

43
H

Clarke, Modet & Co.

COLOMBIA

E-MAIL: clarkemodet@clarkemodet.com.co
SANTAFÉ DE BOGOTÁ - A.A. 02307.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 01018971 00000002

Folios: 74

Fecha (VBI): 2001-06-29 16:20:29

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 RESPUESTA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SEÑORES
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

COD:08

REF: SOLICITUD N° 01018971 ✓

FECHA SOLICITUD: Marzo 9 de 2.001

PATENTE: PROCESO PARA PREPARAR PACLITAXEL Y 13-ACETIL-9-DIHIDROBACATÍN III

SOLICITANTE: BAKER NORTON PHARMACEUTICALS, INC.

ASUNTO: CONTESTACIÓN REQUERIMIENTO

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante, por el presente escrito doy respuesta a su Auto notificado por estado de 3 de Mayo de 2.001 que vence Julio 3 de 2.001, y me permito presentar los siguientes documentos:

- **Documento de cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante, debidamente legalizado.**
- **Copia certificada de la prioridad Estadounidense N°. 09/522625 de Marzo 10 de 2.000, junto con su traducción al español, estando dentro del término de 16 meses que exige la nueva Decisión 486 de Diciembre 1 de 2.000.**

En el evento que resultara alguna discrepancia de carácter técnico, manifiesto expresamente que el solicitante mantiene interés en la solicitud por lo que quedo a disposición de atender a las observaciones formales y técnicas que su Despacho requiera antes o durante el examen de fondo, evitando el archivo de la solicitud.

Ya que la solicitud cumple con todos los requisitos, atentamente solicito se disponga por quien corresponda la publicación de la solicitud en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Señor Jefe,

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
LCD/arr
P- 413

44

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 01/195 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 Juan Pablo Piedrahita Aguilera, Traductor e Intérprete Oficial debidamente reconocido de conformidad con el Certificado de Idoneidad Profesional No. 0045 expedido por la Universidad Nacional de Colombia.

Se traduce un documento de Documento de cesión otorgado por Jian Liu a favor de la compañía Baker Norton Pharmaceuticals Inc. y legalización escrita en inglés.

CLARKE, MODET & Co. Colombia Ltd.

Colombia

Correo Electrónico: clarkemodet@clarkemodet.com.co

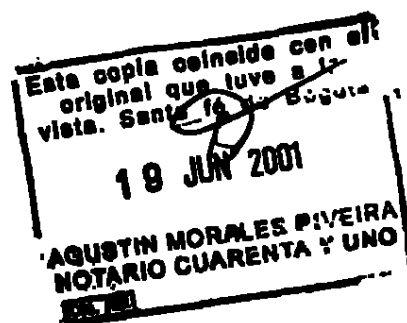
SANTAFE DE BOGOTA, A.A. 92397

COLOMBIA

CESIÓN

El suscrito Jian Liu, (en adelante el CEDENTE) en calidad de representante legal de (en blanco), con domicilio en 470 Cherry Avenue, Fredericton, New Brunswick E3A 5N9, CANADÁ, por el presente declara que cede todos y cada uno de los derechos que le correspondan sobre los siguientes registros de la siguiente solicitud de patente en Colombia:

Solicitud de Patente No. 01018971 titulada PROCESO DE FABRICACIÓN DE PACLLITAXEL Y 13-ACETL-9-DIHIDROBACCATIN III



36
45

a Baker Norton Pharmaceuticals, Inc., con domicilio en 440 Biscayne Boulevard,
Miami, Florida 33137-3227 Estados Unidos de América

El Cedente y el Cesionario firman este documento como prueba de aceptación
de la cesión.

Dada y firmada en (en blanco)

(Firmado) Ilegible

El Cesionario

(Firmado) Jian Liu

El Cedente

Dada y firmada en Fredericton NB, Canadá, hoy 2 de Abril, 2001.

(Sello Notarial a Tinta: David McMath, Notario Público)

Estado de Florida

Condado de Miami Dade

El documento Colombiano de Cesión adjunto fue juramentado y suscrito ante mi
hoy día 27 de Abril 2001 por Carol J. Gillespie, a quien conozco personalmente
y quien representa a Baker Norton Pharmaceuticals, Inc., como Secretaria.

(Firmado) Angelo J. Mignanelli, Notario Público, Estado de Florida, Mi Comisión
Expira Abril 11, 2004.

(Sello Notarial a Tinta, Angelo J. Mignanelli, Notario Público, Estado de Florida,
Comisión No. CC927096, Mi Comisión Expira Abril 11, 2004.)

01/195
TRADUCCION OFICIAL No. 01/195
JUAN PABLO PIEDRAHITA GUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Esta copia coincide con el
original que tú tienes en tu poder.
vieta. Santa Fé de Bogotá
19 JUN 2001
AGUSTIN MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

46

(Sello del Ministerio de Relaciones Exteriores del Canadá: Certificado ante el Departamento de Relaciones Exteriores y Comercio Internacional de la firma anterior de (ilegible).

(Firmado) Vice-Ministro de Relaciones Exteriores

(Este documento debe ser firmado ante Notario Público y legalizado por el Cónsul de Colombia).

Nota: Este documento debe ser otorgado ante Notario Público y legalizado por el Cónsul Colombia).

En Español, legalización de la firma anterior por el Consulado de Colombia en Ottawa, Canadá, del 25 de Mayo, 2001. Pagados el impuesto de timbre y derechos consulares por US\$22.00.

En Español, legalización de la firma del Cónsul de Colombia por el Jefe de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores No. 141038 con fecha Junio 5, 2001.

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.

Bogotá, Junio 10 de 2001.

Este copia coincide con el original que tuvo a la vista. Santa Fe de Bogotá

19 JUN 2001

AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

TRADUCCION OFICIAL
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Juan Pablo Piedrahit

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
Piedrahit
439771

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 JUN 19 A 8:47

JEB

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

CONSULADO DE COLOMBIA

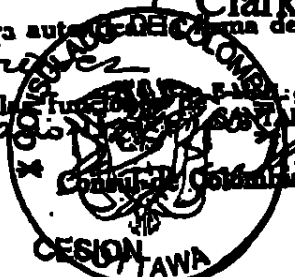
No. 22 Ottawa, Canada, a 25 de Mayo de 2001

Visto en este Consulado para autentificar la firma de

Clarke, Modet & Co.

quien en la fecha ejercia la funci6n de *Clarke, Modet & Co.*

US 22.00



Colombia

SANTAFE DE BOGOTA, A.A. 92397
COLOMBIA

P 413

10981-COF

47

141038

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
C. IDONEIDAD 15
JUAN PABLO AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
CITE: MA/MADE/EN/EL
DE: MA/MADE/EN/EL
LAST: MA/MADE/EN/EL

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD

ASSIGNMENT

The undersigned (Hereinafter THE ASSIGNOR)

Jian Liu

legal representative of

domiciled at
470 Cherry Avenue
Fredericton, New Brunswick E3A 5N9
CANADA

do hereby declare that it assigns all and each of its rights and privileges on the following

Patent Application No. 01018971 entitled
PROCESS FOR MANUFACTURING PACLITAXEL
AND 13-ACETYL-9-DIHYDROBACCATIN III

to
Baker Norton Pharmaceuticals, Inc.

with domicile in 4400 Biscayne Boulevard
Miami, Florida 33137-3227 U.S.A.

As a proof of the mutual acceptance of this assignment, both parties ASSIGNOR and ASSIGNEE sign the present document.

Granted and signed at

on this day of 2001

El (a) abajo firmante (En adelante EL CEDENTE)

en su calidad de representante legal de

con domicilio en:

por el presente documento declara que cede todos y cada uno de los derechos que le corresponden o puedan corresponderle sobre la siguiente en Colombia:

con domicilio en

En prueba de la mutua aceptaci6n de esta ceder6n ambas partes CEDENTE y CESIONARIO firman el presente documento.

Dado y firmado en

A los Días de De

Caroly
Esta copia coincide con el original que tuve a la vista en la ciudad de Bogot6
El Cedente / The Assignor
(Baker Norton Pharmaceuticals, Inc.)
AGUSTIN MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

El Cedente / The Assignor

Este documento debe ser otorgado ante Notario p6blico y legalizado por el C6nsul de Colombia) o por Apostille

(This document must be signed before Notary Public and legalized before the Colombian Consul) or by Apostille

Certified at the Department of Foreign Affairs and International Trade for Legalization of the Foreigning Signature of:
Certifi6 au Minist6re des Affaires 6trang6res et du Commerce international aux fins de l6galiser la signature ci-dessus de:
[Signature]
Deputy Minister of Foreign Affairs
Sous-Ministre des Affaires 6trang6res

[Signature]
(Jian Liu, The Assignor)

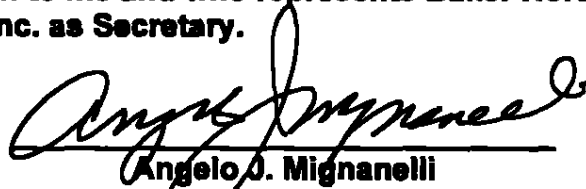
Signed at Fredericton, NB, Canada
THIS 2nd DAY OF MAY 2001

DAVID MCALPIN
NOTARY PUBLIC
NEW BRUNSWICK

48 #4

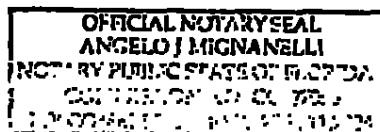
STATE OF FLORIDA
COUNTY OF MIAMI DADE

The attached Colombian Assignment Document was sworn to and subscribed to me this the 27th day of April 2001 by Carol J. Gillespie, who is personally known to me and who represents Baker Norton Pharmaceuticals, Inc. as Secretary.

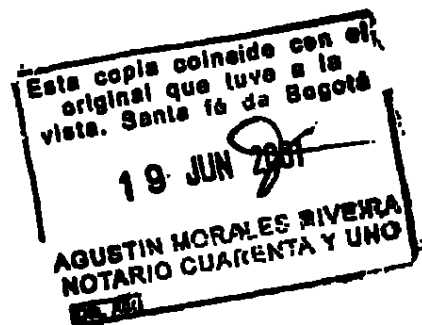


Angelo J. Mignanelli
Notary Public
State of Florida

My Commission Expires April 11, 2004



01/135
TRADUCCION OFICIAL
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



P. 413 49 

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 01/ 194 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 Juan Pablo Piedrahita Aguilera, Traductor e Intérprete Oficial debidamente reconocido de conformidad con el Certificado de Idoneidad Profesional No. 0045 expedido por la Universidad Nacional de Colombia.

(Se traduce la Certificación de la Solicitud de Patente de Utilidad No. 09/522,625, de Jian Liu, el Capítulo Descriptivo y el Capítulo Reivindicatorio correspondientes, escritos en inglés)

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

Marzo 15 de 2001

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 LOS DOCUMENTO DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADOS 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: 09/522,625

TRADUCCION OFICIAL No. 01/194
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

50 

FECHA DE SOLICITUD: 10 de Marzo de 2000

Por autoridad del

COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS

(Fdo.) W. MONTGOMERY,

Funcionario que Certifica

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

(Al margen izquierdo en todas las hojas sello a tinta: 09522625.031000)

**(Al margen izquierdo: jc598 Oficina de Patentes y Marcas de los Estados
Unidos, Código de Barras, 03/10/00)**

**(Al margen derecho: jc690 Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos,
09/522625, Código de Barras, 03/10/00)**

EN LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

Expediente No. 98292-US

PATENTE DE UTILIDAD

CARTA DE TRANSMISION DE SOLICITUD

CASILLA DE SOLICITUD DE PATENTE

Comisionado de Patentes

Washington, D.C. 20231

Señor:

Se transmite aquí es la solicitud para la patente de utilidad de Jian Liu para

51 ~~7~~
AC

PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE PACLITAXEL Y 13-ACETIL-8-DIHYDROBACCATIN III.

Se anexan:

☐ ___ hojas de ☐ dibujos formales ☐ informales ☐
☐ Una reivindicación para prioridad extranjera bajo 35 U.S.C.
119/365 en

☐ documento separado ☐ la declaración
☐ Copia certificada del documento de prioridad
☐ El poder correspondiente
☒ ___1___ declaración verificada de la condición de entidad
pequeña

La declaración de los inventores se incluye ☒ se presentará
después ☐

Los derechos de solicitud se han calculado como sigue:

A. Tasa Básica de solicitud	\$ 690.00
B. Total de Reivindicaciones <u>15</u> menos 20 = __x \$18.00	= \$ - -
C. Independientes	
Reivindicaciones <u>2</u> menos 3 = __x \$78.00	= \$ - -
D. Si se presentan varias reivindicaciones dependientes, sumar	= \$ - -
\$270.00	
E. Total del valor de los derechos de solicitud (Total A, B, C & D)	= <u>\$ 690.00</u>
F. Si se adjunta la declaración de condición de entidad pequeña, se aplica el cincuenta por ciento de reducción en el valor total de Derechos de Solicitud (50%x E)	= <u>\$ 345.00</u>
G. Costo de Derechos de Solicitud a pagar (E menos F)	= <u>\$ 345.00</u>
H. Costo de Derechos de Registro de Cesión de \$40.00 si se adjunta el documento de cesión	= \$ - -
I. TOTAL DERECHOS (G mas H)	= <u>\$ 345.00</u>

52 ~~70~~
87

[X] Se adjunta un cheque por valor de \$ 345.00

[] Cargo de \$ _____ a la cuenta de Depósito No. 13-1717

El Comisario por el presente está autorizado para cargar cualesquiera derechos adicionales que puedan requerirse bajo 37 C.F.R. SSI.16, 1.17 y 1.21 que se puedan requerir por este documento, o acreditar cualquier sobrepago a la Cuenta de Depósito No. 13-1717. Se adjunta una copia de este documento.

Respetuosamente Presentado,

Paul Sharpe

Marks & Clerk

P.O. Box 957, Estación B

Ottawa, Ontario, Canadá K1P 5S7

Por: (Firma ilegible)

Teléfono: (613) 236-9561

Paul Sharpe, Reg No. 39,493

PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE PACLITAXEL Y 13-ACETIL-9-DIHDROBACCATIN III

CAMPO DE LA INVENCION

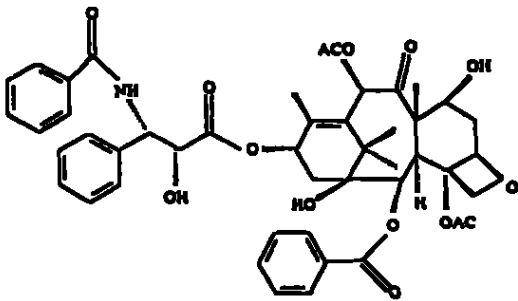
La presente invención se refiere a la producción de paclitaxel a partir del tejo del pacífico, tejo ornamental, u otras especies de tejo, agujas, cortezas y raíces y en particular, la presente invención se refiere a un proceso para extraer paclitaxel económicamente, el cual actualmente es extraído por medio de un

proceso de alto costo debido al gran porcentaje de impurezas no deseadas que se transportan hasta el extracto durante la extracción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 En el estado de la técnica se describe un método de extracción (Periódico de Productos Naturales 53, 1249-55, 1990), el cual reporta un contenido de paclitaxel en el extracto en un rango de entre 0.009% y 0.07%. Después de remover las impurezas solubles de hexano (ceras, pigmentos, etc.) y después de la separación entre agua y diclorometano, la concentración de paclitaxel
10 presente en el extracto crudo soluble de diclorometano estuvo en el rango entre 0.03% y 0.3% en peso. El paclitaxel (Taxol) se representa por medio de la siguiente fórmula estructura:

15



Paclitaxel

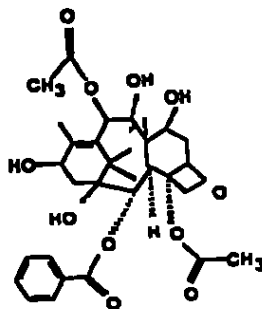
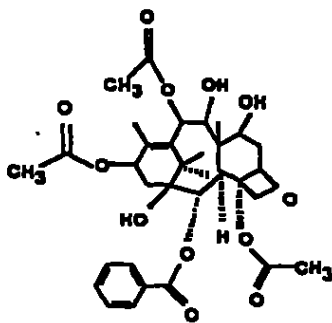
Es un compuesto anticáncer. El Paclitaxel muestra exhibe un mecanismo único que previene el crecimiento de células cancerosas al afectar los microlóbulos, los cuales juegan un papel muy importante en la división celular y otras funciones celulares.

15

El paclitaxel es clínicamente efectivo para el tratamiento de retractoriedad en ovarios humanos y cáncer de seno y ha exhibido actividad promisorio en contra de otro tipo de cáncer como de hígado, peritoneal, cervical, de próstata, colon, y esófago.

El paclitaxel se extrajo en sus principios de la corteza del tejo del pacífico Taxus brevifolia. Lamentablemente, el tejo crece muy despacio, aproximadamente ocho pulgadas por año y por lo tanto la corteza es un recurso limitado de paclitaxel. Esto condujo a investigadores a buscar medios alternativos para la producción de paclitaxel y sus análogos, los cuales pueden exhibir una actividad antitumor superior, tal como los derivados de 9-dihidrotaxol los cuales tienen una mejorada solubilidad en agua. Como ejemplo, el 13-acetil-9-dihidrobacatina III, un diterpeno de taxano, se ha encontrado ser un precursor muy útil para prepara dichos análogos. Esto ha sido discutido en la patente U.S.No.5,440,056, expedida a Klein et al., Agosto 8 de 1995.

13-acetil-9-dihidrobacatina III y bacatina III se representan por medio de las siguientes formulas estructurales:



54 7/8

13-acetil-9-dihidrobacatina III

Bacatina III

Esto se puede obtener a partir de, por ejemplo, *Taxus canadensis* el cual
5 es mas ampliamente distribuido que el *Taxus brevifolia*. Por lo tanto, el 13-
acetil-9-dihidrobacatina III esta disponible mas abundantemente que el
paclitaxel.

Los métodos convencionales para el aislamiento de taxanos, incluyendo
10 el paclitaxel, el 13-acetil-9-dihidrobacatina III, y bacatina III generalmente incluye
los pasos de extracción de taxanos a partir de una biomasa con un solvente
alcohólico y separación y purificación del taxano individual por medio de
cromatografía.

15 Los métodos del arte anterior divulgan el uso de varios tipos de
tecnologías cromatográficas para separar paclitaxel y derivados del mismo. Por
ejemplo, la patente U.S. No.5,380,916, expedida a Rao, en Enero 10 de 1995,
describe un proceso que utiliza cromatografía de fase líquida invertida C18.
Aunque la cromatografía de fase invertida puede ser exitosa en la separación
de taxanos, este protocolo emplea un absorbente costoso y requiere de una
inversión significativa de tiempo. En esta forma, este proceso no es
económicamente ni industrialmente viable.

55 14 21

La patente U.S. No.5,478,736, expedida a Nair en Diciembre 28 de 1995 presenta un proceso usando cromatografía de absorción de fase normal de sílice gel para purificar los taxanos. En una cromatografía de absorción de fase, Al_2O_3 o sílice gel es utilizado como un absorbente el cual es aproximadamente 5 100 veces menos costoso que el absorbente ordinario de fase invertida. El problema para la cromatografía de absorción de fase normal de sílice gel es que el absorbente se unirá con el paclitaxel, el cual no será diluido por la mezcla de solventes y por lo tanto el rendimiento del producto es reducido.

10 La patente U.S. No. 5,530,020, emitida a Gunarvardana et al., en Junio 25 de 1996 divulga un proceso para el aislamiento de 13-acetil-9-dihidrobacatina III a partir de Taxus canadensis el cual emplea cromatografía de serpentín planeta a contracorriente (PCC por su sigla en ingles Planet Coil Countercurrent Chromatography). Algunas de las desventajas asociadas con 15 este procedimiento es que complejo, consume cantidades significativas de solvente y puede ser utilizado solamente para purificar pequeñas cantidades (miligramos) o muestras.

Hasta ahora la cromatografía de columna distribuida para separar y purificar paclitaxel y taxanos relacionados no ha sido divulgada.

RESUMEN DE LA INVENCION

01 / 194
TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA 20

36189

Un objeto de la presente invención es suministrar un método mejorado para aislar taxanos, particularmente paclitaxel, 13-acetil-9-dihidrobacatina III, a partir de especies de taxus.

5 Un aspecto de la presente invención, es suministrar un método para aislar taxano a partir de un extracto crudo de una especie de taxus que comprende el paso de someter el extracto crudo a una cromatografía de columna seca y cromatografía de columna distribuida.

10 El método de la presente invención puede ser puesto en práctica a escala de un pequeño laboratorio así como a escala industrial.

Convenientemente el taxano se obtiene por medio de extracción de un material botánico con un solvente alcohólico a reflujo. Preferiblemente la
15 columna a ser utilizada con el método de la presente invención incluye un tubo de nailon empacado con sílice gel pretratada, teniendo un tamaño de microesfera de entre malla 150 y malla 250 para utilizarla como cromatografía de distribución de columna seca.

Una columna de vidrio empacada con una sílice gel pretratada que tiene un tamaño de partícula de entre malla 150 y malla 250 para ser utilizada como cromatografía de columna distribuida húmeda.

57 *[Handwritten signature]*

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

5

En otra modalidad de la invención, el 13-acetil-9-dihidrobacatina III puede ser purificado por medio de cromatografía de distribución de columna seca con solventes de hexano diluido y acetato de etilo (4:6).

10

En otra modalidad de la invención el paclitaxel puede ser más purificado por medio de cromatografía de columna de fase distributiva normal. Preferiblemente el solvente diluido para esta etapa es hexano: acetato de etilo (comenzando desde 6:4 terminando a 3:7). Esta cromatografía puede ser repetida varias veces si es necesario.

15

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se suministra un método para obtener taxanos a partir de especies de Taxus que incluyen, pero no se limitan a I. brevifolia, I. baccata, I. cuspidata, I. canadensis, I. wallichiana, I. chinensis, I. funanensis, I. X media ov. densiformis y I. X media ov. Hicksii.

El proceso comprende las etapas de extracción de un recurso de material utilizando solvente alcohólico, concentrando el extracto alcohólico para obtener

58 / 80

el residuo que contienen taxanos, dividiendo el residuo entre agua y CH_2Cl_2 , luego concentrando el CH_2Cl_2 .

Se disuelve para obtener un residuo rico en taxano, se separan los taxanos en fracciones que contengan taxano por medio de someter el residuo rico en taxano a cromatografía de distribución de columna seca en una columna cromatográfica seca, y recuperando cualquier taxano individual de la columna.

En otra modalidad de la presente invención el paclitaxel y baccatina III puede ser mas purificada por medio de las etapas de cristalización del 3-acetil-9-dihidrobaccatina III fuera de la solución que contiene taxano con un solvente alcohólico para obtener 3-acetil-9-dihidrobaccatina III y purificar la solución que contiene paclitaxel por medio de una cromatografía de distribución de columna de fase normal.

15

Las ventajas de la presente invención son el suministrar un método para el aislamiento de taxanos el cual es rápido, fácil de llevar a cabo, rentable y eficiente económicamente, tanto en producciones a pequeña y mediana escala.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

El material de partida para la presente invención es un material botánico seleccionado de especies de taxus, particularmente *Taxus canadensis*.

59 TB
6

Los taxanos pueden ser obtenidos a partir de las cortezas, las agujas, las raíces, los tallos, y madera o mezcla de los mismos preferiblemente, las ramitas agujas o mezcla de las mismas se utiliza. La biomasa utilizada puede estar seca o fresca.

5

La biomasa se muele y se extrae con un solvente polar como alcohol, preferiblemente metanol. Las extracciones continúan a reflujo por tres horas y se filtran. El residuo se extrae de nuevo a reflujo por dos horas y se filtra. El extracto se combina y se concentra hasta aproximadamente 5% del volumen original por medio de evaporación. El contenido de paclitaxel en este concentrado está entre 0.2% y 0.3 % por porcentaje de área de HPLC (por su sigla en ingles High Phase Liquid Chromatography). Aproximadamente 2 cantidades iguales de agua se adicionan al concentrado. La solución acuosa se extrae muchas veces con diclorometano y luego en la fase acuosa se descarga.

10

15 La capa orgánica se concentra a un volumen menor. El contenido de paclitaxel en este residuo es de aproximadamente 1%. El residuo se somete a cromatografía de distribución de columna seca.

La cromatografía de columna seca (DCC por su sigla en ingles Dry Column Chromatography) suministra un método alternativo a la cromatografía de capa delgada (TLC por su sigla en ingles Thin Layer Chromatography) y cromatografía de columna preparativa. El costo es mucho menor comparado con la cromatografía preparativa líquida (LC por su sigla en ingles liquid

60 14
58

chromatography). Muestras que son separables en sílice gel o alúmina neutral en TLC de platos puede también ser separada por medio de DCC. Una de las ventajas del DCC es la transferabilidad directa de las condiciones de TLC a DCC. Todo el trabajo que se realiza para determinadas condiciones de preparación de las muestras en DCC pueden realizarse preliminarmente en TLC de platos. Una vez determinadas estas condiciones pueden ser aplicadas al DCC el cual ofrecerá un grado de separación similar al que se obtiene con el plato de capa delgada. El DCC suministra mas ventajas dado que el número de fracciones a ser procesado depende del numero de cortes hechos el cual usualmente no excede los 15 y mas a menudo no excede los 10 cortes, lo cual esta en contraste con las columnas de "flujo líquido", las cuales pueden requerir un mayor (>50) número de fracciones a ser recolectadas. Otra ventaja del DCC es el uso de tubo de nailon como columna y absorbentes fluorescentes lo cual suministra procedimientos de detección y aislación simplificados. Por lo tanto, comparado con la cromatografía de columna " llena de líquido", la cromatografía de columna seca es normalmente una técnica mas rápida, mas fácil y menos costosa.

El proceso para cromatografía de columna seca esta representado generalmente en "Progress in Separation and Purification", Marjorie, M., E.S. Perry y C.J. Van Oss Ed., John Wiley & Hermanos, 1979, Volumen 3, páginas 73 - 95.

En resumen, los procedimientos generales para llevar a cabo la cromatografía de columna seca incluyen el uso de una columna que incluye un tubo de nailon, pero otros tipos de tubo como vidrio pueden ser utilizados. El tubo se coloca en acetona por una noche y se deja secar por acción del aire para remover cualquier solvente. La columna se prepara por medio de sellar el tubo en un extremo e insertar una pequeña almohadilla de algodón o lana de vidrio desde el otro extremo. El extremo sellado del tubo se perfora para el suministro de ventilación, y se empaca en seco con trióxido de alúmina o sílice gel hasta cuando este lo suficientemente rígido para estar vertical en la abrazadera. La muestra puede ser vertida directamente dentro del tubo o disuelta en un pequeño volumen de solvente del utilizado para desarrollar, y luego distribuido uniformemente en la parte superior de la columna. Alternativamente la muestra puede ser recubierta en una pequeña cantidad de absorbente secada y molida y luego adicionada a la parte superior de la columna. La muestra se pasa hacia la parte de debajo de la columna con un solvente diluyente. Una cabeza de líquido constante de solvente de aproximadamente de 1 o 2 centímetros debe ser mantenida todo el tiempo. La columna nunca debe estar seca.

Se ha encontrado que el proceso de la presente invención requiere de 3 a aproximadamente 5 horas para completar la separación de los compuestos deseados. Aunque, el tiempo de separación es mas lento que el usual en el proceso a la pequeña escala de laboratorio. El DCC es aun una técnica mas

rápida que la cromatografía de "líquido lleno" la cual puede tomar tres o cinco días para ser completada. La separación se logra a medida que la mezcla corre hacia debajo de la columna. Cuando la mezcla alcanza la base de la columna, el desarrollo se detiene y los extremos de la columna se sellan. Los numerosos

5 componentes del extracto pueden ser identificados por medio de bandas separadoras las cuales pueden ser detectadas, por ejemplo, por medio del método UV o visible. La columna se corta luego en las secciones deseadas y los compuestos puros se diluyen con solventes adecuados.

10 La presente invención puede ser aplicada mejor usando una columna de nailon. El trióxido de alúmina o sílice gel son agentes de soporte adecuado, aquí se ha preferido la sílice gel. En cromatografía de absorción, la sílice gel contiene grupos de silihidroxido los cuales se unen con los grupos polares del soluto. Así, los compuestos mas polares se mueven mas lentamente a través

15 de la columna que los compuestos menos polares. En la cromatografía de fase inversa la superficie de la sílice gel han sido modificadas por medio de varios grupos funcionales, los cuales se unen con los grupos no polares del soluto. Así los compuestos más polares se mueven más rápido a través de la columna que los compuestos menos polares. Las desventajas de la cromatografía de fase inversa son que el proceso es mas costoso y consume más tiempo que la cromatografía de fase normal. Pero ambos procesos pertenecen a la cromatografía de absorción.

63 *Handwritten initials*

La cromatografía de absorción de fase normal es tal que el paclitaxel no se separa limpiamente, el proceso necesita ser repetido por lo menos 10 veces para alcanzar la pureza final del paclitaxel debido al gran número de impurezas en el extracto crudo.

5

La presente invención utiliza un nuevo proceso de cromatografía, el cual se denomina cromatografía de distribución de fase, para separar y purificar paclitaxel y taxanos relacionados.

10

En esta cromatografía de columna distributiva, la sílice gel utilizada es pretratada con formamida. Los grupos (-SiOH) de la sílice gel se han unido con (H-C=O-NH₂) por medio del enlace con hidrogeno o las fuerzas de Van der Waals entre los grupos -SiOH y H-C=O-NH₂. Así la sílice gel a perdido sus propiedades de absorción y se utiliza solamente como vehículo de la formamida

15

(FAM).

El material a ser separado se distribuirá entre la formamida y el solvente diluyente de acuerdo con su polaridad. El comportamiento de la cromatografía es similar al de la cromatografía de fase normal y así los compuestas mas polares se mueven mas lentamente a través de la columna que los compuestos menos polares.

Para la cromatografía de columna distributiva seca:

La sílice gel o trióxido de alúmina se trata de acuerdo con el siguiente método:

5 1) La sílice gel a ser utilizada se mezcla con exceso de 10% hasta aproximadamente 15% de FAM en Me_2CO , la mezcla se agita por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se filtra. El filtrado se concentra para recuperar el solvente, el residuo se descarga.

10 2) La sílice gel luego se secó por medio de aire para remover todo el solvente. La sílice gel secada por aire está lista para ser utilizada.

Para la cromatografía de columna distributiva húmeda:

15 La sílice gel a ser utilizada se mezcla con exceso en 10% y 15% de formamida en acetona. La mezcla se agita por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se verte en la columna. Los solventes en exceso se fluyen a través de la columna hasta que aproximadamente 1 centímetro a 2 centímetros del solvente de cabeza esta sobre la cama de sílice gel empecada. La columna se mantiene a temperatura ambiente por unas horas antes de adicionar las muestras en la parte superior de la columna.

La presente invención puede ser mejor aplicada usando columnas de nailon. El trióxido de alúmina o la sílice gel son vehículos adecuados la sílice gel ha sido preferida.

La sílice gel normalmente tiene un grupo funcional de -SiOH alrededor de su superficie. Cuando se trata con H-C=O-NH_2 (formamida), algún tipo de enlaces hidrógenos se forman entre el grupo funcional -SiOH y la formamida, así como otras fuerzas interactivas, por lo tanto, la sílice gel no mantiene mas sus propiedades de absorción, es un vehículo de la formamida solamente. En la superficie de la sílice gel, se forma una fina película de formamida, lo cual se denomina fase estacionaria.

- 10 La cromatografía de distribución difiere de la cromatografía de absorción tradicional. En la cromatografía de absorción tradicional el sistema consiste de absorbente (fase estacionaria), solventes diluyentes (fase móvil) y soluto, por lo tanto el sistema es un sistema de tres componentes. En la cromatografía de distribución, el sistema de cromatografía consiste en un soporte (vehículo), un
- 15 solvente polar (fase estacionaria), solventes diluyentes (fase móvil) y soluto por lo tanto, el sistema es un sistema de cuatro componentes.

El mecanismo de separación es diferente en los dos sistemas de cromatografía. En la cromatografía de absorción el material se separa como resultado de etapas repetidas de sorción/desorción durante el movimiento de los componentes de la muestra a través de la cama estacionaria, y la separación se alcanza debido a las diferencias en las constantes de equilibrio de sorción/desorción de los componentes de las muestras individuales.

66 25
18

En la cromatografía de distribución el material a ser separado, se separa como resultado de la diferente distribución en las dos fases del líquido insolubles, y la separación se alcanza debido a las diferencias de las constantes de distribución en las dos fases de líquido insolubles de las muestras de los componentes individuales.

Generalmente, la cromatografía de distribución se utiliza para separar componentes polares tales como azúcares, péptidos, glicosidas y otros componentes polares.

En la presente invención se ha encontrado que la cromatografía de distribución alcanza una excelente separación para taxano diterpeno con relación a la cromatografía de absorción, incluyendo cromatografía de fase normal y fase inversa.

La presente invención puede ser practicada mejor utilizando columna de nailon empacada en seco con sílice gel pretratada para el aislamiento de 13-acetil-9-dihidrobacatina III. La sílice gel tiene un tamaño de microesfera de entre malla 150 y malla 250. Las dimensiones de la columna son 12 pulgadas por 120 pulgadas. La cantidad de sílice gel requerida es, en turno, determinada por medio del lado de la muestra. Cuando se practica la separación por medio de cromatografía de columna seca de distribución de la presente invención, se ha

67 20
64

encontrado que la cantidad de tamaño de muestra a la cantidad de sílice gel requerida para separar los taxanos esta entre 1:15 y 1:20, deseablemente 1:20. Por lo tanto, la cantidad de sílice gel que se necesita es de aproximadamente 15 a 20 veces, y deseablemente 20 veces de la cantidad de muestra. Las anteriores proporciones han sido las óptimas con respecto al costo y al grado de separación. Por medio de aumentar la cantidad de sílice gel utilizada se incrementara en costo lo cual puede ser sustancial en procesos a gran escala. Por otro lado, la reducción de la cantidad de sílice gel resultara en una separación pobre.

10

Habiendo descrito las técnicas de cromatografía de distribución de columna seca y las condiciones adecuadas para la siguiente invención, seguirá un experimento preferido del método para aislar taxanos de acuerdo con la presente invención.

15

El extracto de diclorometano crudo se separa en varios taxanos individuales por medio de cargar el extracto crudo en la parte superior de la columna, y adicionar una mezcla de solventes de hexanos y acetato de etilo (4:6) allí mismo. Una vez el solvente alcanza el fondo de la columna, la dilución se detiene y el tubo de nailon se cierra, luego la columna se divide en varias secciones. Los compuestos de las secciones divididas se lavan con un solvente polar como alcohol, tal como metanol. Los taxanos individuales fueron identificados por medio de TLC.

68 *[Handwritten signature]*

El 13-acetil-9-dihidrobacatina III se obtiene por medio de cristalización a partir de metanol. La cristalización normalmente continua por la noche a temperatura ambiente.

5

El paclitaxel se separa de los otros taxanos por medio de purificación como sigue. Las fracciones se analizan por medio de TLC. El paclitaxel muestra un punto de color púrpura verde y el 13-acetil-9-dihidrobacatina III muestra un punto de color verde oscuro en el plato TLC por medio de esparcir una solución de H_2SO_4 al 10% en etanol.

10

Las fracciones que contienen paclitaxel se combinan y se concentran hasta que se sequen y el residuo se disuelve con CH_2Cl_2 . La solución de CH_2Cl_2 se purifica por medio de cromatografía de distribución de columna húmeda. La columna se empaca con sílice gel pretratada que tiene un tamaño de microesfera de entre malla 150 y malla 250, y opera a una presión de 30 p.s.i. Diluyentes útiles para la presente invención pueden ser seleccionados de la mezcla de hexanos y acetato de etilo o de los textos estándares de cromatografía, por ejemplo, hexanos y acetona.

15

Un sistema de solvente gradiente de hexanos y acetato de etilo, en una proporción de hexanos a acetato de etilo de aproximadamente 5:5 a 3:7 se encontró ser particularmente útil para el propósito de separar paclitaxel de

taxanos relacionados cercanos. Los taxanos que contienen fracciones se colectan desde la columna y el que contiene paclitaxel se combina y se concentra para remover el solvente. El residuo fue disuelto en metanol y aproximadamente 30% equivalente de agua se adicionó. La solución acuosa se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche, los cristales formados se filtraron hacia fuera y se secaron en un horno al vacío a 70°C. El paclitaxel se obtiene como un polvo de color crema.

Las fracciones que contienen bocatina III se combinan y se concentran hasta que se sequen. El residuo se disuelve en metanol. La solución de metanol se mantiene en el refrigerador por una noche. La bocatina se obtiene como un cristal blanco, el cual se vuelve a recrystalizar por medio de disolver los sólidos en pequeños volúmenes de acetona. La solución de acetona se diluye con el equivalente de hexanos y la mezcla se deja reposar a temperatura ambiente por una noche para producir bocatina III como cristales blancos de forma de agujas.

EJEMPLO 1

A aproximadamente 350 kilogramos de agujas y ramas molidas secas de *Taxus canadensis* en un extractor multifuncional e Industrial se añadieron 1200 litros de etanol. La mezcla se puso a reflujo por tres horas y se filtro. La materia prima se puso luego a reflujo por dos horas con 900 litros de metanol y luego la solución de metanol se filtro de nuevo. El filtrado se combinó y concentró a

70 24 22

aproximadamente 150 litros bajo vacío en un evaporador de aspersión, luego un equivalente de agua se añadió para diluir el concentrado. La solución acuosa fue dividida entre agua y cloruro de metileno (450 L, 1:1) en un reactor de 1000 L en cual esta equipado con un agitador eléctrico.

- 5 La mezcla se agitó durante 5 minutos a una velocidad de 80/min, y luego se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora o hasta que la mezcla se divida en dos capas. La capa orgánica se recolectó y la capa acuosa se extrajo dos veces más con 400 litros de cloruro de metileno (200 litros cada vez). La solución de cloruro de metileno se combinó y concentró en un evaporador de
- 10 capa fina el cual esta equipado con dos separadores de ciclón bajo vacío para convertirse en una forma de lodo.

EJEMPLO 2

- A Aproximadamente 70 kilogramos de sílice gel en un mezclador de 500
- 15 litros equipado con un agitador eléctrico, se añadieron 250 litros de formamida en acetona al 15%, y la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente, luego la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por otros 30 minutos y se filtró. La sílice gel sólida se recolectó y se dejó secar al aire en un secador de compartimentos, el filtrado se concentró para recuperar el solvente, la acetona y el exceso de formamida.

EJEMPLO 3

Cromatografía de columna de distribución seca

71 20
AB

La sílice gel pretratada del ejemplo 2 se empaqueta en un tubo de nailon que tiene dimensiones de 9 pulgadas por 120 pulgadas con un espesor de pared de aproximadamente 0.1mm. La sílice gel utilizada tiene un tamaño de microesfera de entre malla 150 y malla 250. La columna de nailon se colocó luego en una

5 columna del mismo tamaño de acero inoxidable para soportar el peso de la columna de nailon. El diluyente utilizado fue una mezcla de hexano y acetato de etilo (4:6), se puede utilizar otro solvente orgánico que sea insoluble en formamida.

10 La muestra del ejemplo 1 (6 kg, aproximadamente 60% de masa sólida) se diluyó con 5 litros de acetato de etilo, y luego se colocó en la parte superior de la columna de nailon, y la columna se sometió a cromatografía de columna de distribución seca.

15 La columna se desarrolló con hexanos: acetato de etilo (4:6), teniendo cuidado de mantener una constante de uno o dos centímetros de cabeza de líquido todo el tiempo, una vez el diluyente alcanza el fondo de la columna, el desarrollo de la columna se detuvo. La columna de nailon se retiró de la columna de soporte de acero inoxidable y luego se cortó en 15 porciones. Cada porción fue chequeada por medio de análisis TLC (las muestras fueron esparcidas con H_2SO_4 al 10% en etanol seguido de calentamiento a 100-105°C durante unos minutos). Se encontró que el 13-acetil-9-dihidrobacatina III y la bacatina III se mueven más rápido que el paclitaxel a través de la columna y el

comportamiento cromatográfico en la cromatografía de distribución difiere de la cromatografía de absorción de fase normal y es similar a la cromatografía de absorción de fase inversa.

5 Las porciones que contienen 13-acetil-9-dihidrobacatina III, bacatina III, y paclitaxel se colocaron dentro de columnas de vidrio cortas de 6 pulgadas y se lavaron con metanol, respectivamente. Las soluciones de metanol fueron recolectadas y luego concentradas a sequedad separadamente.

10 La porción de residuo de 13-acetil-9-dihidrobacatina III se disolvió en una pequeña cantidad de (la cantidad de metanol fue lo suficientemente buena para disolver el residuo a 60°C), y la solución de metanol se enfrió a temperatura ambiente y luego se mantuvo a temperatura ambiente por una noche a temperatura ambiente. Los cristales formados fueron filtrados y lavados con
15 acetona y luego secados en un horno al vacío a 80°C para producir el 13-acetil-9-dihidrobacatina II, como cristales de forma de agujas (aproximadamente 120 g), lo cual se identifica por medio de espectroscopia (NMR por su sigla en inglés: Nuclear Magnetic Resonance).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.07 (d, 2H, 2¹, 6¹-Ar-H), 7.58 (dd, 1H, 4¹-Ar-H), 7.45 (dd, 2H, 3¹, 5¹-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).

73 22

2.51 (ddd, H-6a), 2.28(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-CH₃), 1.79(S, 19-CH₃), 1.66(S, 18-CH₃), 1.23(S, 17-CH₃) ppm.

5 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.55, 170.48, 169.38, 167.00, 139.58, 134.68, 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, 14.66, 12.48, ppm.

10 EJEMPLO 4

Cromatografía de Absorción de fase normal

La porción de residuo que contiene la bacatina del Ejemplo 3 se disolvió en una pequeña cantidad de diclorometano (solamente una cantidad suficiente para disolver el material al calentamiento del solvente), luego la solución de diclorometano se sometió a cromatografía flash de fase normal. Una columna de vidrio de 10 cm por 150 cm fue utilizada. La columna empaçada con sílice gel (malla 150 y malla 250). El solvente de dilución fue un sistema de gradiente decreciente de hexano y acetona (empezando desde 70:30 y progresando a 45:45). Se recolectaron fracciones de 1000 ml. Las fracciones que contenían bacatina III fueron combinadas y concentradas hasta sequedad. El residuo se disolvió en 1000 ml de metanol y se mantuvo a temperatura ambiente por una noche. Se formaron cristales blancos. Los cristales fueron filtrados y

74 23-
96

recristalizados a partir de metanol. 23 g de cristales blancos fueron obtenidos e identificados por medio de comparación con una muestra de referencia sobre HPLC como bacatina III.

5 EJEMPLO 5

Cromatografía de distribución de fase normal

La porción de residuo que contiene paclitaxel del ejemplo 3 se disolvió en una pequeña cantidad de acetato de etilo y se diluyó con una pequeña cantidad de hexano. 20 kg de sílice gel fueron tratados tal y como se describe en el ejemplo 1 y luego se mezclaron con 40 litros de solventes mezclados de hexano y acetato de etilo (6:4), luego la mezcla se vertió en una columna preparativa de baja presión de 15 cm por 150 cm. El exceso de solvente se permitió salir hasta que 1 cm de solvente de cabeza permaneciera en la parte superior de la columna. La solución muestra fue adicionada cuidadosamente a la parte superior de la cama de sílice gel. La columna fue luego diluida con un sistema de solvente de gradiente de hexano y acetato de etilo (empezando desde 6:4 y terminando en 3:7). Se recolectaron fracciones de 2000 ml cada una, y la velocidad de flujo estuvo entre 75 ml/min y 100 ml/min.

Las fracciones que contenían paclitaxel fueron combinadas y concentradas para remover la mayor parte del solvente, el residuo fue luego disuelto en metanol (1500 ml). A la solución de metanol se le adicionó aproximadamente 30% del volumen de agua, luego la solución acuosa se

75 24
27

mantuvo a 5°C por una noche. El sólido de crudo cristalino de la solución de metanol acuosa se filtró y secó en un horno al vacío a una temperatura de entre 75°C y 80°C. El sólido consistía de aproximadamente 70% de paclitaxel y 23% de cefalomanina y otros taxanos no identificables. La producción fue 66g.

5

EJEMPLO 6

Cromatografía de Absorción macrorreticular de resina adsorbente

Se disolvieron 50 g de paclitaxel crudo del ejemplo 5 en 350 ml de acetona, luego se mezclaron con 200 g de resina de co-polímero de polimetilacrilato de divinilo. La mezcla se colocó en un matraz de fondo redondo y luego evaporado sobre un evaporador rotatorio para remover la acetona. El material recubierto luego fue colocado en la parte superior de la columna preparativa a baja presión. El tamaño de columna es de 100 cm por 150 cm y empacada con resina de co-polímero de polimetilacrilato de divinilo. El tamaño de partícula de la resina polimérica es entre 75µm y 150µm. La resina copolimérica fue preparada a partir de Amberlite® IRP64. Después que la mezcla se adicionó, la abertura superior de la columna se selló y se diluyó con una etapa de gradiente de mezcla de solvente de acetona y agua (empezando acetona:agua 3:7 y terminando a 65:35). La columna fue operada bajo presión de 30 p.s.i. El cambio de solvente fue supervisado por medio de los resultados de TLC y los resultados analíticos de HPLC de las fracciones.

76 

Se recolectaron fracciones de aproximadamente 1000 ml/cada una y se supervisaron por medio de análisis TLC y análisis HPLC. La velocidad de flujo fue 100 ml/min. Las fracciones que contenían paclitaxel se combinaron y se dejaron reposar a 5°C hasta que la cristalización del compuesto se completó.

5

Los cristales se filtraron y se recrystalizaron a partir de metanol al 65% en agua para producir cristales blancos (30.5 g) con una pureza mayor al 99%. La identificación del paclitaxel es como sigue:

10 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), 5.67 (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),
15 2.24 (s, 10-OAc), 1.89 (ddd, H-6b) 1.79 (s,16-CH₃), 1.68(s, 19-CH₃), 1.24(s, 16-CH₃), 1.14(s, 17-CH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 203.60, 172.69, 171.25, 170.33, 168.97, 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, 45.46, 43.14, 35.64, 35.57, 26.84, 22.61, 21.79, 20.83, 14.83, y 9.53 ppm.

EJEMPLO 7

La brominación se llevo a cabo de acuerdo con el método utilizado en la patente U.S. No. 5,969,165.

5

El paclitaxel crudo del ejemplo 5 (10 g) se disolvieron en 100 ml de diclorometano y la solución de diclorometano se vertió en un matraz de 500 ml de tres cuellos de fondo redondo. Las solución se agitó a temperatura ambiente por algunos minutos, luego 5 equivalentes de bromuro (5 raciones moles equivalentes de bromuro vs cefalomanina) se adicionó por goteo durante una hora. Los reactivos fueron agitados a temperatura ambiente hasta que la reacción se completó (aproximadamente de 2 a 3 horas), se supervisó por medio de análisis TLC. Una vez se completó la reacción, la solución se diluyó con 300 ml de CH_2Cl_2 , y fue transferida al embudo de separación. Se añadieron 300 ml de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 10% a la solución para absorber cualquier exceso de bromuro (Br_2). La capa de diclorometano se separó y lavó con agua y salmuera, luego se concentró a sequedad bajo vacío para producir un polvo color café claro.

EJEMPLO 8

Separación de Paclitaxel por medio de Cromatografía de distribución

Los reactivos crudos del ejemplo 7 (10 g) se disolvieron en 50 ml de acetato de etilo y luego se diluyeron con 50 ml de hexano. La solución de

78 78

muestra se adicionó a la parte superior de una columna de vidrio de baja presión (5 por 100 cm). La columna se empacó con sílice gel pretratada y se sometió a cromatografía de columna de distribución. Usando aparatos similares y la metodología utilizada en el Ejemplo 5, el paclitaxel se obtuvo finalmente como

5 cristales blancos de forma de agujas con una pureza superior a 99% (por porcentaje de área de HPLC). Se encontró que la producción fue 6.1 g.

Aunque las modalidades de la Invención se han descrito arriba, no están limitadas y serán aparentes para aquellos expertos en la técnica que numerosas

10 modificaciones forman parte de la presente invención en cuanto a ellas no se apartan del espíritu, naturaleza y alcance de la invención reivindicada y descrita.

79/30
10/

YO REIVINDICO:

1. Un método para aislar compuestos de taxano a partir de un recurso que contiene compuestos de taxano, que comprende las etapas de:

- 5 Suministrar un recurso que contenga compuestos de taxano;
Extraer dichos compuestos de taxano en un solvente orgánico;
Suministrar una columna cromatográfica de distribución;
Diluir los compuestos de taxano con dicha columna de distribución;
y aislar los compuestos diluidos de taxano.

10

2. El método presentado en la reivindicación 1, en donde dicho recurso de taxanos incluye por lo menos uno de Taxus brevifolia ETC ver página 4 @ línea 22 et.seq.

15

3. El método presentado en la reivindicación 1, en donde por lo menos uno de dichos compuestos aislados comprende 13-acetil-9-dihidrobacatina III.

4. El método presentado en la reivindicación 1, en donde dicha columna de distribución cromatográfica comprende una columna cromatográfica de distribución seca.

5. El método presentado en la reivindicación 1, en donde dicha

80 31 86

columna de distribución cromatográfica comprende una columna cromatográfica de distribución húmeda.

6. El método presentado en la reivindicación 1, en donde dicho
5 solvente orgánico comprende diclorometano.

7. El método presentado en la reivindicación 1, en donde por lo
menos uno de dichos compuestos aislados comprende paclitaxel.

10 8. Un método para aislar compuestos de taxanos a partir de recursos
que contengan compuestos de taxanos, que comprende los pasos de:

Suministrar un recurso que contenga compuestos de taxano;

Extraer dichos compuestos de taxano en un solvente orgánico;

Suministrar una columna cromatográfica de distribución;

15 Suministrar un material acarreador dentro de dicha columna;

Suministrar un diluyente;

Diluir dichos compuestos de taxano con dicho diluyente en dicha
columna de distribución seca;

Diluir por lo menos 13-acetil-9-dihidrobacatina III, becatina III y
paclitaxel; y aislar dichos 13-acetil-9-dihidrobacatina III, becatina III
y paclitaxel.

9. El método presentado en la reivindicación 8, que incluye lavar

81 / 46
87

dichos 13-acetil-9-dihidrobacatina III, bacatina III y paclitaxel con metanol.

10. El método presentado en la reivindicación 8, en donde dicha etapa de aislamiento incluye disolver dicha bacatina III en diclorometano.

5

11. El método presentado en la reivindicación 10, que además incluye diluir dicha bacatina III en diclorometano en una columna cromatográfica flash de fase normal.

10

12. El método presentado en la reivindicación 11, que incluye el empleo de un diluyente que contiene hexano y acetona.

15

13. El método presentado en la reivindicación 8, en donde la etapa de aislar incluye disolver dicho paclitaxel en una solución de acetato de etilo y hexano.

14. El método presentado en la reivindicación 13, que incluye diluir dicha solución que contiene paclitaxel en una columna preparativa de baja presión.

15. El método presentado en la reivindicación 8, en donde dicho recurso de taxanos incluye por lo menos uno de *Taxus brevifolia*, *Taxus Brevifolia*, *Taxus baccata*, *Taxus cuspidata*, *Taxus canadensis*, *Taxus*.

82 41
84

wallichiana , Taxus Chinensis y Taxus funanensis

RESUMEN

- 5 Un proceso para obtener peclitaxel y otros taxanos de una fuente que contiene taxanos. El proceso incluye la extracción de compuestos de taxano a partir de la fuente en un solvente orgánico y pasar esta composición a través de una columna cromatográfica de distribución y diluir los compuestos de taxano con una columna de distribución seca. Los compuestos de taxano diluidos se
- 10 aislan por medio de otras técnicas de procesamiento.

DECLARACIÓN COMBINADA Y PODER DE ABOGADO PARA UNA SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD	Expediente No. 98292-U.S.
---	----------------------------------

Como inventor nombrado abajo, por el presente declaro que:

- 15 Mi residencia, dirección de correo y nacionalidad son las que se expresan abajo al pie de mi nombre;

YO CREO QUE SOY EL INVENTOR ORIGINAL, PRIMERO Y ÚNICO (si solo un nombre se lista a continuación) O UN INVENTOR ORIGINAL, PRIMERO Y EN CONJUNTO (si más de un nombre aparecen en la lista) DEL OBJETO QUE SE RECLAMA Y EL CUAL SE REIVINDICA Y PARA EL CUAL SE SOLICITA PATENTE SOBRE LA INVENCION.

83/15

TITULADA:

PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE PACLITAXEL Y 13-ACETIL-9-DIHIROBACCATIN IV

5 especificación de la cual:

(marque una) [X] se adjunta al presente

[] se presentó _____ como

Solicitud Número de Serie _____

y fue modificada en _____

10

(si aplica)

HE REVISADO Y ENTIENDO LOS CONTENIDOS DE LA ESPECIFICACION IDENTIFICADA ANTERIORMENTE, INCLUYENDO LAS REVINDICACIONES, TAL Y COMO SE MODIFICARON POR MEDIO DE CUALQUIER MODIFICACION REFERIDA ARRIBA:

15 RECONOZCO EL DEBER DE DIVULGAR INFORMACION LA CUAL SEA MATERIA DE EXAMINACION DE LA PRESENTE SOLICITUD DE ACUERDO CON EL TITULO 37, DEL CODIGO FEDERAL DE REGULACIONES, Sección 1.56 (a) lo cual establece: "Una patente por su propia naturaleza se ve afectada por el interés público. El interés público se sirve mejor, y la examen más efectivo de la patente ocurre cuando, en el momento en que se examina la solicitud, la Oficina conoce y evalúa las enseñanzas de todo el material informativo a patentar. Cada individuo asociado con la presentación y trámite

84/13

de una solicitud de patente tiene el deber de imparcialidad y buena fe en el trato para con la Oficina, lo cual incluye el deber de divulgar a la Oficina toda la información conocida por ese individuo a ser de importancia para patentar como se define en esta sección. El deber de divulgar la información existe en relación con cada reivindicación pendiente hasta que la reivindicación sea cancelada o retirada de estudio, o la solicitud se abandona. El material informativo de la patentabilidad de una reivindicación que es cancelada o retirada de estudio no requiere ser presentada si la información no es materia de patentabilidad de cualquier reivindicación pendiente bajo estudio en la solicitud. No existe obligación de presentar información que no sea materia patentable de cualquier reivindicación existente. El deber de divulgar toda la información conocida que sea materia de patentabilidad se considera satisfecho si toda la Información conocida que sea materia patentable de cualquier reivindicación presentada en una patente fue citado por la Oficina o presentado a la Oficina en la manera prescrita por § 1.97 (b)-(d) y 1.98. Sin embargo, ninguna patente será otorgada a una solicitud en relación con un fraude que se haya practicado o intentado hacer a la Oficina o que se haya violado el deber de divulgación a través de mala fe o mala conducta intencional. La Oficina alienta a los solicitantes a examinar cuidadosamente: (1) arte anterior citado en reportes de búsqueda de una oficina de patentes extranjera en una solicitud de contraparte, y (2) la información más cercana sobre la cual individuos asociados con la presentación trámite de la solicitud de patente crean que define cualquier reivindicación pendiente, para asegurar que cualquier información materia de patentabilidad

01/194
CON OFICIAL No. 20
PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
T. DUJTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
RESIDENCIA NACIONAL DE COLOMBIA

8544
87

contenida allí sea divulgada a la Oficina".

No sé ni creo que dicha invención hay sido conocida o utilizada en los Estados Unidos de América antes de mi o nuestra invención, o que haya sido patentada o descrita en cualquier publicación impresa en cualquier país antes de mi o nuestra invención, más de un año antes a dicha solicitud; que dicha invención no ha sido usada públicamente ni ha estado en venta en los Estados Unidos de América antes del año anterior a la dicha solicitud; que dicha invención no ha sido patentada ni objeto de un certificado de inventor expedido antes de la fecha de dicha solicitud en ningún país extranjero a los Estados Unidos de América en ninguna solicitud presentada por mi o mis representantes legales o cesionarios durante más de 12 meses anteriores a dicha solicitud.

Por el presente reclamo beneficios de prioridad extranjera bajo el Título 35, del Código de Estado Unidos Sección 119 y /o sección 365 de cualquier solicitud extranjera para patente o certificado de inventor tal y como se indica abajo y también cualquier solicitud extranjera para patente o certificado de inventor identificada abajo en esta invención que tiene una fecha de presentación anterior a la de la solicitud de patente o certificado de inventor en esta invención que tiene fecha de presentación anterior a la fecha de la solicitud sobre la cual se reclama prioridad:

DUCCION OFICIAL No. 011194
N PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C IDONEIDAD 045
VERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

86 AS
80

DECLARACIÓN COMBINADA Y PODER DE ABOGADO		Archivo de abogado No. 98292-U.S.	
PAIS/INTERNACIONAL	NUMERO DE SOLICITUD	FECHA DE PRESENTACION (dia, mes, año)	PRIORIDAD REIVINDICADA
			SI No
			SI No

Por el presente nombro los siguientes apoderados y agentes para el trámite de dicha solicitud y para realizar todas las diligencias ante la Oficina de Marcas y Patentes en relación con ella y para presentar, tramitar y diligenciar los asuntos relacionados con las solicitudes internacionales dirigidas a dicha invención:

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

10 Enviar toda la correspondencia a:
Paul Sharpe
Marks & Clerk
P.O. Box 957, Estación B
Ottawa, Ontario, K1P 5S7 Canadá

15 Hacer las llamadas telefónicas a:
Paul Sharpe - 613-236-9581

20 Por el presente declaro que todas las afirmaciones hechas aquí son de mi propio conocimiento, son verdaderas y que todas las declaraciones hechas sobre información y creencia se toman por verdaderas; y además que estas declaraciones fueron hechas con el conocimiento que el hacer declaraciones falsas hechas intencionalmente y similares se castiga con multa o prisión, o

DUCCION OFICIAL No. 01/194
PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

8746x
8

ambas, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de Estados Unidos de América y que dichas declaraciones falsas intencionales pueden comprometer la validez de la solicitud o de cualquier patente emitida sobre la misma.

NOMBRE COMPLETO DEL PRIMER O UNICO INVENTOR		FIRMA	FECHA
Jian LIU		(Firma ilegible)	03/07/00
RESIDENCIA		NACIONALIDAD	
Fredericton, New Brunswick, CANADA		Canadiense	
Dirección de correo			
470 Cherry Avenue, Fredericton, New Brunswick, CANADA E3A 5N9			
NOMBRE COMPLETO DEL SEGUNDO INVENTOR, SI EXISTE (en blanco)		FIRMA (en blanco)	FECHA (en blanco)
RESIDENCIA (en blanco)		NACIONALIDAD (en blanco)	
Dirección de correo (en blanco)			
NOMBRE COMPLETO DEL TERCER INVENTOR, SI EXISTE (en blanco)		FIRMA (en blanco)	FECHA (en blanco)
RESIDENCIA (en blanco)		NACIONALIDAD (en blanco)	
Dirección de correo (en blanco)			

5 Expediente No. 98292-U.S.

DECLARACIÓN VERIFICADA REMINDICANDO ESTADO DE ENTIDAD

PEQUEÑA (37 CFR §§ 1.9(f) Y 1.27(b)) -INVENTOR INDEPENDIENTE

Solicitante : JIAN LIU

Patente No. : (en blanco)

Presentada u Otorgada: (en blanco)

01/194
ADUCCION OFICIAL No.
JAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 1345
SECRETARÍA DE COMERCIO
REPUBLICA DE COLOMBIA

8843

Título: PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE PACLITAXEL Y 13-ACETIL-9-DIHIDROBACCATIN III

Como inventor nombrado abajo, por el presente declaro que soy idóneo como
5 inventor independiente tal como se define en CFR 37 § 1.9(c) con el fin de
pagar los derechos reducidos a la Oficina de Patentes y Marcas descritos en

☒ la especificación presentada con el título como se presentó arriba

☐ la solicitud identificada antes

☐ la patente identificada antes.

10

No he cedido, otorgado, traspasado ni otorgado licencia sobre y no estoy bajo
obligación alguna contractual o legal de ceder, otorgar, traspasar u otorgar
licencia sobre, cualesquiera derechos de la invención a cualquier persona que
no pudiera calificarse como inventor independiente bajo 37 CFR § 1.9(c) si tal
15 persona hubiese hecho la invención o a ningún negocio que no pudiera
calificarse como negocio pequeño bajo 37 CFR § 1.9(d) o a una organización
sin ánimo de lucro bajo 37 CFR § 1.9(e).

Cada persona, negocio u organización a la cual he cedido, otorgado, traspasado
u otorgado licencia sobre cualesquiera derechos de la invención abajo
nombrada:

☐ No existe tal persona, negocio u organización

☐ Cada tal persona negocio u organización aparecen en la lista a

5 continuación

Se requieren declaraciones verificadas por separado de cada persona, negocio y organización nombrados quienes tengan derechos sobre la invención aduciendo su estado de pequeñas entidades (37 CFR § 1.27).

- 10 Reconozco la obligación de presentar, en esta solicitud o patente, aviso de cualquier cambio en el estado, resultando la pérdida del derecho al estado de entidad pequeña antes del pago, o en el momento del pago, en la primera fecha que ocurra entre los derechos de otorgamiento o derecho de mantenimiento, después de la fecha en la cual ya no sea aplicable el estado de entidad
- 15 pequeña. (37 CFR § 1.28(b)).

Por el presente declaro que todas las afirmaciones hechas de mi conocimiento son verdaderas y que todas las declaraciones hechas sobre información y creencia se toman por verdaderas; además que estas afirmaciones y declaraciones fueron hechas con el conocimiento de que el hacer declaraciones falsas y similares intencionalmente se castiga con multa o prisión o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos, y que dichas

49
92

5	<u>JIAN LIU</u>	<u>(en blanco)</u>	<u>(en blanco)</u>
	NOMBRE DEL INVENTOR	NOMBRE DEL INVENTOR	NOMBRE DEL INVENTOR

(Firma ilegible)	(en blanco)	(en blanco)
FIRMA DEL INVENTOR	FIRMA DEL INVENTOR	FIRMA DEL

10 INVENTOR

<u>03/07/00</u>	<u>(en blanco)</u>	<u>(en blanco)</u>
FECHA	FECHA	FECHA

15 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.

Bogotá, 12 de Junio de 2001.


077194
TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

P. 413

5/27
90

PA 377903

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

March 15, 2001

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: 09/522,625

FILING DATE: March 10, 2000



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

01/194

TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

W. Montgomery
W. MONTGOMERY
Certifying Officer

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UTILITY PATENT
APPLICATION TRANSMITTAL LETTER

BOX PATENT APPLICATION

Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Transmitted herewith for filing is the utility patent application of Jian Li for PROCESS FOR MANUFACTURING PACLITAXEL AND 13-ACETYL-9-DIHYDROBACCATIN III.

Enclosed are:

- ☐ _____ sheets of ☐ formal ☐ informal drawing(s).
☐ A claim for foreign priority under 35 U.S.C. 119/385 in
☐ a separate document ☐ the declaration.
☐ A certified copy of the priority document.
☐ An Associate Power of Attorney.
☒ 1 verified statement(s) of small entity status.

The declaration of the inventor(s) ☒ is enclosed ☐ will follow.

The fee has been calculated as follows:

- | | | | |
|----|--|---|-----------|
| A. | Basic Application Fee | | \$ 680.00 |
| B. | Total Claims <u>15</u> minus 20 = <u>-</u> x \$ 18.00 | = | \$ - |
| C. | Independent | | |
| | Claims <u>2</u> minus 3 = <u>-</u> x \$ 78.00 | = | \$ - |
| D. | If multiple dependent claims present, add \$ 270.00 | = | \$ - |
| E. | Total Application Fee (Total A, B, C & D) | = | \$ 680.00 |
| F. | If verified statement of small entity status is enclosed, fifty percent reduction of Total Application Fee (50% x E) | = | \$ 345.00 |
| G. | Application Fee Due (E minus F) | = | \$ 345.00 |
| H. | Assignment Recording Fee of \$40.00 if assignment document enclosed | = | \$ - |
| I. | TOTAL FEE (G plus H) | = | \$ 345.00 |
| | ☒ One cheque in the amount of \$ <u>345.00</u> is 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.

Paul Sharpe
Marks & Clerk
P.O. Box 957, Station B
Ottawa, Ontario, CANADA K1P 5S7
Telephone: (613) 238-9581

Respectfully Submitted,

By:

PAUL SHARPE, REG. NO. 39,493

TRADUCCION OFICIAL No. 01/194
 JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 C. IDONEIDAD 045
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

92 92 67

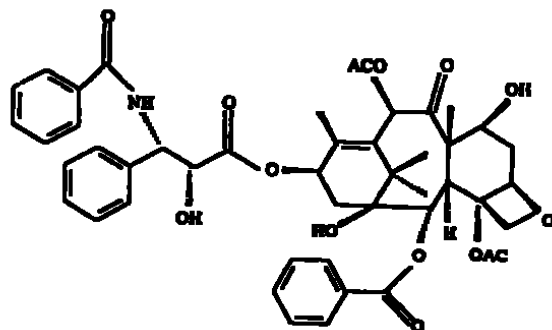
PROCESS FOR MANUFACTURING PACLITAXEL AND 13-ACETYL-9-DIHYDROBACCATIN III

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the production of paclitaxel from pacific yew, ornamental yew, or other yew species' needles, barks and roots and more particularly, the present invention relates to a process for extracting paclitaxel economically which is presently extracted by a high cost process due to an extremely high percentage of unwanted impurities carried forward in the extract during the extraction.

BACKGROUND OF THE INVENTION

In the prior art there is described an extraction method (Journal of Natural Products 53, 1249-55, 1990), which reported that paclitaxel content in the extract in the range of between 0.009% and 0.07%. After removing the hexanes soluble impurities (waxes, pigments, etc.) and after partition between water and dichloromethane, the paclitaxel concentration in the dichloromethane soluble crude extract was in the range of between 0.03% and 0.3% by weight. Paclitaxel (Taxol) is represented by the following structural formula:



Paclitaxel

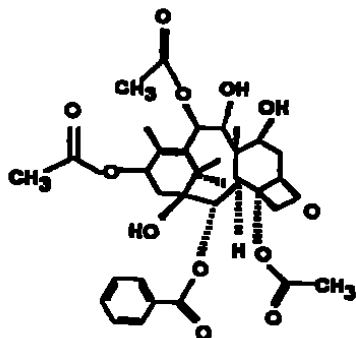
is an anticancer compound. Paclitaxel exhibits a unique mechanism for preventing the growth of cancer cells by affecting the microtubules, which plays an important role in cell division and other cellular functions.

01 / 194
TRADUCCION OFICIAL No. 01 / 194
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

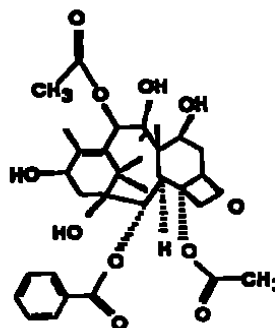
Paclitaxel is clinically effective for the treatment of refractory human ovarian and breast cancer and has exhibited promising activity against a number of other types of cancers such as liver, peritoneal, cervical, prostate, colon, and esophageal cancers.

Paclitaxel was primarily extracted from the bark of pacific yew *Taxus brevifolia*. Unfortunately, the yew grows very slowly, approximately eight inches per year and thus the bark is a limited source of paclitaxel. This lead researchers to seek alternative means for producing paclitaxel and analogues thereof which may display superior antitumor activity, such as derivatives of 9-dihydrotaxol that have enhanced water solubility. As an example 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, a taxane diterpene, has been found to be a useful precursor to make such analogues. This has been discussed in U.S. Patent No. 5,440,056, issued to Klein et al., August 8, 1995.

13-Acetyl-9-dihydrobaccatin III and baccatin III are represented by the following structure formulas:



13-acetyl-9-dihydrobaccatin III



Baccatin III

This can be obtained from, for example, *Taxus canadensis* which is more widely distributed than *Taxus brevifolia*. Hence, 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III is available more abundantly than paclitaxel.

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

31134

TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

74
67

Prior art methods disclose the use of various types of chromatographic technologies to separate paclitaxel and derivatives thereof. For example, U.S. Patent No. 5,380,916, issued to Rao, January 10, 1995, describes a process using C18 reverse phase liquid chromatography. Although reverse phase chromatography can be successful in separating the taxanes, this protocol employs an expensive absorbent and requires a significant time investment. Accordingly, this process is not economically and industrially viable.

U.S. Patent No. 5,478,736, issued to Nair, December 26, 1995, discloses a process using a silica gel normal phase absorption chromatography to purify taxanes. In normal phase absorption chromatography, Al_2O_3 or silica gel is used as an absorbent which is about 100 times less expensive than the ordinary reverse phase absorbent. The problem for the normal phase silica gel absorption chromatography is that the absorbent will bind with paclitaxel which will not be eluted by solvent mixture, therefore the product yield is reduced.

U.S. Patent No. 5,530,020, issued to Gunarvardana et al., June 25, 1996, disclosed a process for isolating 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III from *Taxus canadensis* which employs planet coil countercurrent chromatography (PCCC). Some of the disadvantages associated with this procedure are that it is complex, consumes significant amounts of solvent and can be used to purify only a small amount (milligrams) of samples.

So far, no distributive column chromatography for separating and purifying paclitaxel and related taxanes has been disclosed.

SUMMARY OF THE INVENTION

An object of the present invention is to provide an improved method for isolating taxanes, particularly paclitaxel, 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, from a taxus species.

One aspect of the present invention, there is provided a method for isolating taxane from a crude extract of a taxus species comprising the step of subjecting the crude extract to dry column chromatography and distributive column chromatography.

The method of the present invention may be practiced on a small laboratory scale as well as large industry scale.

TRADUCCION OFICIAL No. 1134
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

95 3/10

Conveniently, the taxane is obtained from extraction of the plant material with an alcoholic solvent at refluxing. Preferably, the column to be used with the method of the present invention includes a nylon tube packed with pretreated silica gel, having a micro sphere size of between 150 mesh and 250 mesh for using as dry column distribution chromatography.

A glass column packed with pretreated silica gel having a particle size of between 150 mesh and 250 mesh for using as wet distributive column chromatography.

10 In one embodiment of the invention, the method includes the steps of dry column distribution chromatography to obtain 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, normal phase distributive column chromatography to obtain paclitaxel and baccatin III.

In another embodiment of the invention, 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III can be purified by dry column distribution chromatography with eluting solvent hexanes and ethyl acetate (4:6).

In another embodiment of the invention, paclitaxel may be further purified by normal phase distributive column chromatography. Preferably, the eluting solvent for this step is hexane:ethyl acetate (starting from 6:4 ending at 3:7). This chromatography may be repeated several times if necessary.

In accordance with another aspect of the present invention, this is provided a method for obtaining taxanes from a Taxus species, including, but not limited to T. brevifolia, T. beccata, T. cuspidata, T. canadensis, T. wallichiana, T. chinensis, T. funanesis, T. X media ov. densiformis and T. X media ov. Hicksii.

30 The process comprises the steps of extracting a source material using alcoholic solvent concentrated the alcoholic extract to get a taxanes containing residue, partitioning the residue was partitioned between water and CH_2Cl_2 , then concentrating CH_2Cl_2 .

Solution to get a taxane rich residue, separating the taxanes into taxane containing fractions by subjecting the taxanes rich residue to dry column distribution chromatography in a dry chromatography column, and recovering any individual taxane from the column.

TRADUCCION OFICIAL No. 11105
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

In another embodiment of the present invention, paclitaxel and baccatin III may further be purified by the steps of crystallizing the 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III out of the taxane-containing solution with an alcoholic solvent to obtain 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, and purifying the paclitaxel-containing solution by normal phase column distribution chromatography.

The advantages of the present invention are to provide a method for the isolation of taxanes which is quick, easy to perform, cost-effective and efficient, both in small and large scale productions.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The starting material for this invention is a plant material selected from species of taxus, particularly *Taxus canadensis*.

The taxanes can be obtained from barks, needles, roots, stems and wood or mixture thereof. Desirably, the twigs or needles or mixture of them are used. The biomass used may be dried or fresh.

The biomass is ground and extracted with a polar solvent such as an alcohol, desirably methanol. The extractions continues at refluxing for 3 hours and is filtered. The residue is extracted again at refluxing for 2 hours and is filtered. The extract is combined and concentrated to about 5% of the original volume by evaporation. The paclitaxel content in this concentrate is between 0.2% and 0.3% by HPLC area percent. About 2 equal amounts of water is added to the concentrate. The aqueous solution is extracted several times with dichloromethane and then the aqueous layer is discarded. The organic layer is concentrated to a small volume. The paclitaxel content in this residue is approximately 1%. The residue is subjected for dry column distribution chromatography.

Dry Column Chromatography (DCC) provides an alternate method to Thin Layer Chromatography (TLC) and preparative column chromatography. The cost is much less compared to that of preparative Liquid Chromatography (LC). Samples which are separable on silica gel or neutral alumina TLC plates can also be separated by DCC. One of the advantages of DCC is the direct transferability of the conditions from TLC to DCC. All work

01 / 194

TRADUCCION OFICIAL No. 01 / 194
 JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 C. IDONEIDAD 045
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

97 10

done to determine the conditions for separation of samples on DCC can be done preliminarily on TLC plates. Once determined, these conditions can be applied to DCC which will give a degree of separation similar to that obtained on the thin-layer plate. DCC provides the further advantage that the number of fractions to be processed depends on the number of cuts made which does not usually exceed fifteen, and most often, does not exceed ten cuts, which is in contrast to the "liquid-flow" columns which can require a large (>50) number of fractions to be collected. Another advantage of DCC is the use of nylon tubing as column and fluorescent absorbents which provides simplified detection and isolation procedures. Therefore, compared to the "liquid-filled" column chromatography, dry column chromatography is often a quicker, easier and less expensive technique.

The process for dry column chromatography is generally set out in "Progress in Separation and Purification", Marjorie M., E.S. Perry and C.J. Van Oss Ed., John Wiley & Sons, 1970, volume 3, pages 73-95.

Briefly, the general procedures for accomplishing dry column chromatography involve the use of a column including a nylon tubing, but other types of tubes such as glass may also be used. The tube is placed in acetone overnight and air dried to remove any solvent. The column is prepared by sealing the tubing at one end, and inserting a small pad of cotton or glass wool from the other end. The sealed end of the tubing is pierced to provide vent, and the tubing is dry packed with alumina trioxide or silica gel until it is sturdy enough to stand upright in a clamp. The sample may be poured directly onto the tube or dissolved in a small volume of the solvent to be used for development, and then distributed evenly on the top of the column. Alternatively, the sample may be coated onto a small amount of adsorbent, dried, ground and then added to the top of the column. The sample is passed down the column with an eluting solvent. A constant liquid head of solvent of about one to two centimeters should be maintained at all times. The column should never run dry.

It has been found that the process of the present invention requires 3 to about 5 hours to complete the separation of the desired compounds. Although the separation time is slower than the usual small scale laboratory process. DCC is still a faster technique than "liquid-filled" chromatography which can take three to five days to complete. Separation is achieved as the mixture runs down the column. When the mixture reaches the base of the column, the development is stopped and the ends of the column are sealed. The various components of the extract can be identified by the separate bands which can be detected by,

TRADUCCION OFICIAL No. 01 / 15
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

98 75
100

for example, a UV or visible method. The column is then cut into the desired sections and the pure compounds are eluted with suitable solvents.

The present invention can be best practiced using a nylon column. Alumina trioxide or silica gel are suitable supporting agents, here, silica gel being preferred. In absorption chromatography, the silica gel contains silylhydroxide groups (-SiOH) which bind with the polar group of the solute. Thus the more polar compounds move more slowly along the column than less polar compounds. In the reverse phase chromatography, the surfaces of silica gel have been modified by various functional groups, which bind with non-polar group of the solute. Thus the more polar compounds move more faster along the column than less polar compounds. The disadvantage of the reverse phase chromatography is that the process is more expensive and time consuming than normal phase chromatography. But both processes all belong to absorption chromatography.

The normal phase absorption chromatography is such that paclitaxel is not cleanly separated, the process need be repeat as many as 10 times to reach the final purity of paclitaxel because of the large number of impurities in the crude extract.

The present invention using a new chromatography process, which is called normal phase distribution chromatography, to separate and purify paclitaxel and related taxanes.

In this distributive column chromatography, the silica gel used is pretreated with formamide. The (-SiOH) groups of the silica gel have been binded with (H-C=O-NH₂) by hydrogen bond or Van der Waals forces between -SiOH and H-C=O-NH₂ groups. Thus the silica gel has lost its absorption properties and used only as the carriers of formamide (FAM).

The material to be separated will be distributed between formamide and the eluting solvent according to their polarity. The chromatographic behaviors are similar to the normal phase chromatography, thus the more polar compounds move more slowly along the column than less polar compounds.

For the dry distributive column chromatography:

The silica gel or alumina trioxide are treated according to the following method:

TRADUCCION OFICIAL No. 01 / 194
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

- 1) The silica gel to be used mixed with excess 10% to about 15% FAM in Me_2CO , the mixture is stirred for 15 minutes at room temperature, then filtered. The filtrate was concentrated to recover the solvent, the residue was discarded.
- 2) The silica gel was then air dried to remove all solvent. The air dried silica gel is ready to use.

For the wet distributive column chromatography:

The silica gel to be used is mixed with excess between 10% and 15% formamide in acetone. The mixture is stirred for 15 minutes at room temperature, then poured into a column. The excess solvents are flowed passing the column until about 1 cm to 2 cm of solvent head is over the packed silica gel bed. The column is kept at room temperature for a few hours before adding samples on the top of the column.

The present invention can be best practiced using nylon columns. Alumina trioxide or silica gel are suitable carriers, silica gel being preferred.

Silica gel normally has a functional group of $-\text{SiOH}$ surrounding its surface. When it was treated with $\text{H}-\text{C}=\text{O}-\text{NH}_2$ (formamide) some kind of hydrogen bond formed between the $-\text{SiOH}$ functional group and formamide, as well as some other interactive forces, therefore, the silica gel has no longer maintained its absorption properties, it is a carrier of formamide only. In the surface of silica gel particle, a fine thin film of formamide formed, which is called stationary phase.

The distribution chromatography differs from traditional absorption chromatography. In the traditional absorption chromatography the system consisted with absorbent (stationary phase), eluting solvent/s (mobile phase) and solute, therefore the system is a three components system. In distribution chromatography, the chromatography systems consist with supporter (carrier), polar solvent (stationary phase), eluting solvent/s (mobile phase), and solute, therefore, the system is a four components system.

The separation mechanism is different in the two chromatographic systems. In absorption chromatography, the material is separated as a result of repeated

01 / 194

TRADUCCION OFICIAL No. _____
 JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 C. IDONEIDAD 045
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

100 6/2/81

sorption/desorption steps during the movement of the sample components along the stationary bed, and the separation is achieved due to differences in the sorption/desorption equilibrium constants of the individual sample components.

In the distribution chromatography, the material to be separated are separated as a result of distribution different in two insoluble liquid phases, and the separation is achieved due to differences of distribution constants in the two insoluble liquid phases of the individual sample components.

10

Generally, distribution chromatography is used to separate polar compounds, such as sugars, peptides, glycosides and other polar compounds.

In the present invention, it has been found that the distribution chromatography achieves excellent separation for taxane diterpene relative to absorption chromatography, including normal phase and reverse phase chromatography.

The present invention can be best practiced using nylon column dry packed with pretreated silica gel for isolation of 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III. The silica gel has a micro sphere size of between 150 mesh and 250 mesh. The dimensions of the column are 12 inches x 120 inches. The amount of silica gel required is, in turn, determined by the sample size. When practicing the dry column distribution chromatographic separation of the present invention, it has been found that the ratio of sample size to the amount of silica gel required to separate the taxanes ranges from between 1:15 and 1:20, desirably 1:20. Hence, the amount of silica gel needed is approximately fifteen to twenty times, and desirably twenty times the amount of sample. The above ratios have been found to be optimal with respect to the cost and degree of separation. Augmenting the amount of silica gel used will increase the cost which can be substantial in large scale process. On the other hand, reducing the amount of silica gel will result in a poor separation.

30

Having described the dry column distribution chromatographic techniques and conditions suitable for the present invention, a preferred experiment of the method for isolating taxanes in accordance with the present invention follows.

The crude dichloromethane extract is separated into several individual taxanes by charging the crude extract onto the top of the column, and adding a solvent mixture of

01 / 194
TRADUCCION OFICIAL No. 01 / 194
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

(01) 10/14

hexanes and ethyl acetate (4:6) thereto. Once the solvent reaches the bottom of the column, the eluting is stopped and the nylon tube is closed, then the column is sliced into various sections. The compounds from the sliced sections are washed with a polar solvent such as an alcohol, such as methanol. The individual taxanes were identified by TLC.

13-Acetyl-9-dihydrobaccatin III is obtained by crystallizing from methanol. The crystallization normally continues overnight at room temperature.

Paclitaxel is separated from other taxanes by purification as follows. The fractions are analyzed by TLC. Paclitaxel shows a purple green color spot and 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III shows a dark green color spot on the TLC plate by spraying 10% H_2SO_4 ethanol solution.

The fractions containing paclitaxel are combined, and concentrated to dryness, and the residue is dissolved with CH_2Cl_2 . The CH_2Cl_2 solution is purified by wet column distribution chromatography. The column is packed with pretreated silica gel having micro sphere size of between 150 mesh and 250 mesh, and operating at a pressure of 30 p.s.i. Useful elutants for this invention can be selected from the mixture of hexanes and ethyl acetate, or from the standard texts of chromatography, for example, hexanes and acetone.

A gradient solvent system of hexanes and ethyl acetate, which in a ratio of hexanes to ethyl acetate of about 5:5 to 3:7, is found to be particularly useful for the purpose of separating paclitaxel from close related taxanes. The taxanes containing fractions are collected from the column, and the one containing paclitaxel are combined and concentrated to remove the solvent. The residue was dissolved in methanol and about 30% equivalent of water was added. The aqueous solution was kept at room temperature overnight, the crystals formed were filtered out and dried in a vacuum oven at 70°C. Paclitaxel is obtained as a cream colored powder.

The fractions containing baccatin III are combined and concentrated to dryness. The residue is dissolved in methanol. The methanol solution is kept in a refrigerator overnight. Baccatin is obtained as off white crystal, which is further recrystallized by dissolving the solids in small volumes of acetone. The acetone solution is diluted with the equivalent hexanes, and the mixture is allowed to sit at room temperature overnight to yield baccatin III as white needle-like crystals.

102 52/40

EXAMPLE 1

To approximately 350 kg of dried ground needles and twigs of Taxus canadensis in an industrial multi-functional extractor, 1200 liters of methanol were added. The mixture was refluxed for 3 hours and filtered. The raw material was then refluxed for 2 hours with 900 liters of methanol and then the methanol solution was filtered again. The filtrate was combined and concentrated to approximately 150 liters under vacuum in a spray evaporator, then one equivalent of water was added to dilute the concentrate. The aqueous solution was partitioned between water and methylene chloride (450 L, 1:1) in a 1000 L reactor which is equipped with an electric stirrer. The mixture was stirred for 5 minutes at a speed of 80/min, then kept at room temperature for 1 hour or until the mixture becomes two layers. The organic layer was collected and the aqueous layer was extracted two more times with 400 liters of methylene chloride (200 liters each). The methylene chloride solution was combined and concentrated in a thin film evaporator which is equipped with two cyclone separators under a vacuum to become a slurry form.

EXAMPLE 2

To approximately 70kg of silica gel in a 500 liter mixer equipped with an electric stirrer, 250 liters of 15% formamide in acetone were added, and the mixture was stirred for 15 minutes at room temperature, then the mixture was kept at room temperature for another 30 minutes and filtered. The solid silica gel was collected and air dried in a shelf dryer, the filtrate was concentrated to recover the solvent, acetone and excess formamide.

EXAMPLE 3

Dry Column Distribution Chromatography

The pretreated silica gel from example 2 was packed in a nylon tube having dimension of 9 inches x 120 inches with a wall thickness of approximately 0.1 mm. The silica gel used has a micro sphere size of between 150 mesh and- 250 mesh. The nylon

01 / 104
TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

103/4100

column was then placed into a same size stainless steel column to hold the weight of the nylon column. The elutant used was a mixture of hexane and ethyl acetate (4:6), other organic solvent which insoluble in formamide may be used.

The sample from example 1 (8kg, approximately 70% solid mass) was diluted with 5 liters of ethyl acetate, and then was placed on the top of the nylon column, and the column was subjected for dry column distribution chromatography.

The column was developed with hexanes: ethyl acetate (4:6), being careful to keep a constant one to two cm of liquid head at all times, once the elutant reached the bottom of the column, further column development was stopped. The nylon column was taken out from the holding stainless steel column and then was cut into 15 portions. Each portion was checked by TLC analysis (samples were sprayed with 10% H_2SO_4 in ethanol followed by heating at 100 - 105°C for a couple of minutes). It was found that 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III and baccatin III moved faster than paclitaxel along the column and the chromatographic behavior in the distribution chromatography differed from the one normal phase absorption chromatography and similar as in the reverse phase absorption chromatography.

The 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, baccatin III, and paclitaxel containing portions were placed into 6 inch short glass columns and washed with methanol, respectively. The methanol solutions were collected and then concentrated to dryness separately.

The 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III portion residue was dissolved in small amounts of methanol (the amount of methanol was good enough to dissolve the residue at 80°C), and the methanol solution was cooled at room temperature and then kept overnight at room temperature. The crystals formed were filtered out and washed with acetone and then dried in a vacuum oven at 80°C to yield 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III, as needle-like crystals (approximately 120 g), which is identified by NMR spectroscopy.

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), 2.28 (s, 10-OAc), 2.18 (m, 2H, H-14), 2.17 (s, 4-OAc), 2.12 (s, 13-OAc), 1.91 (dd, H-8b), 1.91 (s, 18- CH_3), 1.79 (s, 19- CH_3), 1.86 (s, 16- CH_3), 1.23 (s, 17- CH_3) ppm.

81/154

TRADUCCION OFICIAL
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

104

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 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.

EXAMPLE 4

Normal Phase Absorption Chromatography

The baccatin containing portion residue from example 3 was dissolved in small amount of dichloromethane (only a sufficient amount to dissolve the material at warming of the solvent), then the dichloromethane solution was subjected for a normal phase flash chromatography. A 10 cm x 150 cm glass column was used. The column packed with silica gel (150 mesh and 250 mesh). The eluting solvent was a decreasing gradient system of hexane and acetone (starting from 70:30 and progressing to 45:55). Fractions of 1000ml were collected. The fractions containing baccatin III were combined and concentrated to dryness. The residue was dissolved in 1000 ml of methanol and kept at room temperature overnight. Some white crystals were formed. The crystals were filtered and recrystallized from methanol. 23 g of white crystals were obtained and identified by comparison with a reference sample over HPLC as baccatin III.

EXAMPLE 5

Normal Phase Distribution Chromatography

The paclitaxel containing portion residue from example 3 was dissolved in a small amount of ethyl acetate and diluted with a small amount of hexane. 20 kg of silica gel was treated as disclosed in example 1 and then mixed with 40 liters of mixed solvents of hexane and ethyl acetate (6:4), then the mixture was poured into a 15 cm x 150 cm low pressure preparative column. The excess solvent was allowed to flow out until 1 cm of solvent head remained on the top of the column. The sample solution was carefully added to the top of the silica gel bed. The column then was eluted with a gradient solvent system of hexane and

105 / 103

ethyl acetate (starting from 6:4 and ending at 3:7). Fractions of 2000 ml each were collected, and the flow rate was between 75 ml/min and 100 ml/min.

The fractions containing paclitaxel were combined and concentrated to remove most of the solvent, the residue was then dissolved in methanol (1500 ml). To the methanol solution approximately 30% of the volume of water was added, then the aqueous solution was kept at 5°C overnight. The crude crystalline solid from the aqueous methanol solution was filtered out and dried in a vacuum over at a temperature of between 75°C and 80°C. The solid consisted of approximately 70% paclitaxel and 23% of cephalomarine and other unidentified taxanes. The yield was 66 g.

EXAMPLE 6

Macroreticular Adsorbent Resin Absorption Chromatography

50 g of crude paclitaxel from example 5 was dissolved in 350 ml of acetone, then mixed with 200 g of polymethacrylate-divinyl benzene co-polymer resin. The mixture was placed into a round bottom flask and then evaporated over a rotary evaporator to remove the acetone. The coated material was then placed on the top of a low pressure preparative column. Column size is 100 cm x 150cm and packed with polymethacrylate-divinyl benzene co-polymer resin. The polymer resin particle size is between 75 µm and 150 µm. The co-polymer resin was prepared from Amberlite® IRP64. After the sample was added the column top opening was sealed and eluted with a step gradient of solvent mixture of acetone and water (starting acetone:water 3:7 and ending at 65:35). The column was operated under the pressure of 30 p.s.i. The change of solvent was monitored by the results of the TLC and HPLC analytic results of the fractions.

Fractions of approximately 1000 ml/each were collected and monitored by TLC and HPLC analysis. The flow rate was 100 ml/min. The paclitaxel containing fractions were combined and were allowed to stand at 5°C until crystallization of the compound was completed.

The crystals were filtered out and recrystallized from 65% methanol in water to yield white crystals (30.5g) with purity greater than 99%. Identification of paclitaxel as follows:

01 / 194
TRADUCCION OFICIAL No
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

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-3'), 5.67 (d, H-2), 4.94 (d, H-5), 4.79 (dd, H-2'), 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.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 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, 28.84, 22.81, 21.79, 20.83, 14.83, and 9.53 ppm.

EXAMPLE 7

The bromination was carried out in accordance with using a method of U.S. Patent No. 5,969,165.

The crude paclitaxel from example 5 (10 g) was dissolved in 100 ml of dichloromethane and dichloromethane solution was poured into a 500 ml three neck round bottom flask. The solution was stirred at room temperature for a few minutes, then 5 equivalent of bromine (5 equivalent mole ration of bromine vs cephalomarine) was added dropwise over 1 hour. The reactants were stirred at room temperature until the reaction was completed (approximately 2-3 hours), monitored by TLC analysis. Once the reaction was completed, the solution was diluted with 300 ml of CH₂Cl₂ and was transferred to a separation funnel. To the solution 300 ml of 10% aqueous sodium thiosulphate (Na₂S₂O₃) was added to absorb any excess bromine (Br₂). The dichloromethane layer was separated and washed with water and brine, then concentrated to dryness under vacuum to yield a light brown powder.

EXAMPLE 8

Separation of Paclitaxel By Distribution Chromatography

01 / 94
 TRADUCCION OFICIAL No.
 JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 C. IDONEIDAD 045
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

107/H0

The crude reactants (10g) from example 7 was dissolved in 50 ml of ethyl acetate and then diluted with 50 ml of hexane. The sample solution was added to the top of a low pressure glass column (5 x 100 cm). The column was packed with pretreated silica gel and subjected for distribution column chromatography. Using similar apparatus and methodology as used in example 5, paclitaxel was finally obtained as white needle-like crystals with a purity greater than 99% (by HPLC area percent). Yield was found to be 6.1 g.

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.

10

09522625-031000

01/19

TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

10844

I CLAIM:

1. A method of isolating taxane compounds from a source containing taxane compounds, comprising the steps of:
 - providing a source containing taxane compounds;
 - extracting said taxane compounds into an organic solvent;
 - providing a distribution chromatography column;
 - eluting taxane compounds with said dry distribution column; and
 - isolating eluted taxane compounds.
2. The method as set forth in claim 1, wherein said source of taxanes includes at least one of Taxus brevifolia ETC see page 4 @ line 22 et seq.
3. The method as set forth in claim 1, wherein at least one of said compounds isolated comprises 13-acetyl-9-dihydrobaccatin III.
4. The method as set forth in claim 1, wherein said distribution chromatography column comprises a dry distribution chromatography column.
5. The method as set forth in claim 1, wherein said distribution chromatography column comprises a wet distribution chromatography column.
6. The method as set forth in claim 1, wherein said organic solvent comprises dichloromethane.
7. The method as set forth in claim 1, wherein at least one of said compounds isolated comprises paclitaxel.
8. A method of isolating taxane compounds from a source containing taxane compounds, comprising the steps of:
 - providing a source containing taxane compounds;
 - extracting said taxane compounds into an organic solvent;
 - providing a distribution chromatography column;
 - providing a carrier material within said column;
 - providing a elutant;
 - eluting said source of taxane compounds with said elutant in said dry distribution column;

TRADUCCION OFICIAL No. 01 / 194
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

031000-031000

109, ~~110~~

051000

15. The method as set forth in claim 8, wherein said source of taxanes includes at least one of Taxus brevifolia, Taxus brevifolia, Taxus baccata, Taxus cuspidata, Taxus canadensis, Taxus wallichiana, Taxus chinensis and Taxus funanesis.

TRADUCCION OFICIAL No. 01/194
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

110-713

00522625.031000

ABSTRACT

A process for obtaining paclitaxel and other taxanes from a source containing taxanes. The process involves extracting taxane compounds from the source into an organic solvent and passing this composition through a distribution chromatography column and eluting taxane compounds with the dry distribution column. The eluted taxane compounds are isolated by further processing techniques.

01 / 194
TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

717 ~~414~~

**COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY
FOR UTILITY PATENT APPLICATION**

Attorney Docket No. 98282-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:

**PROCESS FOR MANUFACTURING PACLITAXEL
AND 13-ACETYL-9-DIHYDROBACCATIN IV**

the specification of which:

(check [X] is attached hereto:
one)

[] 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 extends 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 practiced 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 potentially 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:

112 ⁷² ~~45~~

0355555555 - 031000

COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY		Attorney Docket No. 88282-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, REG. NO. 39,483 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 - 613-238-9561 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 willful 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 willful 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		<i>Liu Jian</i>	03/07/00
RESIDENCE		CITIZENSHIP	
Fredericton, New Brunswick, CANADA		CANADIAN	
POST OFFICE ADDRESS			
470 Cherry Avenue, Fredericton, New Brunswick Canada E3A 5N9			
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			

81 / 194
TRADUCCION OFICIAL No.
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

113 32
#16

VERIFIED STATEMENT CLAIMING SMALL ENTITY STATUS
(37 CFR 1.9(f) & 1.27(b))-INDEPENDENT INVENTOR

Attorney Docket No. 98292-U.S.

Applicant or Patentee: JIAN LIU
Serial or Patent No. _____
Filed or Issued _____
Title: PROCESS FOR MANUFACTURING FACITAXEL AND 13-ACETYL-2-DEHYDROBACCATIN IV

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 as

- ☒ 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
☐ 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 willful 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 willful 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

Jian Liu
Signature of Inventor

Signature of Inventor

Signature of Inventor

03/07/00
Date

Date

Date

01/194
TRADUCCION OFICIAL
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

03/07/00

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 118

Radicación no 01-18971

Concepto Técnico no 1800

Clasificación Internacional de Patentes A61K 31/337

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 488 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- | | | |
|--|--|---|
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene un resumen de la invención (Art.26-e). |
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d). |
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene la descripción de la invención (Art.26-b). |
| SI ☒ | NO ☐ | NO ES APLICABLE ☐ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d) |
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c). |
| SI ☐ | NO ☐ | NO ES APLICABLE ☒ 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 ☒ 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 ☒ | La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J). |
| SI ☒ | NO ☐ | La prioridad coincide con la materia reivindicada. |
| SI ☒ | NO ☐ | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☒ ver hoja(s) anexa(s)

EXAMINADOR TÉCNICO
202050

Bogotá D. C., DICIEMBRE 12 DEL 2002

Folio 148

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
DILIA MARIA RODRIGUEZ
Apoderado(a)

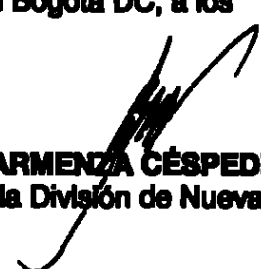
REFERENCIA:	Radicación No.	01-18971
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	2324
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente 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 de la Comunidad Andina, 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 DC, a los

17 de mayo de 2020


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

202050

527