields of the desired compounds.

In United States Patent No. 5,670,673, issued September 23,1997, to Rao, the isolation and purification of Taxol and its analogues is delineated. The process includes the use of reverse phase liquid chromatography on a C18 adsorbent with elution of the adsorbed analogues. Although a meritorious procedure, limitations exist with this technique in terms of productivity and purity of compounds obtained.

The present invention provides a simple separation method based on a polymeric resin column which is devoid the limitations of the existing methodology.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is therefore an object of this invention to provide a simple and more cost effective method for economical isolation and purification of the important taxanes, such as 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, 10-deacetylbaccatin III, baccatin III, cephalomanine and paclitaxel.

Conventional methods for the isolation of taxanes, including paclitaxel, 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III and baccatin III generally comprise the steps of extracting taxanes from raw materials with an alcoholic solvent, defatting the extract, and separating and purifying the individual taxane by chromatography.

One object of the present invention is to provide a method of isolating and purifying taxane analogues from a source containing taxanes, comprising:

extracting a source of taxanes in an organic extractant;

coating a work absorbent medium with the extractant and loading the medium in a column, the column containing an absorbent agent;

eluting, in a first step, with an organic solvent mixture at a pressure of between 10 and 20 psi to generate fractions containing taxane compounds;

crystallizing the fractions to provide a solid taxane compound and a mother liquor; concentrating the mother liquor; and

eluting, in a second step, with a polar solvent mixture the mother liquor through a polymeric resin to provide at least a second taxane compound.

A further object of the present invention is to provide a method of isolating and purifying taxanes from a source containing taxanes, comprising:

providing a source of taxanes;

extracting the taxanes from the source into an organic extraction medium to provide an organic layer containing taxane compounds;

treating a support material with the organic layer;

providing a low pressure column containing an absorbent agent;

eluting, in a first step, an organic solvent through the column to elute purified taxane fractions;

crystallizing the taxane fractions to provide a first taxane analogue and a mother liquor;

eluting, in a second step, the mother liquor through a polymeric resin in a chromatographic column to purify and elute at least a second taxane analogue and a third taxane analogue; and

collecting separated taxane analogues.

A still further object of the present invention is to provide a method of isolating and purifying taxanes from a source containing taxanes, comprising:

providing a source of taxanes;

extracting the taxanes from the source into an organic extraction medium to provide an organic layer containing taxane compounds;

treating a support material with the organic layer;

providing a low pressure column containing an absorbent agent;

eluting, in a first step, at a pressure of between 10 and 20 psi, an organic solvent through the column to elute purified taxane fractions and remove flavonoid and lignan impurities;

crystallizing the taxane fractions to provide a first taxane analogue and a mother liquor;

eluting, in a second step, at a pressure of 30 psi, the mother liquor through a polystyrene DVB resin in a chromatographic column to purify and elute at least a second taxane analogue and a third taxane analogue;

eluting, in a third step, the second taxane analogue and the third taxane analogue through a normal phase silica gel column to purify the second taxane analogue and the third taxane analogue; and

collecting separated taxane analogues.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The initial source of taxanes was the plant material, Taxus canadensis, which is abundant in Eastern Canada. The twigs and needles or mixture thereof from Taxus canadensis were used. The material may be fresh or dried.

The raw material was ground and extracted with methanol at 60°C for five hours and filtered. The methanol extract was mixed with charcoal and left to stand at room temperature for one hour. This was then filtered. The filtrate was concentrated to about 15% of original volume by evaporation. A 1:1 water:dichloromethane mixture (v/v) was added to the concentrate to obtain a paclitaxel enriched portion (organic layer).

The organic layer was concentrated to a reduced volume and coated on a support material, in this case, the supporting material is Celite 545.

The coated material was loaded on to the top of an industrial preparative column, for example, a 150 mm x 1500 mm column and packed with the absorbent agent Al_2O_3. The column was eluted with a mixture of hexane:acetone (start 100:0 end at 45:55) under a pressure of between 10 psi and 20 psi. The fractions containing taxanes were collected and analyzed by thin layer chromatography (TLC) and subsequently combined according TLC results.

The fractions collected were then concentrated under vacuum, the resulting material was dissolved in methanol and kept at room temperature overnight. The crystal formed was filtered out and washed with methanol, then recrystallized from acetone. 13-Acetyl-9-dihydrobaccatin III was obtained as white crystal.

The mother liquor was concentrated to dryness and the residue was dissolved in acetone. The acetone solution was mixed with a polymeric resin (Dowex™ resin, polystyrene-DVB). The mixture was evaporated under vacuum to remove acetone. The resulting powder was subjected to low pressure chromatography. The industrial scale (150 mm x 1500 mm) chromatographic column was packed with Dowex™ resin and eluted with acetone:water (45:55, v/v) at a flow rate 150 ml/min under a operating pressure of 30 psi. Fractions of approximately 2L/each were collected and these were monitored by TLC and HPLC. The fractions which contained baccatin III and 10-deacetylbaccatin III were combined and evaporated under vacuum to remove substantially all of the organic solvent, then diluted with water and extracted with CH_2Cl_2. The extract was then concentrated to dryness and the resulting residue was then dissolved in $EtOA_c$ and purified by normal phase silica gel column with hexane:$EtOA_c$ as the solvent system (start 5:5 end at 35:65). The baccatin III and 10-deacetylbaccatin- III was finally obtained as white powder with a purity of greater than 98%.

The fractions which contained paclitaxel and cephalomanine were combined and evaporated under vacuum to remove substantially all of the acetone, then partitioned between water and CH_2Cl_2 The organic layer was separated and evaporated to dryness under vacuum. The residue was dissolved in methanol. To the methanol solution approximately 30% (w/v) of water was added and the mixture was warmed to 60°C for five minutes, then kept in room temperature overnight. The crude crystalline solid from the methanol solution was filtered out and dried under vacuum between 70°C and 75°C. The solid was analyzed by HPLC. It consisted approximately 70% of paclitaxel and 25% of cephalomanine, and some other taxanes.

The crude paclitaxel can be processed according to one of three alternative procedures. In a first possibility, it was dissolved in acetone and purified by reverse phase column chromatography. The column was packed with polymeric resin (Diaion resin, HP2MG) and eluted with acetonitrile:water (45,55). Paclitaxel was obtained as white crystal

with a purity of greater than 99%. Cephalomanine was obtained as a white powder in a purity of greater than 98%.

Alternatively, as a second processing approach, the purification of paclitaxel and cephalomanine was carried out through a chemical reaction process and then purified by bonded silica gel reverse phase column chromatography. The crude paclitaxel, cephalomanine mixture was dissolved in CH_2Cl_2 or $CHCl_3$ (1:10, w/v), and reacted with 10 equivalent of bromine in a round bottom flask that placed in an ice bath (between 0°C and 5°C) for approximately 40 minutes. The resulting mixture of paclitaxel and 2",3"-bromocephalomanine were readily separated by a reverse phase chromatographic column (C_{18} or phenyl), eluting solvent $CH_3CN:H_2O$ (45:55). Paclitaxel was obtained as white crystal in a purity of greater than 99%. 2",3"-bromocephalomanine was obtained as a mixture of diastereomers, which were reacted with activated zinc in acetic acid at room temperature, and then purified by flash column chromatography to obtain pure cephalomanine having a purity of greater than 95%.

In a third alternative, the paclitaxel and bromocephalomanine were purified through normal phase silica gel column. The eluting solvent systems may comprise hexane:$EtOA_c$ (start 6:4 end at 4:6), or CH_2Cl_2:Me_2CO (start 8:2 end at 65:35) or $CHCl_2$:$EtOA_c$ (start 75:25, end 6:4). From this method, paclitaxel was obtained as white crystal with a purity exceeding 99%, with cephalomanine present in an amount of less than 0.2%.

Having discussed the invention, more precise reference will now be made to the invention by way of the examples.

EXAMPLE 1

Approximately 200 kilograms of dried needles and twigs of Taxus canadensis were extracted with 1,000 liters of methanol at 60°C in an industrial multi-functional extractor for five hours and then filtered. The raw materials were extracted with 700 liters of methanol at a temperature of between 55°C and 60°C for another four hours and filtered. The filtrate was combined and mixed with 10 kilograms of activated carbon (5% w/w) and kept at room temperature for one hour, then filtered to remove the activated carbon. The filtrate was then concentrated to approximately 100 liters under vacuum, then 300 liters of water: dichloromethane (1:1) was added. The organic layer was collected and the aqueous

solution was extracted two more times with 200 liters of dichloromethane. The dichloromethane solution was combined and evaporated under vacuum to become a slurry form, then diluted with 20 liters of acetone.

The acetone solution was coated on to 20 kilograms of Celite 545. The coated material was air dried and was then loaded on to the top of three low pressure industrial chromatographic columns (dimension: 150 x 15 cm). Each column was packed with 15 kilograms of alumina oxide (Al_2O_3) absorbent. It will be appreciated that the exact dimension of the columns is not crucial as long as the columns are sufficiently large to hold the amount of Al_2O_3 required for the separation. Use of alumina oxide is effective to absorb flavonoids and lignans which are co-extracted from the source material. These are also difficult to remove and become a problem for the final purity of the product paclitaxel.

The columns were eluted with the solvent system hexane:acetone (start 100:0 end at 45:55) under a pressure between 10 and 15 psi with a flow rate at approximately 150 ml/min.

The fractions containing taxanes were collected and combined according to thin layer chromatography (TLC) results, and were then concentrated under vacuum to remove all solvents. The resulting material was dissolved in methanol and kept at room temperature overnight to yield needle-like crystals. The crystals were filtered and recrystallized from acetone to further yield white needle-like crystals identified as 13-acetyl-9dihydrobaccatin III, having a purity of greater than 96% yield (148 grams) (0.074% based on the raw material).

The mother liquid from the 13-acetyl-9dihydrobaccatin III crystallization was concentrated to dryness under vacuum. The residue was dissolved in three liters of acetone. The acetone solution was mixed with 1.5 kilograms of a polystyrene-divinylbenzene, copolymer resin. The mixture was evaporated to remove the solvent and the resulting powder was loaded on the top of a low pressure industrial chromatographic column packed with polystyrene-divinylbenzene copolymer resin, and eluted with 45% acetone in water at a flow rate of 150 ml/min. under an operating pressure below than 30 psi. Fractions of 2 L/each were collected and these were monitored by TLC and HPLC.

The fractions which contained paclitaxel and cephalomanine were combined and evaporated under vacuum to remove most of the acetone, then diluted with deionized water

and extracted three times with 2.5 liter of dichloromethane. The organic layer was concentrated to dryness under vacuum, the residue was dissolved in one liter of methanol.

To the methanol solution, approximately 30% (v/v) of water was added and the mixture was warmed to 60°C for a few minutes then kept at room temperature overnight. The crude crystalline solid from the methanol solution was filtered out and dried in a vacuum oven at a temperature of between 70°C and 75°C. The solid consisted of approximately 70% paclitaxel and 25% cephalomanine in a yield of 31 grams.

The crude paclitaxel (30 g) was dissolved in 200 ml of acetonitrile and diluted with 250 ml of deionized water and pumped into the top of a low pressure chromatography column (size: 10 x 150 cm) and packed with a polymer resin (Diaion, macroporous polymethacrylate resin). After the sample was pumped, the column was eluted with a step gradient of 35, 40, 45 and 50% acetonitrile in water. The change of solvent was indicated by the results of the TLC and HPLC of the fractions.

Fractions of approximately 1 L/each were collected and monitored by TLC and HPLC analysis. The flow rate was 75 ml/min. The column fractions which contained paclitaxel or cephalomanine were combined individually. The two combined solutions were allowed to stand at a temperature of approximately 5°C until crystallization of the individual compound was completed.

The crystals were filtered separately and both were recrystallized from 65°C methanol in water.

Paclitaxel was obtained as white needle-like crystals with a purity of greater than 99% and a yield of 18.5 g (0.009%).

Cephalomanine was obtained as white needles with a purity of greater than 98% and a yield of 6.5 g (0.003%).

The fractions contained baccatin III and 10-deacetylbaccatin III from the previous step were combined and evaporated under vacuum to remove substantially acetone, then partitioned between three liters of water and dichloromethane (1:1 v/v). The organic layer was concentrated to dryness and the residue was subjected for normal phase

chromatography. The dimension of the column used was 4" x 4', packed with silica gel (200-300 mesh). The eluting solvent was a step gradient of hexane:ethyl acetate (start 50:50 end at 35:65). Fractions of approximately 1,000 ml/each were collected and each was monitored by TLC.

The fractions contained baccatin III or 10-deacetylbaccatin III were separately collected and combined according TLC results, then concentrated to dryness.

The baccatin III part was dissolved in 200 ml of methanol and kept in a refrigerator overnight. The white crystals formed were filtered out and recrystallized from methanol to yield baccatin III as white crystals in a yield of 7.5 g (0.003%).

The crude 10-deacetylbaccatin III was dissolved in 150 ml acetone and then diluted with 150 ml of hexane. The mixture was kept at room temperature overnight. The white crystals formed were filtered and recrystallized from same solvent to yield 10-deacetylbaccatin III as white crystals. The yield was 15 g (0.007%).

EXAMPLE 2

Using similar apparatus and methodology as used in Example 1, crude paclitaxel was obtained. The crude paclitaxel was dissolved in 300 ml of dichloromethane which was added to a 1,000 ml three neck round bottom flask. The flask was replaced in an ice-bath and the solution stirred with a magnetic stirrer. When the temperature reached approximately 5°C, a solution of bromine (10 equivalents) in dichloromethane (1:1 v/v) was added slowly with stirring. The cephalomanine to bromine ratio was 1 to 10 moles.

The brominating was monitored by TLC analysis between five and 10 minutes. The reaction mixture was then diluted with 300 ml of dichloromethane and transferred to a separatory funnel after the reaction was completed (completion time required between 40 and 50 minutes). To the reaction mixture, 350 ml of 10% aqueous sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) was added to absorb any excess bromine. The dichloromethane layer was separated and washed with water and brine, and then concentrated to dryness under vacuum. A light brown powder was obtained.

EXAMPLE 3

The crude material (10 g) from Example 2 was dissolved in 120 ml of acetonitrile which was diluted with 150 ml of deionized water. The solution was pumped into the top of a reverse phase chromatography column (5 x 100 cm) packed with C_{18} bonded silica gel.

The column was eluted with acetonitrile:water (45:55) under an operating pressure of between 30 and 40 psi. The flow rate was 30 ml/min. The fractions were collected (250 ml/each), monitored by TLC and combined.

The portion containing paclitaxel was refrigerated overnight; the crystals formed were filtered and recrystallized from 70% methanol. Paclitaxel was obtained as white needle-like crystals having a purity of greater than 99% in a yield of 6:1 g.

The fractions containing 2",3"-bromocephalomanine were combined, which partitioned between water and dichloromethane. The organic layer was collected and evaporated to dryness under vacuum. The residue was dissolved in 150 ml of methanol, which was diluted with 50 ml of water to obtain needle-like crystals. The off-white crystal was recrystallized from methanol:water to yield 2",3"-bromocephalomanine as white crystals.

Two grams of 2",3"-bromocephalomanine were dissolved in 30 ml of AcOH and freshly activated zinc (2 g) was added. The mixture was stirred for three hours at room temperature and the reaction was monitored by TLC. After TLC analysis showed the reaction was completed, the mixture was partitioned between dichloromethane and 10% $NaHCO_3$ (300 ml, 2:1). The organic layer was washed with water and concentrated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography to give cephalomanine as white powder.

EXAMPLE 4

The crude material (10 g) from Example 2 was dissolved in 120 ml of dichloromethane. The organic layer was concentrated to dryness and the residue was subjected for normal phase chromatography. The dimension of the column used was 4" x 4' packed with silica gel (between 200 and 300 mesh). The eluting solvent was a step gradient

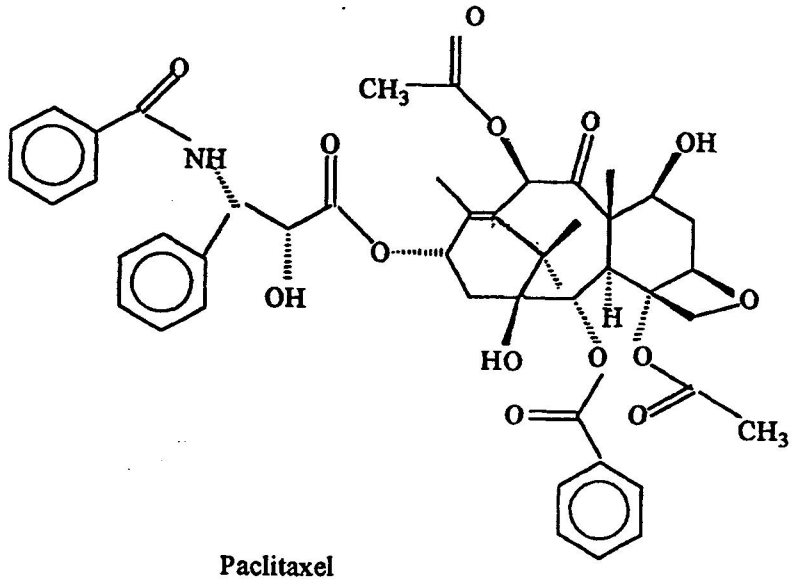
of dichloromethane:ethyl acetate (start 75:25 end at 6:4), for the separation of paclitaxel and 2",3"-bromocephalomanine the solvents system of hexane:ethyl acetate (start 6:4 end at 4:6) and dichloromethane:acetone (start 8:2 end at 65:35) also can be used. Fractions of approximately 500 ml/each were collected, and each was monitored by TLC.

The fractions contained paclitaxel and 2",3"-bromocephalomanine were separately collected and combined according TLC results, then concentrated to dryness.

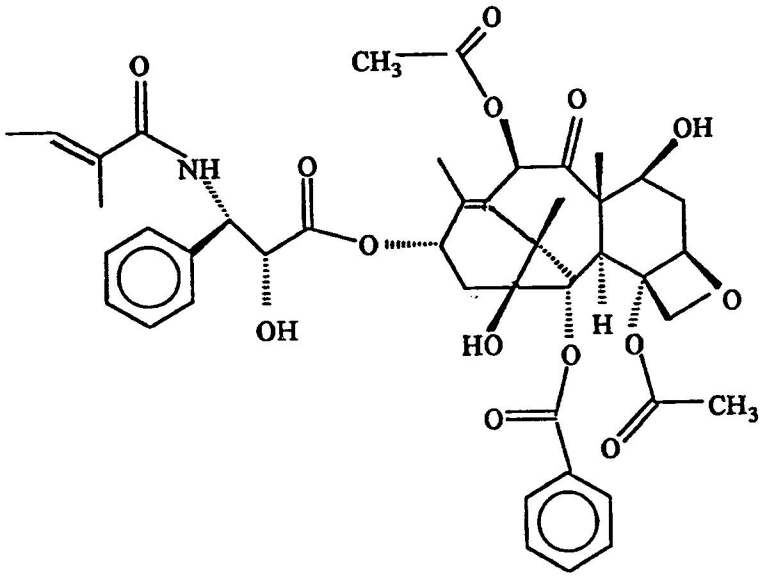
The paclitaxel part was dissolved in 100 ml of methanol and diluted with 35 ml of water, then kept refrigerated. The white crystals formed were filtered and recrystallized from methanol:water to yield paclitaxel (5.5 g) as white crystals .

The crude 2",3"-bromocephalomanine was dissolved in 50 ml acetone and then diluted with 50 ml of hexane. The mixture was kept at room temperature overnight. The white crystals formed were filtered and recrystallized from same solvent to yield 2",3"-bromocephalomanine as white crystals.

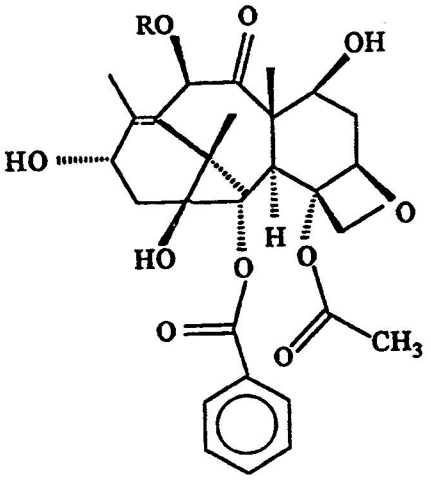
The following examples illustrate the compounds in structural form.

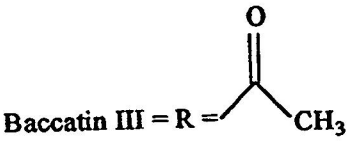


Paclitaxel



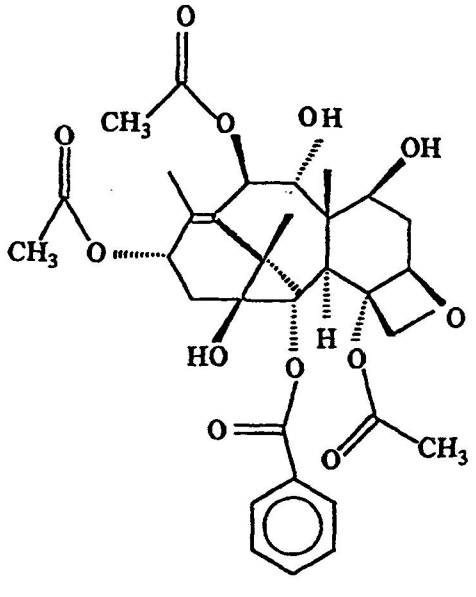
Cephalomanine





Baccatin III = R =

10-deacetylbaccatin IV = R=H



13-acetyl-9-dihydrobaccatin III

Although embodiments of the invention have been described above, it is not limited thereto and it will be apparent to those skilled in the art that numerous modifications form part of the present invention insofar as they do not depart from the spirit, nature and scope of the claimed and described invention.

77 49
73

I CLAIM:

1. A method of isolating and purifying taxane analogues from a source containing taxanes, comprising:

extracting a source of taxanes in an organic extractant;

coating a work absorbent medium with said extractant and loading said medium in a column, said column containing an absorbent agent;

eluting, in a first step, with an organic solvent mixture at a pressure of between 10 and 20 psi to generate fractions containing taxane compounds;

crystallizing said fractions to provide a solid taxane compound and a mother liquor; concentrating said mother liquor; and

eluting, in a second step, with a polar solvent mixture said mother liquor through a polymeric resin to provide at least a second taxane compound.

2. The method as set forth in claim 1, further including the step of removing lignan and flavonoid impurities in said first step.

3. The method as set forth in claim 1, wherein said source of said taxanes comprises a plant source.

4. The method as set forth in claim 3, wherein said plant source is selected from a member of the group comprising Taxus brevifolia, Taxus baccata, Taxus walichiana, Taxus yunnanensis, and Taxus canadensis.

5. The method as set forth in claim 3, wherein said taxanes include at least 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, 10-deacetylbaccatin III, baccatin III, cephalomanine, paclitaxel.

6. The method as set forth in claim 1, wherein said organic extractant comprises dichloromethane.

7. The method as set forth in claim 1, wherein said weak absorbent medium comprises Celite 545.

8. The method as set forth in claim 1, wherein said absorbent agent comprises aluminum oxide.

TRADUCCION OFICIAL 2000/068
BILDA ANTONIETA DE PI
INTERPRETE PUBL
RES No 323 DEL MIN DE

EP 0 253 738 B1

9. The method as set forth in claim 1, wherein said first step organic solvent mixture comprises hexane and acetone.

10. A method of isolating and purifying taxanes from a source containing taxanes, comprising:

providing a source of said taxanes;

extracting said taxanes from said source into an organic extraction medium to provide an organic layer containing taxane compounds;

treating a support material with said organic layer;

providing a low pressure column containing an absorbent agent;

eluting, in a first step, an organic solvent through said column to elute purified taxane fractions;

crystallizing said taxane fractions to provide a first taxane analogue and a mother liquor;

eluting, in a second step, said mother liquor through a polymeric resin in a chromatographic column to purify and elute at least a second taxane analogue and a third taxane analogue; and

collecting separated taxane analogues.

11. The method as set forth in claim 10, further including the step of removing lignan and flavonoid impurities in said first step.

12. The method as set forth in claim 10, further including the step of grinding said source of taxanes and extracting with methanol.

13. The method as set forth in claim 12, further including the step of mixing extract with charcoal, filtering and evaporating to form a concentrate.

14. The method as set forth in claim 13, wherein said support material comprises Celite 545.

15. The method as set forth in claim 1, wherein said organic solvent comprises a mixture of acetone and hexane.

16. The method as set forth in claim 15, wherein said organic solvent is passed through said column at a pressure of between 10 and 20 psi.

2000/068
TRADUCCION
INTERPRETE
RES No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

17. The method as set forth in claim 1, further including the step of collecting and analyzing said taxane fractions by thin layer chromatography.

18. A method of isolating and purifying taxanes from a source containing taxanes, comprising:

providing a source of said taxanes;

extracting said taxanes from said source into an organic extraction medium to provide an organic layer containing taxane compounds;

treating a support material with said organic layer;

providing a low pressure column containing an absorbent agent;

eluting, in a first step, at a pressure of between 10 and 20 psi, an organic solvent through said column to elute purified taxane fractions and remove flavonoid and lignan impurities;

crystallizing said taxane fractions to provide a first taxane analogue and a mother liquor;

eluting, in a second step, at a pressure of 30 psi, said mother liquor through a polystyrene DVB resin in a chromatographic column to purify and elute at least a second taxane analogue and a third taxane analogue;

eluting, in a third step, said second taxane analogue and said third taxane analogue through a normal phase silica gel column to purify said second taxane analogue and said third taxane analogue; and

collecting separated taxane analogues.

19. The method as set forth in claim 18, wherein said second taxane analogue comprises baccatin III and said third taxane analogue comprises 10-deacetylbaccatin III.

20. The method as set forth in claim 18, wherein said analogues have a purity of at least 98%.

2000/068
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Nº DE SOLICITUD
FECHA DE PRESENTACIÓN
FECHA DE PRIORIDAD

80--87
76

09625.2250.CLOS

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

A high yield and high purity method for obtaining taxane analogues from a source containing taxanes. The method employs a polymeric resin membrane for separating the analogues under low pressure without the use of complex and expensive separation/ purification steps currently provided in the art.

81-53
77

COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY FOR UTILITY PATENT APPLICATION	Attorney Docket No. 96199-U.S.

As a below named inventor, I hereby declare that:
My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name;
I BELIEVE I AM THE ORIGINAL, FIRST AND SOLE INVENTOR (if only one name is listed below) OR AN ORIGINAL, FIRST AND JOINT INVENTOR (if more than one name is listed below) OF THE SUBJECT MATTER WHICH IS CLAIMED AND FOR WHICH A PATENT IS SOUGHT ON THE INVENTION

ENTITLED:

ISOLATION AND PURIFICATION OF PACLITAXEL AND OTHER RELATED TAXANES BY INDUSTRIAL PREPARATIVE LOW PRESSURE CHROMATOGRAPHY ON A POLYMERIC RESIN COLUMN

the specification of which:

(check one) [X] is attached hereto:

[ ] was filed on _____ as

Application Serial No. _____

and was amended on _____ (if applicable)

I HAVE REVIEWED AND UNDERSTAND THE CONTENTS OF THE ABOVE-IDENTIFIED SPECIFICATION, INCLUDING THE CLAIMS, AS AMENDED BY ANY AMENDMENT REFERRED TO ABOVE:

I ACKNOWLEDGE THE DUTY TO DISCLOSE INFORMATION WHICH IS MATERIAL TO THE EXAMINATION OF THIS APPLICATION IN ACCORDANCE WITH TITLE 37, CODE OF FEDERAL REGULATIONS, Sec. 1.56 (a) which states: "A patent by its very nature is affected with a public interest. The public interest is best served, and the most effective patent examination occurs when, at the time an application is being examined, the Office is aware of and evaluates the teachings of all information material to patentability. Each individual associated with the filing and prosecution of a patent application has a duty of candor and good faith in dealing with the Office, which includes a duty to disclose to the Office all information known to that individual to be material to patentability as defined in this section. The duty to disclose information exists with respect to each pending claim until the claim is cancelled or withdrawn from consideration, or the application becomes abandoned. Information material to the patentability of a claim that is cancelled or withdrawn from consideration need not be submitted if the information is not material to the patentability of any claim remaining under consideration in the application. There is no duty to submit information which is not material to the patentability of any existing claim. The duty to disclose all information known to be material to patentability is deemed to be satisfied if all information known to be material to patentability of any claim issued in a patent was cited by the Office or submitted to the Office in the manner prescribed by §1.97(b)-(d) and 1.98. However, no patent will be granted on an application in connection with which fraud on the Office was practised or attempted or the duty of disclosure was violated through bad faith or intentional misconduct. The Office encourages applicants to carefully examine: (1) prior art cited in search reports of a foreign patent office in a counterpart application, and (2) the closest information over which individuals associated with the filing or prosecution of a patent application believe any pending claim patentably defines, to make sure that any material information contained therein is disclosed to the Office."

I do not know and do not believe the said invention was ever known or used in the United States of America before my or our invention thereof, or patented or described in any printed publication in any country before my or our invention thereof, or more than one year prior to said application; that said invention was not in public use or on sale in the United States of America more than one year prior to said application; that said invention has not been patented or made the subject of an inventor's certificate issued before the date of said application in any country foreign to the United States of America on any application filed by me or my legal representatives or assigns more than twelve months prior to said application.

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code Sec. 119 and/or Sec. 365 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate as indicated below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate on this invention having a filing date before that of the application for patent or inventor's certificate on this invention having a filing date before that of the application on which priority is claimed:

82-24
78

COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY		Attorney Docket No. 96199-U.S.	
COUNTRY/INTERNATIONAL	APPLICATION NUMBER	DATE OF FILING (day, month, year)	PRIORITY CLAIMED
			YES__ NO__
			YES__ NO__

I hereby appoint the following attorneys and agent(s) to prosecute said application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith and to file, prosecute and to transact all business in connection with international applications directed to said invention:

PAUL SHARPE, REGN. NO. 39,493
RICHARD MITCHELL, REG. NO. 34,519
GEORGE MACGREGOR, REG. NO. 37,547

Address all correspondence to: Paul Sharpe
Marks & Clerk
P.O. Box 957, Station B
Ottawa, Ontario, K1P 5S7 Canada

Address all telephone calls to: Paul Sharpe - 613-236-9561

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements were made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

FULL NAME OF SOLE OR FIRST INVENTOR	SIGNATURE	DATE
Jian Liu	Liujian	01/05/99

RESIDENCE	CITIZENSHIP
Fredericton, New Brunswick, CANADA	CANADIAN

POST OFFICE ADDRESS
470 Cherry Avenue, Fredericton, New Brunswick E3A 5N9 Canada

FULL NAME OF SECOND JOINT INVENTOR, IF ANY	SIGNATURE	DATE

RESIDENCE	CITIZENSHIP

POST OFFICE ADDRESS

FULL NAME OF THIRD JOINT INVENTOR, IF ANY	SIGNATURE	DATE

RESIDENCE	CITIZENSHIP

POST OFFICE ADDRESS

55
83
79

VERIFIED STATEMENT CLAIMING SMALL ENTITY STATUS (37 CFR 1.9(f) & 1.27(c))-SMALL BUSINESS CONCERN	Attorney Docket No. 96199-U.S.

Applicant or Patentee: JIAN LIU

Serial or Patent No.:

Filed or Issued:

Title. ISOLATION AND PURIFICATION OF PACLITAXEL AND OTHER RELATED TAXANES BY INDUSTRIAL PREPARATIVE LOW PRESSURE CHROMATOGRAPHY ON A POLYMERIC RESIN COLUMN

I hereby declare that I am

[X] the owner of the small business concern identified below:
[ ] an official of the small business concern empowered to act on behalf of the concern identified below:

NAME OF SMALL BUSINESS CONCERN 508037 (NB) INC.

ADDRESS OF SMALL BUSINESS CONCERN 470 Cherry Avenue

Fredericton, NB E3A 5N9

I hereby declare that the above identified small business concern qualifies as a small business concern as defined in 13 CFR 121.12, and reproduced in 37 CFR 1.9(d), for purposes of paying reduced fees to the United States Patent and Trademark Office, in that the number of employees of the concern, including those of its affiliates, does not exceed 500 persons. For purposes of this statement, (1) the number of employees of the business concern is the average over the previous fiscal year of the concern of the persons employed on a full-time, part-time or temporary basis during each of the pay periods of the fiscal year, and (2) concerns are affiliates of each other when either, directly or indirectly, one concern controls or has the power to control the other, or a third party or parties controls or has the power to control both.

I hereby declare that rights under contract or law have been conveyed to and remain with the small business concern identified above with regard to the invention, described in:

[X] the specification filed herewith with title as listed above.
[ ] the application identified above.
[ ] the patent identified above.

If the rights held by the above identified small business concern are not exclusive, each individual, concern or organization having rights in the invention must file separate verified statements averring to their status as small entities and no rights to the invention are held by any person, other than the inventor, who would not qualify as an independent inventor under 37 CFR 1.9(c) if that person made the invention, or by any concern which would not qualify as a small business concern under 37 CFR 1.9(d), or a nonprofit organization under 37 CFR 1.9(e).

Each person, concern or organization having any rights in the invention is listed below:

[X] No such person, concern, or organization exists.
[ ] Each such person, concern, or organization is listed below.

Separate verified statements are required from each named person, concern or organization having rights to the invention averring to their status as small entities. (37 CFR 1.27)

I acknowledge the duty to file, in this application or patent, notification of any change in status resulting in loss of entitlement to small entity status prior to paying, or at the time of paying, the earliest of the issue fee or any maintenance fee due after the date on which status as a small entity is no longer appropriate. (37 CFR 1.28 (b))

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application, any patent issuing thereon, or any patent to which this verified statement is directed.

NAME OF PERSON SIGNING Dr. Jian Liu

TITLE OF PERSON IF OTHER THAN OWNER President

ADDRESS OF PERSON SIGNING 470 Cherry Avenue, Fredericton, New Brunswick Canada E3A 5N9

SIGNATURE Jian DATE Jan. 5, 1999

Expedited Procedure

84 80

VERIFIED STATEMENT CLAIMING SMALL ENTITY STATUS (37 CFR 1.9(f) & 1.27(b))-INDEPENDENT INVENTOR	Attorney Docket No. 96199-U.S.

Applicant or Patentee: JIAN LIU

Serial or Patent No.:

Filed or Issued:

Title: ISOLATION AND PURIFICATION OF PACLITAXEL AND OTHER RELATED TAXANES BY INDUSTRIAL PREPARATIVE LOW PRESSURE CHROMATOGRAPHY ON A POLYMERIC RESIN COLUMN

As a below named inventor, I hereby declare that I qualify as an independent inventor as defined in 37 CFR 1.9(c) for purposes of paying reduced fees to the Patent and Trademark Office described in:

[X] the specification filed herewith with title as listed above.
[ ] the application identified above.
[ ] the patent identified above.

I have not assigned, granted, conveyed or licensed and am under no obligation under contract or law to assign, grant, convey or license, any rights in the invention to any person who would not qualify as an independent inventor under 37 CFR 1.9(c) if that person had made the invention or to any concern which would not qualify as a small business concern under 37 CFR 1.9(d) or a nonprofit organization under 37 CFR 1.9(e).

Each person, concern or organization to which I have assigned, granted, conveyed, or licensed or am under an obligation under contract or law to assign, grant, convey, or license any rights in the invention is listed below:

[ ] No such person, concern, or organization exists.
[X] Each such person, concern, or organization is listed below.

508037 (NB) Inc., 470 Cherry Avenue, Fredericton, New Brunswick, Canada E3A 5N9

Separate verified statements are required from each named person, concern or organization having rights to the invention averring to their status as small entities. (37 CFR 1.27)

I acknowledge the duty to file, in this application or patent, notification of any change in status resulting in loss of entitlement to small entity status prior to paying, or at the time of paying, the earliest of the issue fee or any maintenance fee due after the date on which status as a small entity is no longer appropriate. (37 CFR 1.28(b))

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application, any patent issuing thereon, or any patent to which this verified statement is directed.

JIAN LIU		
NAME OF INVENTOR	NAME OF INVENTOR	NAME OF INVENTOR
Jianjian		
Signature of Inventor	Signature of Inventor	Signature of Inventor
Jan. 5, 1999		
Date	Date	Date

Electronic Patent Application

86 85
81

TRADUCCIÓN OFICIAL No.2000/068 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Hilda Aguilera de Piedrahita traductora e intérprete oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y autorizada por el Ministerio de Justicia y del Derecho, por resolución número 323 de 1980.

(Se traducen: un Certificado de Solicitud de Registro de Patente, y el capítulo de Reivindicaciones respectivo de la solicitud 09/226,192)

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODOS A QUIENES ESTOS PRESENTES LLEGAREN:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

Febrero 1 del 2000

POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE ADJUNTA SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS ARCHIVOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA DE AQUELLOS PAPELES DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA ABAJO Y QUE CUMPLIERON CON LOS REQUISITOS PARA QUE SE LES OTORGARA UNA FECHA DE SOLICITUD BAJO EL CÓDIGO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA TÍTULO 35 SECCIÓN 111.

NÚMERO DE SOLICITUD: ***09/226,192***

FECHA DE SOLICITUD: ***Enero 7 del 1999***

TRADUCCION OFICIAL No. 2000/068
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

87 - 54

82

Por autoridad del

COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS

(Firmado.) P. SWAIN

Funcionario que Certifica

(SELLO DE OBLEA DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA)

(Al margen en todas las páginas siguientes: 092261192.010799)

YO REIVINDICO:

1. Un método para aislar y purificar análogos de taxano de una fuente que contiene taxanos, que incluye:

la extracción de una fuente de taxanos en un extractante orgánico;

el recubrimiento de un medio de trabajo absorbente con dicho extractante y la carga de dicho medio en una columna, dicha columna conteniendo un agente absorbente;

eluír, en un primer paso, con una mezcla orgánica solvente a una presión de entre 10 y 20 psi para generar fracciones que contienen compuestos de taxano;

cristalizar dichas fracciones para proveer un compuesto de taxano sólido y un licor madre; concentrando dicho licor madre; y

eluír, en un segundo paso, con una mezcla polar solvente de dicho licor madre mediante una resina polimérica para proveer por lo menos un segundo compuesto de taxano.

2. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, que además incluye el

TRADUCCION OFICIAL No. 2000/088
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
DES No 323 DEL MIN DE JUSTICIA

88-60
83

paso de remover las impurezas lignan y flavonoides en dicho primer paso.

3. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, donde dicha fuente de taxanos incluye una fuente vegetal.

4. El método, tal como se presentó en la reivindicación 3, donde dicha fuente vegetal se selecciona de un miembro del grupo que incluye Taxus brevifolia, Taxus baccata, Taxus walichiana, Taxus yunnanensis, y Taxus canadensis.

5. El método, tal como se presentó en la reivindicación 3, donde dichos taxanos incluyen por lo menos 13-acetilo-9-dihidrobaccatina III, 10-deacetilocaccatina III, baccatina III,cefalomanina, paclitaxel.

6. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, donde dicho extractante orgánico incluye diclorometano.

7. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, donde dicho medio absorbente débil incluye Celita 545.

8. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, donde dicho agente absorbente incluye óxido de Aluminio.

9. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, donde dicha mezcla de solvente orgánico incluye hexano y acetona.

10. Un método para aislar y purificar taxanos de una fuente que contiene taxanos, que incluye:

proveer una fuente de dichos taxanos;

extraer dichos taxanos de dicha fuente dentro de un medio de extracción orgánico para proveer una capa orgánica que contiene compuestos de taxano;

tratar un material de apoyo con dicha capa orgánica;

TRADUCCION OFICIAL No. 2000/068
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES No. 323 DEL MIN. DE JUSTICIA

89 61
84

proveer una columna de baja presión que contiene el agente absorbente;

eluír, en un primer paso, un solvente orgánico a través de dicha columna para eluír fracciones purificadas de taxano;

cristalizar dichas fracciones de taxano para proveer un primer taxano análogo y un licor madre;

eluír en un segundo paso, dicho licor madre mediante una resina polimérica en una columna cromatográfica para purificar y eluír por lo menos un segundo taxano análogo y un tercer taxano análogo; y

reunir taxanos análogos separados.

11. El método, tal como se presentó en la reivindicación 10, además incluyendo el paso de remover impurezas lignan y flavonoides en dicho primer paso.

12. El método, tal como se presentó en la reivindicación 10, además incluyendo el paso de moler dicha fuente de taxanos y extracción con metanol.

13. El método, tal como se presentó en la reivindicación 12, incluyendo el paso de mezclar el extracto con carbón de leña, con filtrado y evaporación para formar un concentrado.

14. El método, tal como se presentó en la reivindicación 13, donde dicho material de apoyo incluye Celita 545.

15. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, donde dicho solvente orgánico incluye una mezcla de acetona y hexano.

16. El método, tal como se presentó en la reivindicación 15, donde dicho solvente orgánico se pasa por dicha columna a una presión entre 10 y 20 psi.

17. El método, tal como se presentó en la reivindicación 1, que además incluye el

INTRODUCCION OFICIAL No. 2000/088
RES. No. 325 DEL ... DE ... DE 1997

paso de reunir y analizar dichas fracciones de taxano por cromatografía de película delgada.

18. Un método para aislar y purificar dichos taxanos de una fuente que contiene taxanos que incluye:

proveer una fuente de dichos taxanos;

extraer dichos taxanos de dicha fuente dentro de un medio de extracción orgánico para proveer una capa orgánica que contiene compuestos de taxano;

tratar un material de apoyo con dicha capa orgánica;

proveer una columna de baja presión que contiene el agente absorbente;

eluír, en un primer paso, a una presión entre 10 y 20 psi, un solvente orgánico a través de dicha columna para eluír fracciones purificadas de taxano y remover impurezas lignan y flavonoides;

cristalizar dichas fracciones de taxano para proveer un primer taxano análogo y un licor madre;

eluír en un segundo paso, a una presión de 30 psi, dicho licor madre a través de una resina de poliestireno DVB en una columna cromatográfica para purificar y eluír por lo menos un segundo taxano análogo y un tercer taxano análogo;

eluír, en un tercer paso, dicho segundo taxano análogo y dicho tercer taxano análogo a través de una columna de fase normal de gel silica para purificar dicho segundo taxano análogo y dicho tercer taxano análogo; y

reunir taxanos análogos separados.

19. El método, tal como se presentó en la reivindicación 18, donde dicho taxano análogo incluye baccatina III y dicho tercer taxano análogo incluye 10-

91-53
86

deacetilobaccatina III.

20. El método, tal como se presentó en la reivindicación 18 donde dichos análogos tienen una pureza de por lo menos 98%.

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Santafé de Bogotá, Abril 3 del 2000.

Hilda Aguilera Sierra
2000/068
TRADUCCION OFICIAL
INTERPRETE OFICIAL

P 290, 91
92
87

TRADUCCIÓN OFICIAL No.2000/067 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Hilda Aguilera de Piedrahita traductora e intérprete oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y autorizada por el Ministerio de Justicia y del Derecho, por resolución número 323 de 1980.

(Se traduce un Certificado Notarial (individuo) de autenticación de firma y su legalización, ambos escritos en inglés adjuntos a un Poder escrito en español e inglés, otorgado por Jian Liu.)

CERTIFICADO NOTARIAL (Individuos)

A los 16 días del mes de Febrero del 2000, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. Jian Liu, (nombre de la persona que firma el poder), mayor de edad y domiciliado en Fredericton, New Brunswick, Canadá, firmó en su presencia el documento que antecede, que conoce personalmente al otorgante y que está legalmente facultado para suscribir el documento.

(Firmado) Katherine Lefeure

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario público.

TRADUCCION OFICIAL No. ... HILDA AGUILERA DE ... INTERPRETE O...

Esta copia coincide con el original que me fue a la vista. Santa fé de Bogotá
07 ABR 2000
ACUSTIN... NOTARIA CUARENTA Y UNO

65
93
88

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia de: 1) la existencia legal de la sociedad, 2) que cumple actualmente con su objeto social, y 3) que la persona o personas que otorgan este poder están facultadas para hacerlo. El Cónsul también certificará que los tuvo a la vista los documentos que prueban y acreditan tales circunstancias.

(Sello a Tinta del Ministro Encargado de Relaciones Exteriores del Canadá, certificando la firma del Notario que antecede).

En español, certificado por el Consulado de Colombia en Ottawa No. 50 de fecha 14 de Marzo del 2000. Pagado el impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de US$ 22.00.

Legalización de la firma del Cónsul por el Jefe de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores, No.139042 del 23 de Marzo del 2000.

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Santafé de Bogotá, 3 de Abril del 2000.

TRADUCCION OFICIAL No. 2000/067
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES No. 323 DEL MIN DE JUSTICIA

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.
2000 APR -4 A 8:57
NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL CONTENIDO DEL DOCUMENTO DESEMPEÑA FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
039893

Copia coincide con el original que tuve a la vista en Santa fe de Bogotá
07 ABR 2000

P 290 94
89

Clarke, Modet & Co. Colombia Ltda.

PROPIEDAD INDUSTRIAL y DERECHOS DE AUTOR
Apartado Aereo 92397
Santafe de Bogotá, Colombia

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

Jian Liu

en mi (nuestro) caracter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

Fredericton, New Brunswick, Canada

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Santa Fé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. Tambien podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policia; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella) .
5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciaoles, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en Fredericton, New Brunswick, Canada

a los dias de de

Jian LIU

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Jian LIU

legal representative(s) of

an organization existing under the laws of

and in present execution of its business activity, domiciled at

Fredericton, New Brunswick, Canada

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Santa Fé de Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Desings, vegetal varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extentions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above- mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtention or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
5) To register domain names before the competent entity.
6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
7) To ratify or not the officious agency.
8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such sustitutions.

Granted and signed at Fredericton, New Brunswick, CANADA

on this 16 day of February of 2000

Jian LIU

Es copia con el original que tuvo a la vista.
07 ABR 2000
AGUSTIN ROJAS PEREIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

90 67
95

NOTARIAL CERTIFICATE
(When the applicant is an Individual)

ON THIS 16th DAY OF February, 2000, THE UNDERSIGNED NOTARY CERTIFIES THAT:

1. Jian Liu, (name of the peson who signs the Power of Attorney) of legal age and domiciled at Fredericton, New Brunswick, Canada, signed in ~~his~~ her presence the foregoing document, the grantor is to ~~him~~ her personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Katherine LeFeuvre
Notary Public

KATHERINE E. LEFEUVRE NOTARY PUBLIC NEW BRUNSWICK

NOTE: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished , 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circunstances were exhibited to him.

CERTIFICADO NOTARIAL
(Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los dias del mes de de , el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____ firmó en su presencia el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

_____
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consul de Colom-bia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás paises el Señor Consul de Colombia o ante quien se otorgue,debe expedir una certificacion dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

TRADUCCION OFICIAL No. 2000/067
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL

CONSULADO DE COLOMBIA

No. 50 Ottawa, Canada, a 14 de 03 de 2000

Visto en este Consulado para autenticar la firma de
MARIO NUÑEZ SUAREZ
quien en la fecha ejercia las funciones de
FUNCIONARIO DIV. LEGAL
$ 22 =

Consul de Colombia
Patricia Tanco de Mass

CONSULADO DE COLOMBIA * OTTAWA

Certified at the Department of Foreign Affairs and International Trade for Legalization of the Foregoing Signature of:
Certifié au Ministère des Affaires étrangères et du Commerce international afin de légaliser la signature ci-dessus de:
CANADA
Deputy Minister of Foreign Affairs
Sous-Ministre des Affaires étrangères
AGUSTIN NOTARY

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

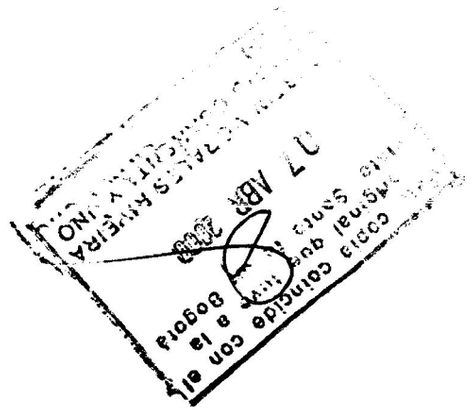
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2000 MAR 23

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C

2000/067

TRADUCCION OFICIAL No:
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
RES No 323 DEL MIN DE



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

91

2002-66-02
372

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 96

Radicación no 00-788

Concepto Técnico no 342 Clasificación Internacional de Patentes C07 D 305/14; A61K 31/335

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI [X]	NO [ ]	Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).
SI [X]	NO [ ]	Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).
SI [X]	NO [ ]	Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).
SI [ ]	NO [ ]	NO ES APLICABLE [X] Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)
SI [X]	NO [ ]	Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).
SI [ ]	NO [ ]	NO ES APLICABLE [X] Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).
SI [ ]	NO [ ]	NO ES APLICABLE [X] Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-I).
SI [ ]	NO [X]	La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).
SI [X]	NO [ ]	La prioridad coincide con la materia reivindicada.
SI [X]	NO [ ]	CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [ ] NO [ ] ver hoja(s) anexa(s)

- Se anexa nuevo capitulo reivindicatorio folios 53-57, que reemplaza el originalmente presentado. En las reivindicaciones se repite el numeral 19 folio 57. En la prioridad el numeral 20, no coincide con el numeral 1a de las reivindicaciones folios 91 y 57.
- Se anexa nuevo capitulo descriptivo folios 32-52.
- se anexa artes 6x6cm y 12x12cm folios 59-61.

EXAMINADOR TÉCNICO 202039

Bogotá D. C., Marzo 06/02

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

87 92

2002-07-30
416

2020
Bogotá D.C.,

Doctora:
Dilia María Rodríguez D'Aleman
Apoderada

REFERENCIA:	**Radicación N°**	**00-788**
	Trámite	**002**
	Evento	**001**
	Actuación	**416**
	Oficio N°	**1008**
	Folios	**001**

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente de invención que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá D.C., a los 22 [illegible]

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Bogotá, DC, 13-07-04 El extracto de esta solicitud fue publicado en el número 518 de la Gaceta de Propiedad Industrial, de fecha 30-07-02. El término hábil señalado por la ley expiró el 25-10-02 y SI ___ NO X se presentaron oposiciones por parte de terceros.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia