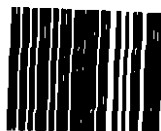


PETITORIO



01 18871

Notificación de la Oficina de Patentes
 Edición: 1999/10/10
 Fecha de la última actualización: 10/10/99
 Este formulario es el primer paso para la solicitud de una patente.
 Dependiendo de la actividad de la Oficina de Patentes

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
2) SOLICITANTE (74)	Nombre: BAKER NORTON PHARMACEUTICALS, INC. Dirección: 4400 Biscayne Boulevard, Miami, Florida 33137-3227 Teléfono: Fax: E. Mail: Domicilio: Miami, Florida	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO _____	
3) REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of. 404 Santafé de Bogotá D.C. Teléfono: 6350835 Fax: 6350824 E. Mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ	
4) INVENTOR (ES)	Nombre: Jian LIU Dirección: 470 Cherry Avenue, Fredericton, New Brunswick, E3A 5N9, Canada Teléfono Fax: E. Mail: Domicilio: New Brunswick, Canada	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO _____	
5) Título (54) PROCESO PARA PREPARAR PACLITAXEL Y 13-ACETIL-9-DIHIDROBACATÍN III			
6) Clasificación Internacional (51) A61K 31/337			
7) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Marzo 10, 2000
(31) Número de Solicitud 09/522,625			
8) Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:			
6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐			
9) Comprobante de pago N°. 151374 15138 Fecha Feb 12/01			

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 13,137
 FECHA : FEBRERO 27 DE 2001

DIRECCION GENERAL DE LICENCIAS
 DIRECCION GENERAL DE REGISTRO Y PATENTES
 TRAMITE : REG. PATENTES D. A. INCLUIDA Y A. PATENTE
 IMPORTE: COTIZ. DIVISION DE REGISTRO Y PATENTES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3143283	26/02/2001	1,369,920.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
	TOTAL :	\$ 356,640.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador: 382 0840
 Fax: 350 5220
 e-mail: info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 13,130
 FECHA : FEBRERO 27 DE 2001

SUPERINTENDENCIA Y LICENCIAMIENTO
 REGISTRO Y LICENCIAMIENTO DE EMPRESAS
 REGISTRO Y LICENCIAMIENTO DE EMPRESAS
 REGISTRO Y LICENCIAMIENTO DE EMPRESAS
 REGISTRO Y LICENCIAMIENTO DE EMPRESAS

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLON	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3143283	26/02/2001	1,369,920.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	02 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 1,000.00

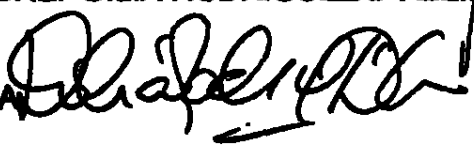
SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador: 382 0840
 Fax: 350 5220
 e-mail: info@slc.gov.co
 www.slc.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

1

10)	ANEXOS
☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica ☒ Poderes, si fuera el caso ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante ☒ Descripción de la invención ☒ Una o más reivindicaciones ☒ Dibujos y /o planos necesarios ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm	
11) FIGURA CARACTERISTICA:	
12)	NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN FIRMA:  C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

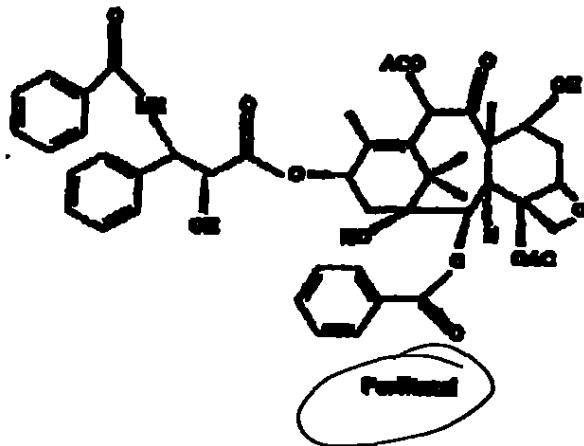
PROCESO PARA PREPARAR PACLITAXEL Y 13-ACETIL-9-DIHIIDROBACATÍN III

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la producción de paclitaxel proveniente de tejo del Pacífico, tejo ornamental u otras especies de tejo; sus agujas, cortezas y raíces y, más particularmente, la presente invención se refiere a procesos para extraer económicamente paclitaxel, que actualmente se extrae mediante un proceso de alto costo, causado por un porcentaje extremadamente alto de impurezas indeseadas, que se llevan con el extracto durante la extracción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el arte previo se describe un método de extracción (Journal of Natural Products 53, 1249-55, 1990), que informa que el contenido de paclitaxel en el extracto está en el rango entre 0,009% y 0,07%. Después de remover las impurezas solubles (ceras, pigmentos, etc.) en hexanos y después de dividir el extracto entre agua y diclorometano, la concentración de paclitaxel en el extracto crudo, soluble en diclorometano estaba en el rango entre 0,03% y 0,3%, en peso. El paclitaxel (Taxol) está representado por la siguiente fórmula estructural:

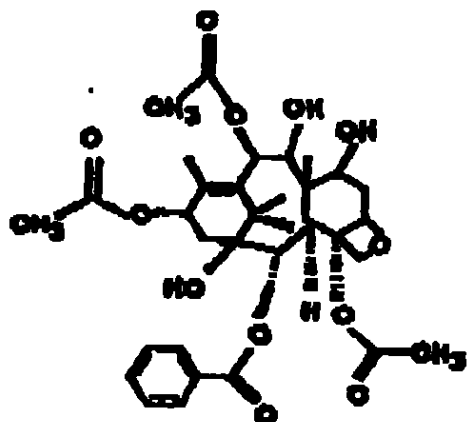


El paclitaxel es un compuesto anticáncer. El paclitaxel exhibe un mecanismo único para prevenir el crecimiento de células cancerosas al afectar los micro-túbulos, que juegan un rol importante en la división y otras funciones celulares.

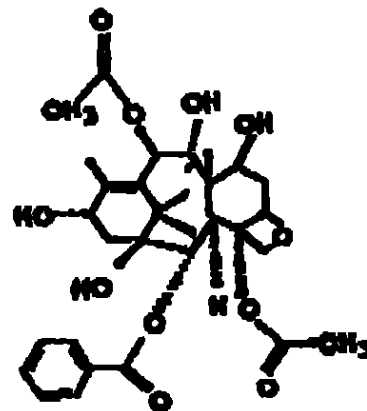
El paclitaxel es clínicamente efectivo para el tratamiento del cáncer refractario de ovario y de mamas en humanos y ha mostrado actividad prometedora contra una cantidad de cánceres tales como los de hígado, peritoneal, cervical, prostático, de colon y esofágico.

El paclitaxel se extrajo primeramente de la corteza de tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*. Desafortunadamente, el tejo crece muy lentamente, aproximadamente 200 mm por año y, por esto, la corteza es una fuente limitada de paclitaxel. Esto condujo a los investigadores a buscar medios alternativos para producir paclitaxel y sus análogos, que puedan exhibir una superior actividad anti-tumor, tales como los derivados de 9-dihidrotaxol, que tienen solubilidad aumentada en agua. Como ejemplo, se ha encontrado que el 13-acetil-9-dihidrobacatín III, un diterpeno de taxano, es un precursor útil para preparar tales análogos. Esto se ha discutido en la Patente de los EE.UU. N° 5.440.056, concedida a Klein y colaboradores, el 8 de Agosto de 1995.

El 13-acetil-9-dihidrobacatín III y el bacatín III se representan por las siguientes fórmulas de estructura:



13-acetil-9-dihidrobacatín III



bacatín III

Esto puede obtenerse, por ejemplo, de *Taxus canadensis* que está más ampliamente distribuido que *Taxus brevifolia*. De aquí, el 13-acetil-9-dihidrobacatín III está disponible más abundantemente que el paclitaxel.

Los métodos convencionales para aislar taxanos, incluyendo paclitaxel, 13-acetil-9-dihidrobacatín III y bacatín III comprenden, en general, los pasos de extraer los taxanos desde una biomasa, con un solvente alcohólico y separar y purificar el taxano individual por cromatografía.

Los métodos del arte previo describen el uso de varios tipos de tecnologías cromatográficas para separar paclitaxel y sus derivados. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N° 5.380.916, concedida a Rao el 10 de Enero de 1995, describe un proceso para usar cromatografía líquida en fase reversa, en columna C18. Aunque la cromatografía en fase reversa puede ser exitosa para separar taxanos, este protocolo emplea un absorbente costoso y requiere una inversión de tiempo significativa. Por lo tanto, este proceso no es viable económica ni industrialmente.

La Patente de los EE.UU. N° 5.478.736, concedida a Nair el 26 de Diciembre de 1995, describe un proceso que usa cromatografía de absorción en fase normal, sobre sílica gel, para purificar taxanos. En cromatografía de absorción en fase normal se usa Al_2O_3 o sílica gel como absorbente, que es cerca de 100 veces menos costosa que el absorbente ordinario de la fase reversa. El problema con la cromatografía de absorción en fase normal con sílica gel es que el absorbente se unirá con el paclitaxel, no eluyéndose con la mezcla de solventes, por lo tanto, reduciendo el rendimiento del producto.

La Patente de los EE.UU. N° 5.530.020, concedida a Gunavardana y colaboradores, el 25 de Junio de 1996, describe un proceso para aislar el 13-acetil-9-dihidrobacatín III desde *Taxus canadensis*, que emplea cromatografía en contracorriente planetaria en espiral (PCCC). Algunas de las desventajas asociadas con este procedimiento son que es complejo, consume cantidad s significativas de solvente y puede usarse para purificar sólo muestras en pequeña cantidad (miligramos).

Hasta ahora, no se ha descrito una cromatografía de distribución en columna, para separar y purificar paclitaxel y taxanos relacionados. }

RESUMEN DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es proveer un método mejorado para aislar taxanos, particularmente paclitaxel, 13-acetil-9-dihidrobacatín III, desde una especie de *Taxus*.

Un aspecto de la presente invención provee un método para aislar taxano desde un extracto crudo de una especie de *Taxus*, que comprende el paso de someter el extracto crudo a cromatografía en columna seca y cromatografía en columna de distribución.

El método de la presente invención puede practicarse a escala pequeña de laboratorio, así como a escala grande industrial. }

Convenientemente, el taxano se obtiene por extracción del material vegetal, con un solvente alcohólico, al reflujo. Preferiblemente, la columna a usar con el método de la invención incluye un tubo de nylon empacado con sílica pretratada, que tiene un tamaño de las microesferas entre 150 mallas y 250 mallas, para usar en cromatografía de distribución en columna seca.

Una columna de vidrio empacada con sílica pretratada, teniendo un tamaño de partículas entre 150 mallas y 250 mallas, para usarla como columna de cromatografía de distribución en húmedo.

En una modalidad de la invención, el método incluye los pasos de cromatografía de distribución en columna seca para obtener 13-acetil-9-dihidrobacatín III y cromatografía de distribución en columna en fase normal, para obtener paclitaxel y bacatín III.

En otra modalidad de la invención, puede purificarse el 13-acetil-9-dihidrobacatín III por cromatografía de distribución en columna seca, eluyendo con hexanos y acetato de etilo (4:6).

En otra modalidad de la invención, el paclitaxel puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de distribución en columna en fase normal. Preferiblemente, el solvente de elución para este paso es hexano: acetato de etilo (iniciando con 6:4 y terminando con 3:7). Esta cromatografía puede repetirse varias veces, si fuera necesario.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se provee un método para obtener taxanos desde *Taxus* sp., incluyendo, pero sin que sea limitación, a *T. brevifolia*, *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. canadensis*, *T. wallchiana*, *T. chinensis*, *T. funanensis*, *T. X media* cv. *densiformis* y *T. X media* cv. *Hicksii*.

El proceso comprende los pasos de extraer una fuente de material usando un solvente alcohólico; concentrar el extracto alcohólico para obtener un residuo conteniendo taxanos; dividir el residuo entre agua y CH_2Cl_2 ; y luego concentrar el CH_2Cl_2 .

Disolver para obtener un residuo rico en taxano, separar los taxanos en fracciones que lo contengan, sometiendo los residuos ricos en taxanos a cromatografía de distribución en columna seca y recuperar todos los taxanos individuales desde la columna.

En otra modalidad de la presente invención, puede purificarse adicionalmente el paclitaxel y el baccatín III mediante los pasos de cristalizar el 13-acetil-9-dihidrobaccatín III desde la solución que contiene taxanos, con un solvente alcohólico para obtener 13-acetil-9-dihidrobaccatín III y purificar la solución que contiene paclitaxel por cromatografía de distribución en columna en fase normal.

Las ventajas de la presente invención proveen un método para la aislación de taxanos, que es rápido, fácil de ejecutar, costo-efectivo y eficiente, en ambas producciones, a pequeña y gran escala.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

El material inicial para esta invención es un material vegetal, seleccionado de especies de *Taxus*, particularmente *Taxus canadensis*.

Los taxanos pueden obtenerse desde cortezas, agujas, raíces, tallos y madera o de sus mezclas. Deseablemente, se usa las ramillas o agujas o sus mezclas. La biomasa usada puede ser fresca o seca.

La biomasa se muele y se extrae con un solvente polar tal como un alcohol, deseablemente metanol. Las extracciones se continúan al reflujo durante 3 horas y se filtra. El residuo se extrae nuevamente al reflujo durante

2 horas y se filtra. El extracto se combina y concentra a alrededor del 5% del volumen original, por evaporación. El contenido de paclitaxel en este concentrado está entre 0,2% y 0,3%, determinado por el porcentaje de área en HPLC. Se agrega alrededor de 2 equivalentes de agua al concentrado. La solución acuosa se extrae varias veces con diclorometano y luego se descarta la capa acuosa. La capa orgánica se concentra a un volumen pequeño. El contenido de paclitaxel en este residuo es aproximadamente 1%. El residuo se somete a cromatografía de distribución en columna seca.

La Cromatografía en Columna Seca (DCC) provee un método alternativo a la Cromatografía en Capa Delgada (TLC) y a la cromatografía preparativa en columna. El costo es muy inferior en comparación con el de la Cromatografía Líquida Preparativa. Las muestras que son separables sobre sílica gel o placas de TLC de alúmina neutra, también pueden separarse por DCC. Una de las ventajas de la DCC es la transferibilidad directa de las condiciones desde TLC a DCC. Todo el trabajo hecho para determinar las condiciones para la separación de muestras en la DCC puede hacerse preliminarmente sobre placas de TLC. Una vez determinadas, esas condiciones pueden aplicarse a la DCC, que dará un más alto grado de separación, similar a la obtenida en la placa de TLC. La DCC provee la ventaja adicional que el número de fracciones a procesar depende del número de cortes hechos, lo que usualmente no excede de quince y, mucho más a menudo, no excede de diez cortes, lo que contrasta con las columnas de "flujo líquido" que pueden requerir un número grande (>50) de fracciones a recolectar. Otra ventaja de la DCC es el uso de tubos de nylon como columna y de absorbentes fluorescentes que proveen detección y procedimientos de aislamiento simplificados. Por lo tanto, en comparación con la cromatografía en

columna "llenada con líquido", la cromatografía en columna seca es, a menudo, una técnica más rápida, fácil y menos costosa.

El proceso para cromatografía en columna seca se establece, en general, en "Progress in Separation and Purification", Marjorie, M., E.S. Perry y C.J. Van Oss Ed., John Wiley & Sons, 1970. volumen 3, páginas 73-95.

Brevemente, los procedimientos generales para efectuar cromatografía en columna seca incluyen el uso de una columna que incluye un tubo de nylon, pudiendo usarse otros tipos de tubería tales como vidrio. El tubo se coloca en acetona durante la noche y se seca al aire para remover todo el solvente. La columna se prepara sellando un extremo del tubo e insertando un pequeño cojín de algodón o lana de vidrio desde el otro extremo. Se perfora el extremo sellado del tubo para permitir ventilación y el tubo se compacta en seco con trióxido de alúmina o sílica gel hasta que se rigidiza lo suficiente como para permanecer derecho en una abrazadera. La muestra puede vaciarse directamente dentro del tubo o disolverse en un pequeño volumen del solvente a usar para el desarrollo y, luego, distribuirse uniformemente en la parte superior de la columna. Alternativamente, la muestra puede recubrirse dentro de una pequeña cantidad de absorbente, secarse, molerse y luego agregarse a la parte superior de la columna. La muestra se pasa hacia abajo en la columna con un solvente de elución. Deberá mantenerse una capa constante de líquido solvente, de alrededor de 1 a 2 cm, durante todo el procedimiento. Nunca debe dejarse secar la columna.

Se ha encontrado que el procedimiento de la invención requiere desde 3 hasta 5 horas para completar la separación de los compuestos deseados. Aún así, el tiempo de separación es mayor que el usual en procesos a pequeña escala en el laboratorio. La DCC es aún una técnica más rápida que la cromatografía en columna "llenada de líquido", que puede



demorar tres a cinco días en completarse. La separación se consigue a medida que la mezcla desciende en la columna. Cuando la mezcla alcanza la base de la columna, se detiene el desarrollo y se sellan los extremos de la columna. Puede identificarse los varios componentes del extracto por las bandas separadas que pueden detectarse, por ejemplo, por UV o un método visual. La columna se corta en las secciones deseadas y los compuestos puros se eluyen con solventes adecuados.

La presente invención puede practicarse mejor usando una columna de nylon. El trióxido de alúmina o la sílica gel son agentes de soporte adecuados, aquí se prefiere sílica gel. En cromatografía de absorción, la sílica gel contiene grupos sililhidroxi ($-\text{SiOH}$) que se unen con los grupos polares del soluto. Así, los compuestos más polares se mueven a lo largo de la columna más rápido que los menos polares. La desventaja de la cromatografía en fase reversa es que el proceso es más costoso y consumidor de tiempo que la cromatografía en fase normal. Pero ambos procesos, como un todo, pertenecen a la cromatografía de absorción.

La cromatografía de absorción en fase normal es tal que el paclitaxel no se separa limpiamente, el proceso necesita repetirse tanto como 10 veces para alcanzar la pureza final del paclitaxel, debido a la gran cantidad de impurezas en el extracto crudo.

La presente invención usa un nuevo proceso cromatográfico, denominado cromatografía de distribución en columna en fase normal, para separar y purificar paclitaxel y taxanos relacionados.

En esta cromatografía de distribución en columna, la sílica gel usada se pre-trata con formaldehído. Los grupos ($-\text{SiOH}$) de la sílica gel se han unido con ($\text{H}-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$) por enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der

Waals entre los grupos $-\text{SiOH}$ y $\text{H}-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$. Así, la sílica gel ha perdido sus propiedades de absorción y se usa sólo como vehículo de la formamida (FAM).

El material a separar se distribuirá entre la formamida y el solvente de elución, de acuerdo con su polaridad. Las conductas cromatográficas son similares a las de la cromatografía en fase normal, así, los compuestos más polares se mueven más lentamente a lo largo de la columna que los menos polares.

Para cromatografía de distribución en columna seca :

La sílica gel o el trióxido de alúmina se tratan de acuerdo con el siguiente método:

- 1) La sílica gel a usar se mezcla con un exceso de 10% a 15% de FAM en Me_2CO , la mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se filtra. El filtrado se concentra para recuperar el solvente, el residuo se descarta.
- 2) Luego, se seca al aire la sílica gel para remover todo el solvente. La sílica gel secada al aire está lista para usarla.

Para la cromatografía de distribución en columna húmeda:

La sílica gel a usar se mezcla con un exceso entre 10% a 15% de formamida en acetona. La mezcla se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se vacía dentro de la columna. El exceso de solvente se hace fluir fuera de la columna hasta que queda una capa de solvente de 1 a 2 cm sobre la columna empacada. La columna se mantiene a temperatura ambiente durante unas pocas horas, antes de agregar las muestras en su parte superior.



La presente invención puede practicarse mejor usando columnas de nylon. El trióxido de alúmina o la sílica gel son vehículos adecuados, siendo esta la preferida.

La sílica gel tiene normalmente un grupo funcional de -SiOH en su superficie. Cuando se la trata con H-C=O-NH_2 (formamida) se forma alguna clase de enlace de hidrógeno entre el grupo funcional -SiOH y la formamida, así como debido a algunas otras fuerzas interactivas, por lo tanto, la sílica gel no mantiene más sus propiedades de absorción. Sólo es un vehículo de la formamida. En la superficie de la partícula de sílica gel se forma una película delgada de formamida, lo que se llama la fase estacionaria.

La cromatografía de distribución difiere de la cromatografía tradicional de absorción. En la cromatografía tradicional de absorción, el sistema consiste de un absorbente (fase estacionaria), solvente(s) de elución (fase móvil) y soluto, por lo tanto el sistema es uno de tres componentes. En la cromatografía de distribución, los sistemas cromatográficos consisten de un soporte (vehículo), solvente polar (fase estacionaria), solvente(s) de elución (fase móvil) y soluto, por lo tanto, el sistema es uno de cuatro componentes.

Los mecanismos de separación son diferentes en los dos sistemas cromatográficos. En la cromatografía de absorción, el material se separa como resultado de repetidos pasos de sorción/desorción durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario y la separación se logra debido a diferencias en las constantes de equilibrio de sorción/desorción de los componentes de las muestras individuales.

En la cromatografía de distribución, el material a separar lo hace como resultado de la diferente distribución en dos fases líquidas insolubles y la separación se logra debido a diferencias de las constantes de distribución en

las dos fases líquidas insolubles de los componentes de las muestras individuales.

En general, la cromatografía de distribución se usa para separar compuestos polares, tales como azúcares, péptidos, glicósidos y otros compuestos polares.

En la presente invención, se ha encontrado que la cromatografía de distribución logra excelente separación del diterpeno de taxano, en comparación con la cromatografía de absorción, incluyendo las de fase normal y fase reversa.

La presente invención puede practicarse mejor usando una columna de nylon empacada en seco con sílica gel pretratada, en la aislación del 13-acetil-9-dihidrobacatín III. La sílica gel tiene un tamaño de la microesfera entre 150 y 250 mallas. Las dimensiones de la columna son 304,8 x 3.048 mm (12" x 120"). A su vez, la cantidad de sílica gel requerida está determinada por el lado de la muestra. Al practicar la separación cromatográfica de distribución en columna seca de la presente invención, se encontró que la relación entre el tamaño de la muestra a la cantidad de sílica gel requerida para separar los taxanos, varía desde 1:15 hasta 1:20, deseablemente 1:20. De aquí, que la cantidad de sílica gel necesaria es aproximadamente de quince a veinte veces, deseablemente veinte veces, la cantidad de la muestra. Se ha encontrado que las relaciones anteriores son óptimas con respecto a costo y grado de separación. Al aumentar la cantidad de sílica gel usada aumentará el costo, el que puede ser substancial a gran escala. Por otra parte, el reducir la cantidad de sílica gel se producirá pobre separación.

Habiendo descrito las técnicas cromatográficas de distribución en columna seca y las condiciones adecuadas de la presente invención, se sigue

con un experimento preferido del método para aislar taxanos, de acuerdo con la presente invención.

Se separa el extracto crudo de los taxanos individuales en diclorometano, cargando el extracto crudo dentro de la parte superior de la columna y agregando una mezcla de solventes de hexanos y acetato de etilo (4:6). Una vez que el solvente alcanza el fondo de la columna, se detiene la elución y se sella el tubo de nylon, luego se rebana la columna en varias secciones. Los compuestos de las secciones rebanadas se lavan con un solvente polar, tal como un alcohol como metanol. Los taxanos individuales se identifican por TLC.

El 13-acetil-9-dihidrobacatín III se obtiene por cristalización desde metanol. La cristalización continúa normalmente durante la noche, a temperatura ambiente.

El paclitaxel se separa de los otros taxanos por purificación, como sigue. Las fracciones se analizan por TLC. El paclitaxel muestra una mancha de color púrpura verdoso y el 13-acetil-9-dihidrobacatín III muestra una mancha de color verde oscuro en la placa de TLC, al asperjar una solución de H_2SO_4 al 10%, en etanol.

Se combina las fracciones que contienen paclitaxel y se concentran a sequedad y el residuo se disuelve con CH_2Cl_2 . La solución de CH_2Cl_2 se purifica por cromatografía de distribución en columna húmeda. La columna se empaca con sílica gel pretratada, con un tamaño de micro-esferas entre 150 y 250 mallas y se opera a una presión de 2,1 bar (30 psi). Los eluy ntes útiles de esta invención pueden seleccionarse de la mezcla de hexanos y acetato de etilo, o de los textos estándar de cromatografía, por ejemplo, hexanos y acetona.

Se ha encontrado que un sistema de gradiente de solventes de hexanos y acetato de etilo, que tiene una relación de hexanos a acetato de etilo desde alrededor de 5:5 hasta 3:5 es particularmente útil para el propósito de separar el paclitaxel de los taxanos estrechamente relacionados. Las fracciones que contienen taxanos se recolectan de la columna y los que contienen paclitaxel se combinan y concentran para remover el solvente. El residuo se disuelve en metanol y se agrega alrededor de 30% equivalente de agua. La solución acuosa se mantiene a temperatura ambiente durante la noche, se forman los cristales que se separan por filtración y se secan en un horno al vacío a 70°C. El paclitaxel se obtiene como un polvo de color crema.

Las fracciones que contienen bacatín III se combinan y concentran a sequedad. El residuo se disuelve en metanol. La solución en metanol se mantiene en un refrigerador durante la noche. El bacatín III se obtiene como cristales blanquizcos, que se recristalizan adicionalmente para disolver sólidos en pequeños volúmenes de acetona. La solución de acetona se diluye con el equivalente de hexanos y la mezcla se deja reposar durante la noche, para dar bacatín III como cristales blancos en forma de agujas.

EJEMPLO 1

Se agregó 1.200 litros de metanol a aproximadamente 350 kg de agujas y ramillas secas, molidas de *Taxus canadensis*, en un extracto industrial, multifuncional. La mezcla se calentó al reflujo durante 3 horas y se filtró. La materia prima se calentó durante 2 horas al reflujo, con 900 litros de metanol y luego se filtró nuevamente la solución de metanol. Se combinó los filtrados y se los concentró a aproximadamente 150 l, bajo vacío, en un evaporador por aspersion, luego se agregó un equivalente de agua para diluir el concentrado. La solución acuosa se dividió entre agua y cloruro de metileno

(450 l, 1:1), en un reactor de 1.000 l, equipado con agitador eléctrico. La mezcla se agitó durante 5 minutos, a una velocidad de 80 r.p.m, luego se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora o hasta que la mezcla se separó en dos capas. Se recolectó la capa orgánica y la capa acuosa se extrajo dos veces más con 400 litros de cloruro de metileno (200 l cada una). La solución de cloruro de metileno se combinó y concentró en un evaporador de capa delgada, equipado con dos separadores ciclónicos, bajo vacío, para tomar forma de suspensión.

EJEMPLO 2

En una mezcladora de 500 litros, equipada con agitador eléctrico se dispuso de aproximadamente 70 kg de sílica gel y se agregó 250 litros de formamida en acetona y la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego se mantuvo a temperatura ambiente durante otros 30 minutos y se filtró. La sílica gel sólida se recolectó y se secó al aire en un secador de gabinete, se concentró el filtrado para recuperar el solvente, acetona y exceso de formamida.

EJEMPLO 3

Cromatografía de Distribución en Columna Seca

La sílica gel pretratada del Ejemplo 2 se empacó en un tubo de nyl n de 228,6 x 3.048 mm (9" x 120") con un espesor de pared de aproximadamente 0,1 mm. La sílica gel usada tenía un tamaño de microesferas entre 150 y 250 mallas. La columna de nylon se colocó en una columna de acero inoxidable del mismo tamaño, para mantener su peso. El eluyente usado fue una mezcla de hexano y acetato de etilo (4:6); puede usarse otro solvente orgánico que sea insoluble en formamida.

La muestra del Ejemplo 1 (6 kg, aproximadamente 70% de masa sólida) se diluyó con 5 litros de acetato de etilo y luego se colocó encima de la columna de nylon, la que se sometió a cromatografía de distribución en columna seca.

La columna se desarrolló con hexanos: acetato de etilo (4:6), cuidando de mantener una capa de 1 a 2 cm de líquido en todo momento; una vez que el eluyente alcanzó el fondo de la columna, se detuvo el desarrollo de la columna. Se extrajo la columna de nylon de la columna soportante de acero inoxidable y luego se cortó en 15 porciones. Se revisó cada porción por análisis TLC (las muestras se asperjaron con H_2SO_4 al 10%, en etanol, seguido por calentamiento a 100-105°C durante un par de minutos). Se encontró que el 13-acetil-9-dihidrobacatín III y el bacatín III se movieron más rápido que el paclitaxel a lo largo de la columna y, la conducta cromatográfica en la cromatografía de distribución difería de la cromatografía de absorción en fase normal y era similar a la cromatografía de absorción en fase reversa.

Se colocó al 13-acetil-9-dihidrobacatín III, bacatín III y las porciones que contenían paclitaxel en columnas de vidrio cortas de 152,4 mm (6") y cada una se lavó con metanol. Se recolectó las soluciones en metanol y luego se concentraron separadamente a sequedad.

El residuo de la porción de 13-acetil-9-dihidrobacatín III se disolvió en pequeñas cantidades de metanol (la cantidad de metanol fue suficientemente grande para disolver el residuo a 60°C) y la solución se enfrió a temperatura ambiente y se mantuvo así durante la noche. Se filtró los cristales formados, se los lavó con acetona y luego se los secó en horno al vacío a 80°C, para dar el 13-acetil-9-dihidrobacatín III, como cristales en forma de aguja (aproximadamente 120 g), que se identificó por espectroscopía NMR.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,07 (d, 2H, 2', 6'-Ar-H); 7,58 (dd, 1H, 4'-Ar-H); 7,45 (dd, 2H, 3', 5'-Ar-H); 6,17 (d, H-10), 6,14 (dd, H-13); 5,73 (d, H-2); 4,93 (d, H-5); 4,41 (dd, 2H, H-7, 9); 4,28 (d, H-20a), 4,14 (d, H-20b); 3,02 (d, H-3); 2,51 (ddd, H-6a); 2,26 (s, 10-OAc), 2,18 (m, 2H, H-14); 2,17 (s, 4-OAc); 2,12 (s, 13-OAc); 1,91 (dd, H-6b); 1,91 (s, 18- CH_3); 1,79 (s, 19- CH_3); 1,66 (s, 16- CH_3); 1,23 (s, 17- CH_3) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 170,55; 170,48; 169,38; 167,00; 139,58; 134,88; 133,69; 130,05; 129,18; 128,62; 84,03; 82,05; 78,74; 76,77; 76,55; 73,91; 73,49; 73,18; 69,74; 47,07; 44,84; 43,00; 37,92; 35,92; 28,27; 22,84; 22,56; 21,34; 21,24; 14,86; 12,48 ppm.

EJEMPLO 4

Cromatografía de Absorción en Fase Normal

La porción del residuo conteniendo bacatín III del Ejemplo 3 se disolvió en una pequeña cantidad de diclorometano (sólo lo suficiente para disolver el material al calentar el solvente), luego la solución de diclorometano se sometió a cromatografía instantánea en fase normal. Se usó una columna de vidrio de 100 x 1.500 mm. La columna se empacó con sílica gel (150 y 250 mallas). El solvente de elución fue un sistema de gradiente decreciente de hexano en acetona (iniciando con 70:30 y progresando a 45:55). Se recolectó fracciones de 1.000 ml. Se combinó las fracciones que contenían bacatín III y se las concentró a sequedad. El residuo se disolvió en 1.000 ml de metanol y se mantuvo a temperatura ambiente durante la noche. Se formó alguna cristales blancos. Se filtró los cristales y se los recrystalizó desde metanol. Se obtuvo 23 g de cristales blancos y se los identificó por comparación con una muestra de referencia por HPLC, como bacatín III.

EJEMPLO 5***Cromatografía de Distribución en Fase Normal***

La porción del residuo que contenía paclitaxel del Ejemplo 3 se disolvió en una pequeña cantidad de acetato de etilo y se diluyó con una pequeña cantidad de hexano. Se trató 20 kg de sílica gel, como se describió en el Ejemplo 1 y, luego se mezcló con 40 litros de una mezcla de solventes de hexano y acetato de etilo (6:4), luego la mezcla se vació en una columna preparativa de baja presión, de 150 x 1.500 mm. Se dejó escurrir el exceso de solvente hasta que quedó una capa de 10 mm en la parte superior de la columna. Se agregó cuidadosamente la solución a la parte superior del lecho de sílica gel. Luego, la columna se eluyó con un sistema de solventes en gradiente de hexano y acetato de etilo (iniciando desde 6:4 y terminando en 3:7). Se recolectó fracciones de 2.000 ml cada una y la tasa de flujo varió entre 75 ml/minuto y 100 ml/minuto.

Se combinó y concentró las fracciones que contenían paclitaxel para remover la mayor parte del solvente, luego el residuo se disolvió en metanol (1.500 ml). Se agregó a la solución de metanol, aproximadamente 30% del volumen de agua, luego la solución se mantuvo a 5°C durante la noche. El sólido crudo cristalino de la solución acuosa de metanol se filtró y secó en horno al vacío, a una temperatura entre 75°C y 80°C. El sólido consistía de aproximadamente 70% de paclitaxel y 23% de cefalomanina y otros taxanos no identificados. El rendimiento fue 66 g.

EJEMPLO 6***Cromatografía de Absorción en resina Adsorbente Macroreticular***

Se disolvió 50 g de paclitaxel crudo proveniente del Ejemplo 5, en 350 ml de acetona, luego se mezcló con 200 g de resina de co-polímero de

polimetacrilato-divinilbenceno. La mezcla se colocó en un matraz de fondo redondo y se evaporó en un evaporador rotativo, para remover la acetona. El material recubierto se colocó en la parte superior de una columna preparativa de baja presión. El tamaño de la columna fue 1.000 mm x 1.500 mm y se empacó con resina de co-polímero de polimetacrilato-divinilbenceno. El tamaño de partículas de la resina de polímero varió entre 75 μm y 150 μm . La resina de co-polímero se preparó desde Amberlite^(R) IRP64. Después de agregar la muestra a la parte superior de la columna, la abertura se selló y eluyó con una gradiente fuerte de una mezcla de solventes de acetona y agua (iniciando con acetona:agua 3:7 y terminando a 65:35). La columna se operó a una presión de 2,1 bar (30 psi). El cambio de solvente se monitoreó por los resultados de TLC y resultados analíticos de HPLC de las fracciones.

Se recolectó fracciones de aproximadamente 1.000 ml cada una y se las monitoreó por TLC y análisis HPLC. La tasa de flujo fue 100 ml/minuto. Se combinó las fracciones con contenido de paclitaxel y se las dejó reposar a 5°C hasta completar la cristalización del compuesto. Se aisló por filtración los cristales y se los recristalizó desde 65% de metanol en agua, para dar cristales blancos (30,5 g) con pureza mayor de 99%. La identificación del paclitaxel es como sigue:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,12 (d, 2H, Ar-H); 7,73 (d, 2H, Ar-H); 7,61 (dd, Ar-H); 7,51 (m, 5H, Ar-H); 7,41 (m, 4H, Ar-H); 7,38 (dd, Ar-H); 6,98 (d, N-H); 6,27 (s, H-10); 6,23 (dd, H-13); 5,78 (dd, H-3¹); 5,57 (d, H-2); 4,94 (d, H-5); 4,79 (dd, H-2¹); 4,40 (dd, H-7); 4,30 (d, H-20a); 4,19 (d, H-20b); 3,79 (d, H-3), 3,54 (d, -OH); 2,51 (ddd, H-6a); 2,46 (d, -OH); 2,38 (s, 4-OAc); 2,33 (m, H-14); 2,24 (s, 10-OAc); 1,89 (ddd, H-6b); 1,79 (s, 18-CH₃); 1,68 (s, 19-CH₃); 1,24 (s, 16-CH₃); 1,14 (s, 17-CH₃) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 203,60; 172,69; 171,25; 170,33; 166,97; 141,94; 137,91; 133,70; 133,56; 133,14; 131,97; 130,18; 129,09; 129,02; 128,68; 128,36; 127,00; 84,37; 81,13; 79,00; 77,18; 76,48; 76,26; 75,53; 74,89; 73,14; 72,38; 72,17; 58,59; 54,98; 45,56; 43,14; 35,64; 35,57; 26,84; 22,51; 21,79; 20,83; 14,83 y 9,53 ppm.

EJEMPLO 7

La brominación se efectuó usando un método de acuerdo con la Patente de los EE.UU. N° 5.989.165.

El paclitaxel crudo del Ejemplo 5 (10 g) se disolvió en 100 ml de diclorometano y la solución de diclorometano se vació en un matraz de 500 ml, de 3 cuellos y fondo redondo. La solución se agitó a temperatura ambiente durante unos pocos minutos, luego se agregó 5 equivalentes de bromo (relación molar: 5 equivalentes de bromo vs. cefalomanina), gota a gota durante 1 hora. Se agitó los reactivos a temperatura ambiente hasta completar la reacción (aproximadamente 2-3 horas), monitoreada por análisis TLC. Una vez completada la reacción, la solución se diluyó con 300 ml de CH_2Cl_2 y se transfirió a un embudo de separación. Se agregó 300 ml de tiosulfato de sodio acuoso al 10% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a la solución, para absorber cualquier exceso de bromo (Br_2). Se separó la capa de diclorometano y se la lavó con agua y salmuera, luego se concentró a sequedad bajo vacío, para dar un polvo castaño claro.

EJEMPLO 8

Separación de Paclitaxel por Cromatografía de Distribución

Se disolvió los reactivos crudos (10 g) del Ejemplo 7, en 50 ml de acetato de etilo y luego se diluyó con 50 ml de hexano. La solución de muestra se agregó en la parte superior de una columna de vidrio de baja presión (50 x 1.000 mm). La columna se empacó con sílica gel pretratada y se sometió a cromatografía de distribución en columna. Usando un aparato y metodología similares a las usadas en el Ejemplo 5, se obtuvo finalmente paclitaxel como cristales blancos en forma de aguja, con una pureza superior al 99% (por porcentaje de área de HPLC). Se encontró un rendimiento de 6,1 g.

Aunque las modalidades de la invención se han descrito anteriormente, ella no está limitada a ellas y será evidente para aquellos entrenados en el arte que puede efectuarse numerosas modificaciones de partes de la invención, mientras no se separen del espíritu, naturaleza y alcance de la invención reivindicada y descrita.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para aislar compuestos de taxano desde una fuente que los contiene, que comprende los pasos de:

- proveer una fuente que contenga compuestos de taxano;
- extraer esos compuestos de taxano en un solvente orgánico;
- proveer una columna de cromatografía de distribución;
- eluir los compuestos de taxano en esa columna de distribución; y
- aislar los compuestos de taxano eluidos.

{ grb.

2.- El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde esa fuente de taxanos incluye uno o más de *Taxus brevifolia*, *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. canadensis*, *T. wallchiana*, *T. chinensis*, *T. funanensis*, *T. X media cv. densiformis* y *T. X media cv. Hicksii*.

3.- El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde al menos uno de esos compuestos aislados comprende 13-acetil-9-dihidrobacatín III.

4.- El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde esa columna de cromatografía comprende una columna de cromatografía de distribución seca.

5.- El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde esa columna de cromatografía comprende una columna de cromatografía de distribución en húmedo.

6.- El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde ese solvente orgánico comprende diclorometano.

7.- El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde al menos uno de esos compuestos aislados comprende paclitaxel.

8.- Un método para aislar compuestos de taxano desde una fuente que los contiene, que comprende los pasos de:

- proveer una fuente conteniendo compuestos de taxano;
- extraer esos compuestos de taxano en un solvente orgánico;
- proveer una columna de cromatografía de distribución;
- proveer un material vehicular dentro de esa columna;
- proveer un eluyente;
- eluir esa fuente de compuestos de taxano con ese eluyente en esa columna de distribución en seco;
- eluir al menos el 13-acetil-9-dihidrobacatín III, bacatín III y paclitaxel; y aislar esos 13-acetil-9-dihidrobacatín III, bacatín III y paclitaxel.

9.- El método de acuerdo con la Reivindicación 8, que incluye lavar esos 13-acetil-9-dihidrobacatín III, bacatín III y paclitaxel en metanol.

10.- El método de acuerdo con la Reivindicación 8, en donde ese paso de aislación incluye disolver ese bacatín III en diclorometano.

11.- El método de acuerdo con la Reivindicación 10, que además incluye eluir ese bacatín III con diclorometano en una columna de cromatografía instantánea en fase normal.

12.- El método de acuerdo con la Reivindicación 11, que incluye emplear un eluyente que contiene hexano y acetona.

13.- El método de acuerdo con la Reivindicación 8, en donde ese paso de aislación incluye disolver ese paclitaxel en una solución de acetato de etilo y hexano.

14.- El método de acuerdo con la Reivindicación 13, que incluye eluir esa solución conteniendo paclitaxel en una columna preparativa de baja presión.

15.- El método de acuerdo con la Reivindicación 8, en donde esa fuente de taxanos incluye al menos uno de *T. bacata*, *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. canadensis*, *T. wallchiana*, *T. chinensis* y *T. funanensis*.

RESUMEN

Un proceso para obtener paclitaxel y otros taxanos desde una fuente que los contiene, que incluye extraer compuestos de taxano desde la fuente en un solvente orgánico y hacer pasar esta composición a través de una columna de cromatografía de distribución y eluir los compuestos de taxano n ella. Los compuestos de taxano eluidos se aíslan por técnicas de procesamiento adicionales.



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA



30

Miami, 11 Julio 1999

AUTENT. No. 4234

El Consul General CERTIFICA que el señor(a)
***** KATHERINE HARRIS *****
que autoriza el documento adjunto, ejercia legalmente en la fecha
alli expresada las funciones de SECRETARIO ESTADO *****
y que la firma y sello que aparecen en el documento como suyos son
los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.
El Consulado no asume responsabilidad alguna por el contenido del
documento.

Por el Consul General,

DERECHOS: Timbre US\$ 7.00
Fondo Rot. US\$ 15.00

[Signature]
DELEGADE GENERAL ALVO



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]
079416

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

99 JUL 19 PM 40

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

15/7/99
Esta copia coincide con el
original que tuvo a la
vista. Santa Fe de Bogotá
08 MAR 2001
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

STATE OF FLORIDA
DEPARTMENT OF STATE

P275
31

I, Katherine Harris, Secretary of State,
do hereby certify that

Carole Amster



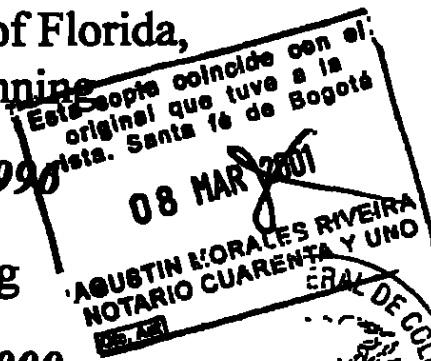
was commissioned as a Notary Public
in and for the State of Florida,
for a term beginning

January 9, 1996

and expiring

January 8, 2000

as shown by the records of this office.



Given under my hand and the Great Seal of the
State of Florida, at Tallahassee, the Capital, this
the Sixth day of July, A.D., 1999.



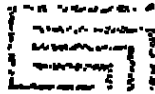
Katherine Harris

Secretary of State



DSDE 99 (1-99)

This document contains an artificial watermark on REVERSE. Hold at 45°. DO NOT ACCEPT UNLESS VIEWED.



32

Clarke, Modet & Co. Colombia Ltda.
PROPIEDAD INDUSTRIAL y DERECHOS DE AUTOR
Apartado Aéreo 92397
Santafé de Bogotá, Colombia

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter 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

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. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).

5) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistír, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Carol J. Gillespie

legal representative(s) of

Baker Norton Pharmaceuticals Inc.
an organization existing under the laws of

Florida

and in present execution of its business activity, domiciled at
4400 Biscayne Boulevard
Miami, Florida 33137 United States of America

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 Model; Designs, 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.

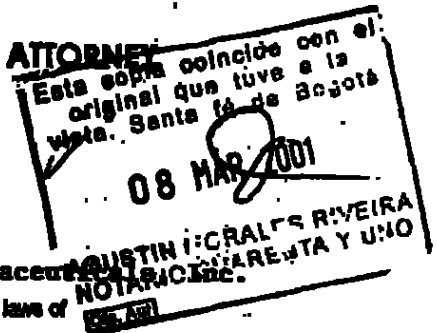
3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses, as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.

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 objection 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 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 object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.

6) To ratify or not the officious agency.

7) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with



6) Ratificar o no la agencia oficiosa.
7) Al mismo faculta (facultamos) e s mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

power to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitution



33

Granted and signed at

on this 2nd day of July of 1999

Dada y firmada en

a los dias de

de

Carol J. Gillespie
Firma / signature

Carol J. Gillespie
Secretary

Baker Norton Pharmaceuticals, Inc.

Recpto,

Deborah A. R.
C.C. 411 654. 882 B.K.
T.P. 20 824 C.J.J.

Recpto:

Wanda J. L. L.
C.C. 410-012. 374 7070
T.P. 36.448 C.J.J.

Esta copia coincide con el original que tiene a la vista. Santa Fe de Bogotá
08 MAR 2001
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO
(C.E. ARI)

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, Mexico y Venezuela)

A los _____ días 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 de su puño y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____ de la persona jurídica _____

4. La citada persona jurídica con sede en _____ está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

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

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los _____ días 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

NOTARIAL CERTIFICATE (When the Applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This 2nd day of July, 1999
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Carol J. Gillespie
(name of the person who signs the power of attorney)

in Miami, Florida of legal age and domiciled in Miami, Florida set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of Secretary of the juridical person Pharmaceuticals, Inc.

4. The mentioned juridical person, with place of business in Miami, Florida is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

Carole Amster
Notary Public

Notary Public

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

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at _____ signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the

Esta copia coincide con el original que tuvo a la vista. Santa fe de Bogotá
08 MAR 2001
WILFREDO MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

NOTA: A continuacion de lo anterior, el Consul de Colombia debe autenticar la firma d Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Consul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación 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 acreditan tales circunstancias.

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 circumstances were exhibited to him.

35

Esta copia coincide con el original que tengo a la vista. Santa Fe de Bogotá
08 MAR 2001
AGUSTIN MORALES FERRERA
NOTARIO CUARENTA Y CINCO

36
AF

TRADUCCION OFICIAL No.99/131 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 Poder otorgado por la sociedad BAKER NORTON PHARMACEUTICAL, INC., de Florida, EE. UU. a las Doctoras Dilla María Rodríguez D'Aleman y Claudia Lucía Caro Ramírez, el respectivo certificado notarial (sociedades) y legalización adjunta todos escritos en inglés.)

La suscrita Carol J. Gillespie, representante legal de BAKER NORTON PHARMACEUTICAL, INC., sociedad existente bajo las leyes de Florida y en desempeño en la actualidad de su actividad comercial, domiciliada en 4400 Biscayne Boulevard Miami, Florida 33137, Estados Unidos de América, por el presente otorgamos Poder a DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, cc.41.854.882 de Bogotá, Tarjeta Profesional 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, Tarjeta Profesional 36448, cc.40.017.374 de Tunja, con domicilio en Santafé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre de la otorgante 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, emblemas, logotipos con el original que todo a la vista. Como lo de Bogotá

Este documento con el original que todo a la vista. Como lo de Bogotá
08 MAR 2001
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

TRADUCCION OFICIAL No. 99/131
HILDA AGUILERA DE PIEDRAHITA
INTERPRETE OFICIAL
C.C. No. 999 DEL MIN. DE JUSTICIA

37 28

renovaciones, prórogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

2) Solicitar, tramitar, obtener, y/o registrar derechos de autor, en cualquier 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 prórogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

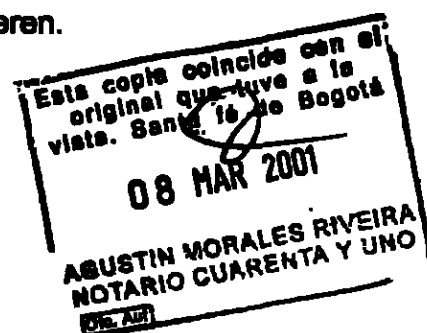
4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, recurso de, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrán intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; acciones o juicios promovidos por el mandante o contra él.

5) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, aceptar cláusulas compromisorias, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.

6) Ratificar o no la agencia oficiosa.

7) Así mismo facultamos a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado, hoy día 2 de julio de 1999



TRANSCUION ORIGINAL No. 37
MILDA AGUSTIN RIVEIRA
D.C. BOGOTÁ

Firmas (Fdo.) Carol J. Gillespie

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en El Salvador, México, Estados Unidos de América y Venezuela)

Hoy el 2 de julio de 1999, el suscrito Notario CERTIFICA que:

1. Carol J. Gillespie mayor de edad y domiciliada en Miami, Florida suscribió el anterior documento.
- 2) La otorgante le es conocida personalmente por mi y tiene capacidad legal para firmar el documento.
- 3) La otorgante ha suscrito el anterior documento en su carácter de Secretario de la persona jurídica BAKER NORTON PHARMACEUTICALS INC.
- 4) La mencionada persona jurídica con domicilio comercial en Miami, Florida está debidamente constituida, tiene actualmente existencia legal y el fin para el cual se otorga este poder se encuentra dentro de su objeto social.
- 5) La otorgante tienen en efecto la capacidad referida y su representación es legal y está autorizada para otorgar este poder.
- 6) Fundamento las certificaciones 3, 4 y 5 en los siguientes documentos auténticos que para tal fin me fueron exhibidos

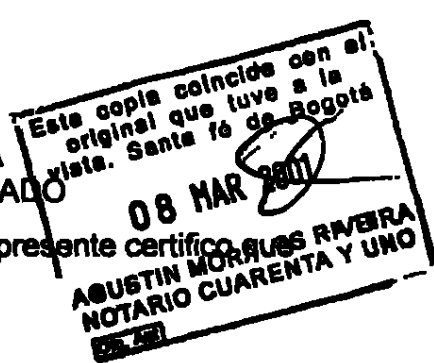
(Firmado) Carole Amster

Notario Público

(Sello: Carole Amster Notario Público Estado de Florida. Mi comisión expira: 01/08/00. Com#CC523321)

(Legalización)
ESTADO DE FLORIDA
DEPARTAMENTO DE ESTADO

Yo, Katherine Harris, Secretario de Estado, por el presente certifico
Carole Amster



69/12-7
REPRODUCCION PROHIBIDA
SIN LA AUTORIZACION DEL NOTARIO
NOTARIO PUBLICO
CAROLE AMSTER
MIAMI, FLORIDA

39 ~~40~~

y expira el

según aparezca en los archivos de esta oficina.

Katherine Harris

Secretario de Estado

GRAN SELLO DEL ESTADO DE FLORIDA - EN DIOS CONFIAMOS

(Al margen inferior del formulario aparece la leyenda: "Este documento contiene una marca artificial de agua al reversa. Manténgase a 45°. NO ACEPTAR SI NO SE VE.")

(En el margen izquierdo se lee: "Si se fotocopia o se altera químicamente, aparecerá la palabra "anulado".) (En el margen superior se lee: "Cualquier copia en blanco y negro de este documento no es oficial.") (En el margen derecho se lee: "Estado de Florida" que aparece en letras pequeñas en la cara de este documento de 8 ½ x 11")



40
41

EN ESPAÑOL: Autenticación de la firma que antecede por el Consulado de Colombia, en Miami, Número 4234 de fecha 13 de julio de 1999. Pagados los impuestos de timbre y fondo rotatorio por valor de US\$ 22.00. Legalización de la firma del Cónsul por el Jefe de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores, No. 079416 del 19 de Julio de 1999.

ES TRADUCCION 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, 21 de Julio de 1999.

Elba Aguilera de Piedra
TRADUCCION OFICIAL No. 99/131
ELBA AGUILERA DE PIEDRA
INTERPRETE OFICIAL
CER. No. 899 DEL MIN. DE JUSTICIA

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa Fé de Bogotá
08 MAR 2001
AGUSTIN MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UN (41)

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
191108
Copia prima aparece en el documento de manera las funciones indicadas

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
1999 SEP -8 8 46
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

folw 4164416
para abhucis
202002 Dec-12002

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- Descripción de la invención ☐
- Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- Representación gráfica del esquema de trazado ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-23-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia



2020
Bogotá, D.C.

Doctora
DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
Apoderada

REFERENCIA:	Radicación No.	01-18971
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1339
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

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

03 MAYO 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

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