



(72) BUI-KHAC, TRUNG, CA

(72) DUPUIS, NICOLAS, CA

(71) CHAICHEM PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL, CA

(51) Int.Cl.⁷ C07D 305/14

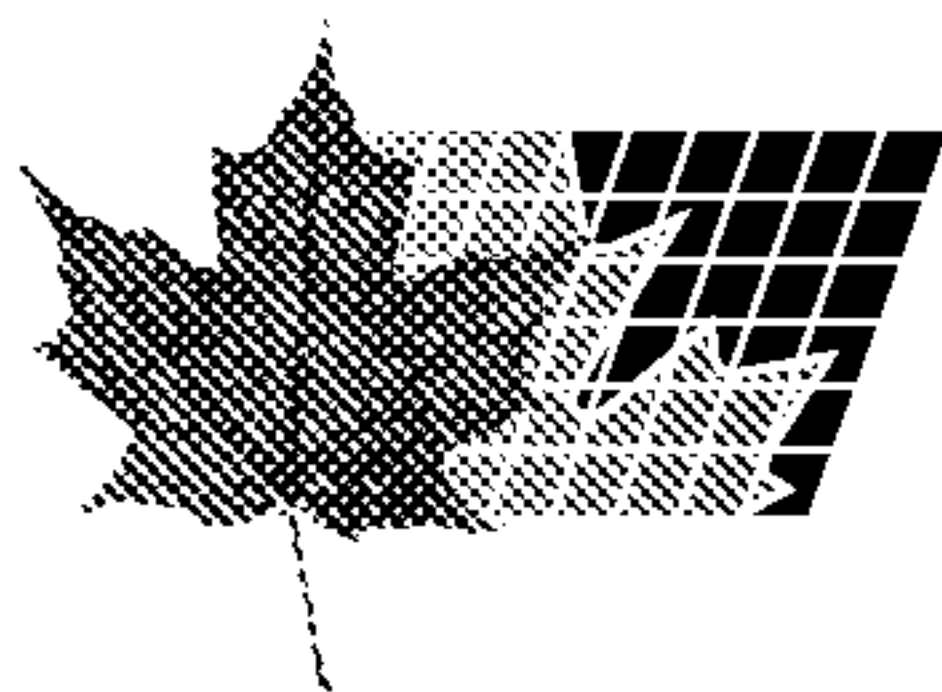
(30) 1999/06/22 (2,275,980) CA

(54) **PROCEDE D'ISOLATION ET DE PURIFICATION DU
PACLITAXEL A PARTIR DE SOURCES NATURELLES**

(54) **PROCESS FOR ISOLATING AND PURIFYING PACLITAXEL
FROM NATURAL SOURCES**

(57) Procédé d'extraction et de purification du paclitaxel à partir d'une source naturelle de taxanes contenant le paclitaxel à extraire, ledit procédé comportant les étapes suivantes: 1) extraction, à l'aide d'un solvant organique, d'une matière première comportant du paclitaxel à partir de ladite source naturelle de taxanes; 2) première précipitation de la biomasse contenue dans ladite matière première, à l'aide d'une base ou d'un acide, suivie de l'isolation de ladite biomasse et de son séchage ; 3) percoloration par l'enlèvement de la résine et des pigments naturels contenus dans la biomasse isolée dans l'étape précédente, par préparation d'un mélange par mise en solution dans l'acétone de ladite biomasse puis par ajout d'un ou de plusieurs solvants non polaires, jusqu'à l'obtention d'une phase huileuse enrichie en paclitaxel; 4) deuxième précipitation par une base ou par un acide de la biomasse contenue dans la phase huileuse enrichie en paclitaxel récupérée dans l'étape précédente, suivie de l'isolation du précipité et de son séchage; 5) d'au moins une étape de purification chromatographique de la solution dans un solvant volatil du précipité isolé dans l'étape précédente et d'au moins une étape de cristallisation à partir de la solution purifiée obtenue par chromatographie. Ce procédé comporte un nombre limité d'étapes et permet, après filtrage et séchage des cristaux, de recueillir un mélange de cristaux de paclitaxel constitué de: - 53% de cristaux d'une pureté > 99%, - 22% de cristaux d'une pureté > 98%, et - 23% de cristaux d'une pureté > 92%.

OPIC
OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ
INTELLECTUELLE DU CANADA



(57)
CIPO
CANADIAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE



Industrie Canada Industry Canada

ABRÉGÉ DESCRIPTIF

Procédé d'extraction et de purification du paclitaxel à partir d'une source naturelle de taxanes contenant le paclitaxel à extraire, ledit procédé comportant les étapes suivantes :

- 1) extraction, à l'aide d'un solvant organique, d'une matière première comportant du paclitaxel à partir de ladite source naturelle de taxanes;
- 2) première précipitation de la biomasse contenue dans ladite matière première, à l'aide d'une base ou d'un acide, suivie de l'isolation de ladite biomasse et de son séchage ;
- 3) percoloration par l'enlèvement de la résine et des pigments naturels contenus dans la biomasse isolée dans l'étape précédente, par préparation d'un mélange par mise en solution dans l'acétone de ladite biomasse puis par ajout d'un ou de plusieurs solvants non polaires, jusqu'à l'obtention d'une phase huileuse enrichie en paclitaxel;
- 4) deuxième précipitation par une base ou par un acide de la biomasse contenue dans la phase huileuse enrichie en paclitaxel récupérée dans l'étape précédente, suivie de l'isolation du précipité et de son séchage;
- 5) d'au moins une étape de purification chromatographique de la solution dans un solvant volatil du précipité isolé dans l'étape précédente et d'au moins une étape de cristallisation à partir de la solution purifiée obtenue par chromatographie.

Ce procédé comporte un nombre limité d'étapes et permet, après filtrage et séchage des cristaux, de recueillir un mélange de cristaux de paclitaxel constitué de :

- 53% de cristaux d'une pureté > 99%,
- 22% de cristaux d'une pureté > 98%, et
- 23% de cristaux d'une pureté > 92%.

**PROCÉDÉ D'ISOLATION ET DE PURIFICATION
DU PACLITAXEL
À PARTIR DE SOURCES NATURELLES**

5 DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION

La présente invention consiste dans un procédé facile et rapide d'isolation et de purification du paclitaxel à partir de sources naturelles. En comparaison avec les techniques conventionnelles connues, ce procédé est particulièrement économique en raison d'un nombre limité d'étapes et de pertes réduites durant la
10 purification.

ART ANTÉRIEUR

Le premier travail concernant le paclitaxel, aussi appelé Taxol^{MD} ou Pacitaxeline^{MD} a débuté dans les années 1960 aux États-Unis lorsque l'Institut National du Cancer (National Cancer Institute) commença un programme de sélection des
15 extraits de plantes susceptibles de posséder des propriétés anti-tumeurs cancéreuses ou des activités antinéoplastiques.

De 1960 à 1981, plus de 110 000 composés extraits de 35 000 espèces de plantes ont été isolés et testés (Blume E. J. Natl. Cancer Inst. 1991; 83 : 1054-1056).

20 L'if fait partie de ces plantes et le premier extrait à partir des écorces (*Taxus brevifolia Nutt*) de l'if provenant de la côte ouest des États-Unis (Oregon) a été obtenu par Wani et al.

L'extrait brut de ces écorces démontre une activité cytotoxique contre les cellules leucémiques et une action d'inhibiteur contre une variété de tumeurs.

Quelques années plus tard, le composé actif de l'extrait a été isolé. Ce composé actif est appelé paclitaxel, la structure moléculaire de ce composé a été déterminée par cristallographie aux rayons X et par spectre ^1H -RMN (Wall et al. J. Am. Chem. Soc. 1971; 93 : 2325-2327).

- 5 Depuis cette date, les études sur l'effet du paclitaxel vis-à-vis des tumeurs cancéreuses in-vitro et in-vivo se sont multipliées et les résultats positifs obtenus ont amené à classer ce composé actif comme un des médicaments prometteurs pour le traitement du cancer de l'ovaire et du sein (Rowinski et al. Pharmacol. Ther. 1991; 52 : 35-84).
- 10 L'utilisation du paclitaxel pour le traitement de différents cancers a été approuvée par la Food and Drug Administration à partir de 1992. La première variété des ifs utilisés a été le *Taxus brevifolia*, d'autres variétés se trouvant aux différentes régions de la terre ont aussi été explorées. Il s'agit de : *Taxus baccata*, *Taxus canadensis*, *Taxus wallichiana*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus densiformis*, *Taxus hicksii*, *Taxus wardii*, *Taxus cuspidata*, *Taxus capitata*, *Taxus brownii* (Miller et al. J. Org. Chem. 1981; 46 : 1469; McLaughlin et al. J. Nat. Prod. 1981; 44 : 321; Kingston et al. J. Nat. Prod. 1982; 45 : 466; Senilh et al. J. Nat. Prod. 1984; 47 : 131-137; Huang et al. J. Nat. Prod. 1986; 49 : 665-669; Fett-Neto et al. Bio/Technology 1992; 10 : 1572-1575).
- 15
- 20 Toutes ces espèces contiennent du paclitaxel, mais en quantité très limitée (Kingston, Pharmacol. Ther. 1991; 52 : 1-34) de l'ordre de 0,0004-0,008%, cette faible teneur en paclitaxel rend son extraction et sa purification encore plus coûteuses à cause de longs procédés, en général par chromatographies répétitives.
- 25 La faible concentration en paclitaxel de toutes les variétés de l'if produit un impact de taille vis-à-vis de l'environnement. Pour obtenir 1 kg de paclitaxel à partir des écorces de *Taxus brevifolia*, il faut abattre environ 3000 arbres matures qui procurent 10 000 kg d'écorce. La quantité obtenue (1 kg) de paclitaxel permet de traiter environ 500 patients or le nombre de patients atteints du cancer est de

l'ordre de quelques centaines de milliers. La replantation des arbres ne répondra jamais à temps à la demande pressante des besoins humains à cause de leur lente croissance (Vidensek et al. J. Nat. Prod. 1990; 53 : 1609-1610; Kelsey et al. J. Nat. Prod. 1992; 55 : 912-917; Wheeler et al. J. Nat. Prod 1992; 55 : 432-440).

- 5 De nombreuses méthodes d'extraction et de purification du paclitaxel ont été proposées, par exemple Wani et al (Wall et al. J. Am. Chem. Soc, 1971; 93 : 2325-2327) proposent un procédé d'extraction du paclitaxel, à partir des écorces de l'if de la côte ouest (*Taxus brevifolia*) des États-Unis par de l'alcool suivi de quelques étapes de purification par chromatographie.
- 10 Miller et al (1981) ont extrait le paclitaxel à partir du *Taxus walichiana* Zucc selon la méthode suivante :
 - 1) extraction de la plante et concentration de l'extrait;
 - 2) élimination de la partie grasse par partition entre l'eau et l'hexane;
 - 3) extraction avec du chloroforme et concentration;
 - 15 4) purification par chromatographie sur colonne de silice;
 - 5) purification par une deuxième chromatographie sur colonne de silice;
 - 6) distribution à contre courant;
 - 7) deuxième distribution à contre courant;
 - 8) chromatographie HPLC préparative.
- 20 La méthode utilisée par Senilh et al. (1984) pour isoler le paclitaxel (ou Taxol^{MD} A : 0,0165%), Céphalomannine (ou Taxol^{MD} B : 0,0064%) et les autres composés à partir des écorces de *Taxus baccata* comprend les 7 étapes différentes suivantes :
 - 1) extraction avec de l'alcool et concentration;
 - 2) partition entre l'eau et le dichlorométhane;
 - 25 3) filtration chromatographique;
 - 4) chromatographie sur colonne de silice;
 - 5) chromatographie sur alumine;
 - 6) chromatographie à pression moyenne sur colonne de silice;

7) chromatographie préparative HPLC.

Pour les autres analogues, deux ou trois autres traitements chromatographiques sur colonne suivis par une chromatographie préparative HPLC sont nécessaires.

Une autre méthode utilisée par Polysciences Inc. est décrite par les étapes
5 suivantes :

- 1) l'écorce broyée et séchée est extraite avec du méthanol ou avec de l'éthanol et l'extrait combiné concentré afin d'éliminer l'alcool,
- 2) le concentré est alors extrait avec du dichlorométhane et l'extrait mélangé au solvant concentré jusqu'à l'état de poudre,
- 10 3) la poudre est dissoute avec un mélange d'acétone et de ligroin (1:1) et filtrée afin d'éliminer la matière insoluble,
- 4) la phase organique qui contient du paclitaxel est concentrée, dissoute dans 30% de ligroin et appliquée sur une colonne de Florisil*,
- 15 5) la fraction paclitaxel issue de la colonne est purifiée par une double cristallisation,
- 6) le paclitaxel cristallin est de plus soumis à une chromatographie sur colonne de silice. Le paclitaxel est séparé des autres taxanes (analogues voisins, Céphalomannine) au cours de cette étape,
- 20 7) le paclitaxel purifié obtenu à partir de l'étape précédente est recristallisé deux fois, et

* marque de commerce

- 8) les mélanges non séparés et les liqueurs mères sont rechargés dans la colonne de silice afin d'obtenir une quantité additionnelle de paclitaxel pur.

5 Bien sûr, il existe d'autres méthodes de purification du paclitaxel à partir de sources naturelles, telles que l'expliquent les références suivantes : Kingston et al. mentionne de nouveaux taxanes obtenus à partir du *Taxus brevifolia* (J. Nat. Prod. 1982; 45 : 466-470); Witherup et al. décrit une méthode de séparation du paclitaxel et de composés voisins à partir du *Taxus brevifolia* (J. Liq. Chrom. 1989; 12 : 2117-2132).

10 L'utilisation de tissus d'if ornemental (*Taxus x media Hicksii*) pour la purification de paclitaxel est décrite dans le brevet US-A-5 279 949 délivré au nom de Nair en 1994. La séparation décrite par Nair est conduite de la façon suivante :

- 1) les aiguilles fraîches sont extraites avec 70% d'alcool,
- 2) l'extrait est décoloré avec du charbon et filtré,
- 15 3) l'extrait est concentré afin d'éliminer la majorité du solvant organique,
- 4) le concentré aqueux est centrifugé afin de séparer le solide précipité qui contient du paclitaxel,
- 5) le solide est alors soumis à une chromatographie classique en phase silice,
- 20 6) une seconde chromatographie à basse pression sur colonne de silice est conduite pour traiter la fraction brute de paclitaxel, et
- 7) une colonne à phase renversée est utilisée pour la purification finale.

Dans le brevet US-A-5 654 448 délivré à Pandey et al., la purification du paclitaxel à partir de l'écorce de *Taxus brevifolia* est décrite de la façon suivante :

- 1) l'écorce est extraite trois fois avec du méthanol, chaque extraction est réalisée pendant une période de 5 jours, l'extrait est alors concentré;
- 2) le concentré à base de méthanol est partitionné à l'aide de chlorure de méthylène et en présence d'eau, l'extrait à base de chlorure de méthylène est évaporé jusqu'à séchage complet, le résidu solide contenant le paclitaxel est d'environ 1,8-2,2% en poids par poids;
- 3) le solide résiduel est dissous dans l'acétone et mélangé avec un volume d'hexane afin d'éliminer les impuretés polaires, le mélange est évaporé jusqu'à 1/3 de son volume;
- 4) le résidu acétone/hexane est ajouté goutte à goutte à l'hexane (1,5 L-3,0 L de résidu pour 10-15 L d'hexane) pour atteindre la précipitation, ce matériau est filtré et séché sous vide poussé (1mm à 2mm) à une température de 40°C pour fournir environ 0,5-0,6 kg de matériau;
- 5) le résidu solide est dissous dans 0,5 L d'un mélange acétone-chlorure de méthylène, en mélange 1:9 volume par volume et soumis à une chromatographie sur colonne de silice, la Céphalomannine est co-éluee avec le paclitaxel, les fractions contenant le paclitaxel et la Céphalomannine sont mises ensemble et séchées à l'aide d'un évaporateur rotatif, le résidu solide est un mélange brut de paclitaxel et de Céphalomannine contenant de 36 à 40 grammes (45-55%) de paclitaxel;
- 6) un mélange brut (10 g) de l'étape précédente est modifié chimiquement afin de séparer le paclitaxel de la Céphalomannine par bromation, le résidu solide obtenu après réaction de bromation a un poids de 13,2 g;
- 7) le résidu bromé est dissous dans l'acétone / dans le chlorure de méthylène 1:9 volume par volume, et chromatographiquement séparé sur

une colonne de silice, les fractions contenant le paclitaxel sont regroupées et évaporées jusqu'à séchage; et

- 5 8) le résidu solide est dissous dans l'acétone et cristallisé avec un volume égal de n-hexane ou d'autres hexanes, les cristaux ont été lavés avec une solution froide d'acétone et d'hexane, 1/1 volume par volume, filtrés et séchés sous vide à 40°C, les cristaux solides pèsent 4,84 g et contiennent une quantité > 97% en poids par poids de paclitaxel tel que mesuré par chromatographie HPLC.

10 Dans les brevets US-A-5 475 120 et 5 670 673 délivrés à Rao, l'isolation du paclitaxel a été décrite comme suit :

- 1) l'écorce, les aiguilles, le bois, les racines, ou une combinaison de ces composants ont été extraits avec l'alcool et concentrés sous pression (<35-40°C) afin d'éliminer la majorité de l'alcool;
- 15 2) le concentré a été partitionné avec du chloroforme (ou du dichlorométhane, du dichloroéthane, du trichloroéthane), l'extrait à base de chloroforme a été concentré sous pression réduite jusqu'à obtenir un fin sirop et le sirop est placé dans un cristalliseur et séché dans un four sous vide (<40°C) pour obtenir une poudre (si l'écorce et le bois étaient utilisés), ou des cristaux brillants en forme d'aiguilles (quand les aiguilles étaient
- 20 utilisées), à partir de 100 kg d'écorce ou de bois, le rendement de l'extrait obtenu était de 1,5-2,5 kg et à partir des aiguilles, de 2,4-4,8 kg;
- 25 3) les extraits solides à base de chloroforme (2-2,5 kg) ont été dissous dans l'acétonitrile (5 L) et dans de l'eau (5 L), le mélange était alors équilibré avec un gel de silice (2-3 L de boue), une quantité additionnelle d'eau (15 L) a été ajoutée graduellement pendant l'agitation du mélange, la solution claire a été siphonnée et la fine boue du gel de silice qui était alors imprégné d'échantillon, a été transférée sur le sommet d'une colonne en acier inoxydable. La fraction contenant le paclitaxel et divers analogues

importants du paclitaxel étaient séparés dans une hotte dans lequel une lente évaporation du solvant prend place, des cristaux ont commencé à se former au bout de 1-2 jours et le processus a continué pendant 8-10 jours; et

- 5 4) les cristaux bruts obtenus qui ont moins de 5% de Céphalomannine ont été cristallisés deux fois à l'aide d'un mélange acétone/ligroin et en utilisant du noir de charbon pour obtenir 41 g de paclitaxel pur, soit un rendement de 0,04%, les quantités étant basées sur l'utilisation de 100 kg d'écorce, de façon alternative, les cristaux bruts ont été décolorés en
- 10 faisant passer une solution dans le chloroforme à travers une courte colonne de silice ou de Florisil. Une autre alternative pour éliminer la Céphalomannine contaminante est l'utilisation d'ozone, un lavage de la colonne avec 1-2% de méthanol dans le chloroforme donne la quantité de paclitaxel récupérée par concentration et par cristallisation, le rendement
- 15 était à peu près le même que précédemment, soit 40 g, l'analyse par chromatographie HPLC montrait que le paclitaxel récupéré comprenait moins de 0,3% de Céphalomannine.

Dans le brevet US-A-5 969 165 délivré au nom de Liu, l'isolation et la purification de paclitaxel et de composés voisins à partir de *Taxus canadensis* par

20 chromatographie industrielle préparative à basse pression sont décrites de la façon suivante.

Les aiguilles et les brindilles de *Taxus canadensis* (200 kg) ont été extraites avec 1000 L de méthanol à 60°C pendant 5 heures et filtrées. Les matières premières ont été extraites avec 700 L de méthanol à 55-60°C pendant un autre 4 heures et

25 filtrées. Le filtrat a été combiné et mélangé avec 10 kg de charbon actif (5% p/p). Le charbon actif a été éliminé par filtration. Le filtrat a ensuite été concentré à approximativement 100 L, puis un mélange de 300 L d'eau et de dichlorométhane (1:1) a été ajouté. La couche organique a été collectée et la solution aqueuse a été extraite deux fois de plus avec 200 L de dichlorométhane. La solution de

dichlorométhane a été combinée et évaporée jusqu'à former une boue, ensuite diluée avec 20 L d'acétone.

La solution à base d'acétone a été appliquée sur une colonne chromatographique chargée avec 20 kg de Celite* 545, séchée puis chargée au sommet de trois
5 colonnes chromatographiques industrielles à basse pression (150.fois.15 cm). Chaque colonne a été chargée avec 15 kg d'un absorbant à base d'oxyde d'aluminium. Les colonnes éluées avec un système solvant constitué par un mélange hexane : acétone à une pression comprise entre 10 et 15 psi avec un taux de circulation d'environ 150ml/min.

10 Les fractions contenant les taxanes ont été récupérées et combinées et ont alors été concentrées pour extraire les autres solvants. Le matériau résultant a été dissous dans le méthanol et conservé à la température ambiante pour une nuit jusqu'à fournir des cristaux en forme d'aiguille. Les cristaux ont été filtrés et recristallisés à partir de l'acétone pour produire des cristaux longs en forme
15 d'aiguille identifiés comme étant du 13-acétyl-9-dihydrobaccatin III.

Le filtrat a été concentré jusqu'à sécheresse. Le résidu a été dissous dans 3 L d'acétone. La solution d'acétone a été mélangée avec 1,5 kg de divinylbenzène-polystyrène. Le solvant éliminé par évaporation et la poudre résultante chargée au sommet d'une colonne chromatographique industrielle à basse pression chargée
20 avec du polystyrène-divinylbenzène est éluée avec 45% d'acétone dans l'eau et à un taux de circulation de 150ml/min. sous une pression opératoire inférieure à 30 psi.

Les fractions contenant du paclitaxel et de la Céphalomannine ont été groupées ensemble et évaporées pour éliminer l'acétone, puis diluées avec de l'eau
25 désionisée et extraites trois fois avec 2,5 L de dichlorométhane. La couche organique a été concentrée jusqu'à sécheresse, et le résidu dissous dans 1 L de méthanol.

* marque de commerce

De l'eau a été ajoutée à raison de 30% (volume par volume) à la solution de méthanol et le mélange chauffé pour quelques minutes à 60°C puis gardé à la température ambiante pour la nuit. Le solide brut cristallin obtenu à partir de la solution de méthanol a été filtré et séché dans un four sous vide à 70-75°C. Le
5 solide consiste approximativement de 70% de paclitaxel et de 25% de Céphalomannine à partir (soit un rendement de 31 grammes à partir de 200 kg) d'aiguilles et de brindilles de *Taxus canadensis*.

Le paclitaxel brut a alors été dissous dans 200 ml d'acétonitrile et dilué avec 250 ml d'eau désionisée et chargé sur une colonne chromatographique. La
10 colonne chromatographique était chargée d'une résine polymérique (Diaion*, résine macroporeuse de polyméthacrylate). La colonne a été éluée avec un gradient progressif de 35, 40, 45 et d'une solution à 50% d'acétonitrile dans l'eau.

Les fractions contenant le paclitaxel ou la Céphalomannine ont été combinées individuellement et conservées à 5°C jusqu'à cristallisation.

15 Les cristaux de paclitaxel et de Céphalomannine ont été filtrés séparément et les deux recristallisés à 65°C à partir du méthanol dans l'eau.

Le paclitaxel a été obtenu sous la forme de cristaux en forme d'aiguille blanche avec une pureté >99% et à un rendement de 18,5 g (0,009%). La Céphalomannine a été obtenue avec une pureté >98% et un rendement de 6,5 g
20 (0,003%).

La revue des différentes méthodes de purification de paclitaxel citées dans l'art antérieur montre que l'obtention de paclitaxel à haute pureté nécessite de nombreuses étapes de séparation par chromatographie et de purification par cristallisation. D'où un coût de production de paclitaxel très élevé, en particulier de
25 par sa faible teneur dans les différentes espèces de *Taxus*, la quantité de biomasse qui peut être purifiée est très limitée à cause de la petite taille des

* marque de commerce

colonnes de chromatographie et à cause du faible rendement en paclitaxel après la purification.

OBJET ET RÉSUMÉ DE L'INVENTION

La présente invention a principalement les deux objets suivants, à savoir la mise à
5 disposition :

- d'un procédé permettant d'éliminer des contraintes au niveau de l'obtention des biomasses après l'extraction des écorces ou d'aiguilles et des branches de Taxus de différentes espèces, d'augmenter la quantité de biomasse qui peut être purifiée par chromatographie, de réduire les étapes de purification,
10 d'augmenter le rendement en paclitaxel et finalement de ramener le coût de produit à un niveau plus économique; et
- d'un mélange de cristaux de paclitaxel à haute pureté.

Le premier objet de la présente invention est atteint grâce à un procédé d'extraction et de purification du paclitaxel à partir d'une source naturelle de
15 taxanes contenant le paclitaxel à extraire, ledit procédé comportant les étapes suivantes :

- 1) extraction, à l'aide d'un solvant organique, d'une matière première comportant du paclitaxel à partir de ladite source naturelle de taxanes;
- 2) première précipitation de la biomasse contenue dans ladite matière
20 première, à l'aide d'une base ou d'un acide, suivie de l'isolation de ladite biomasse et de son séchage ;
- 3) percoloration par l'enlèvement de la résine et des pigments naturels contenus dans la biomasse isolée dans l'étape précédente, par préparation d'un mélange par mise en solution dans l'acétone de ladite biomasse puis
25 par ajout d'un ou de plusieurs solvants non polaires, jusqu'à l'obtention d'une phase huileuse enrichie en paclitaxel;

- 4) deuxième précipitation par une base ou par un acide de la biomasse contenue dans la phase huileuse enrichie en paclitaxel récupérée dans l'étape précédente, suivie de l'isolation du précipité et de son séchage;
- 5) d'au moins une étape de purification chromatographique de la solution dans un solvant volatil du précipité isolé dans l'étape précédente et d'au moins une étape de cristallisation à partir de la solution purifiée obtenue par chromatographie.

Le deuxième objet de la présente invention est atteint par un mélange de cristaux de paclitaxel caractérisé en ce que, après filtrage et séchage des cristaux, ledit mélange est constitué de :

- 53% de cristaux d'une pureté > 99%,
- 22% de cristaux d'une pureté > 98%, et
- 23% de cristaux d'une pureté > 92%.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

La présente invention décrit un procédé d'extraction et de purification du paclitaxel à partir d'une source naturelle de taxanes contenant le paclitaxel à extraire, ce procédé comporte cinq étapes de base qui seront ci-après explicitées.

Ce procédé est présenté dans le diagramme de la Figure I.

Étape 1 - Extraction

La source naturelle de taxanes utilisée comme matière première du procédé selon l'invention est du genre *Taxus*.

Il s'agit plus particulièrement de toutes les espèces de conifères contenant du paclitaxel.

Le procédé consiste à extraire des substances contenant le paclitaxel et ses analogues par un mélange de solvant organique.

Selon un mode particulièrement avantageux de réalisation de l'invention, l'espèce de conifère contenant du paclitaxel est choisi dans le groupe constitué par *Taxus*
5 *brevifolia*, *Taxus baccata*, *Taxus canadensis*, *Taxus walichiana*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus densiformis*, *Taxus hicksii*, *Taxus wardii*, *Taxus cuspidata*, *Taxus capitata*, *Taxus brownii*.

Le procédé selon l'invention présente l'avantage d'être applicable au traitement de toutes les parties constitutives de la source naturelle de taxanes qui contiennent
10 du paclitaxel.

De façon avantageuse, l'extraction est réalisée à partir des écorces de la source naturelle de taxanes.

Selon un autre mode préférentiel de l'invention, l'extraction est simultanément réalisée à partir des branches et des aiguilles de la source naturelle de taxanes.

15 Selon un mode préférentiel l'extrait est ensuite filtré pour enlever les dépôts et transvasé dans une cuve à double parois dans laquelle de l'eau chaude (de préférence à une température de 65-70°C) circule. Le solvant est distillé de cette cuve jusqu'à l'obtention d'un liquide très épais. L'extrait est alors récupéré et dissous dans du méthanol.

20 Dans l'étape d'extraction, le solvant organique utilisé est, de préférence, choisi dans le groupe constitué par les alcools, les hydrocarbures halogénés et les mélanges d'alcools et d'hydrocarbures halogénés.

On utilise de façon particulièrement avantageuse du méthanol, du dichlorométhane, du trichlorométhane ou un mélange de méthanol et
25 dichlorométhane ou un mélange de méthanol et de trichlorométhane.

Dans le cas où on utilise un mélange alcool-hydrocarbure halogéné, le rapport volumique du mélange a une valeur avantageusement comprise entre 9:1 et 1:9.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le rapport volumique de ce mélange alcool-solvant halogéné est d'environ 1:1.

5 **2 – Première précipitation**

Dans cette étape, la précipitation de la biomasse est réalisée indifféremment en milieu basique ou en milieu acide.

10 Dans le cas où la précipitation est réalisée en milieu basique ce milieu est avantageusement constitué par une solution d'un sel basique tel qu'un acétate de sodium, un acétate de potassium ou tris(hydroxyméthyl)aminométhane aussi appelé TRIS. Selon un mode particulièrement avantageux le milieu basique est
constitué par une solution d'hydroxyde de sodium.

15 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la concentration d'hydroxyde de sodium dans la solution basique est comprise entre 10 millimols et 80 millimols par litre de solution.

De façon encore plus préférentielle, la concentration d'hydroxyde de sodium est comprise entre 20 millimols et 50 millimols par litre de solution.

Le pH du milieu basique est habituellement compris entre 8,5 et 11, de préférence entre 9 et 10.

20 Lorsque la précipitation est réalisée en milieu acide, le milieu acide est habituellement constitué par une solution d'un acide minéral ou par une solution d'un acide organique.

L'acide est choisi dans le groupe constitué par les acides chlorhydriques, acétiques et citriques.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, la concentration en acide de la solution est comprise entre 10 millimols et 50 millimols par litre de solution. De façon plus préférentielle, la concentration en acide est comprise entre 20 millimols et 30 millimols par litre de solution.

- 5 Le pH du milieu acide est avantageusement compris entre 2 et 4.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le volume de la solution basique ou acide ajoutée pour provoquer la précipitation de la biomasse est compris entre 1 à 20 fois le volume de l'extrait obtenu dans la première étape d'extraction.

- 10 De préférence, le volume de la solution basique ajouté est compris entre 1 à 15 fois le volume de l'extrait obtenu dans l'étape d'extraction.

Dans le cas de la solution acide, le volume ajouté est avantageusement compris entre 1 à 10 fois le volume de l'extrait obtenu dans l'étape d'extraction.

- 15 Dans ces conditions, le précipité formé est très fin et léger, sa filtration est très difficile. Le précipité ne peut être récupéré totalement par une centrifugation à faible vitesse (5000 tpm). Une vitesse de 15 000 ou même de 20 000 tpm est nécessaire pour efficacement séparer le précipité de la solution.

- 20 Selon un mode préférentiel et dans le but de faciliter l'isolation du précipité de la biomasse recueillie dans cette première étape de précipitation, la biomasse obtenue par précipitation dans l'étape 2 est en outre relarguée avant isolation et séchage par ajout de chlorure de sodium jusqu'à une concentration comprise entre 25 et 200 grammes par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.

- 25 De préférence, le chlorure de sodium est ajouté jusqu'à une concentration comprise entre 50 et 100, de préférence entre 50 et 75, grammes par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.

Ce traitement de relargage de la solution par le chlorure de sodium permet d'obtenir une floculation. Le précipité ainsi obtenu est plus lourd, plus aggloméré et plus facile à filtrer ou à centrifuger à faible vitesse.

5 Le chlorure de sodium est de préférence ajouté rapidement dans la solution sous forte agitation.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la biomasse précipitée dans cette étape est séparée de la solution par filtration ou par centrifugation puis séchée à l'air libre ou sous vide, de préférence par ventilation ou par lyophilisation.

Étape 3 - Percolation

10 Le ou les solvants non polaires utilisés dans cette étape pour la percolation est (sont) de préférence choisi(s) dans le groupe constitué par les hydrocarbures.

Il s'agit de préférence d'un hydrocarbure miscible avec l'acétone tel que l'hexane ou l'heptane.

15 Au cours de cette étape, la biomasse séchée résultant de l'étape précédente de précipitation est remise en solution sous forme d'un mélange préparé par addition d'acétone jusqu'à un volume égal à 2 volumes de la matière première extraite dans l'étape 1 et avant précipitation.

De préférence, la biomasse séchée est remise en solution sous la forme d'un mélange obtenu par ajout d'acétone puis par ajout d'eau.

20 L'eau est avantageusement ajoutée à raison de 2 à 10 volumes pour 100 volumes d'acétone ajouté.

Le volume de l'hexane est habituellement de 3 à 4 fois celui de la solution d'acétone.

Le mélange ainsi obtenu est transféré dans une ampoule à décanter, la phase huileuse contenant le paclitaxel et les autres taxanes déposés au fond est récupérée. La phase huileuse est ensuite évaporée et remplacée par du méthanol.

De façon plus préférentielle encore, l'eau est ajoutée à raison de 5 à 7 volumes
5 pour 100 volumes d'acétone ajouté.

Cette étape permet d'éliminer considérablement les résines et les pigments naturels des plantes.

Étape 4 – Deuxième précipitation

Dans cette étape, la phase enrichie en paclitaxel obtenue dans l'étape précédente
10 de percoloration est évaporée à sec et remise en solution dans le méthanol.

La solution de méthanol ainsi obtenue est précipitée en milieu basique lorsque la première précipitation a été réalisée, dans l'étape 2, en milieu acide, ou en milieu basique lorsque la première précipitation a été réalisée, dans l'étape 2, en milieu acide, pour donner une biomasse contenant du paclitaxel, et dans laquelle le
15 paclitaxel est sous forme de précipité.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, la biomasse obtenue par précipitation dans cette étape est en outre relarguée avant isolation et séchage par ajout de chlorure de sodium jusqu'à une concentration comprise entre 30 et 200 grammes par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.

20 De façon préférentielle, le chlorure de sodium est ajouté jusqu'à une concentration comprise entre 50 et 100 grammes par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.

Le précipité contenant la biomasse est filtré et séché à l'air libre ou sous vide ou lyophilisé.

La solution obtenue, dans un solvant volatil, du précipité isolé dans l'étape 4 de précipitation est soumise à au moins une purification chromatographique et à au moins une étape de cristallisation à partir de la solution purifiée obtenue par chromatographie.

5 5 - Étape de purification chromatographique

Le précipité obtenu après séchage dans l'étape 4 de précipitation est mis en solution dans un solvant volatil puis soumis à au moins une étape de purification chromatographique et à au moins une étape de cristallisation à partir de la solution purifiée obtenue par chromatographie.

- 10 Selon un mode avantageux de réalisation du procédé selon l'invention, le précipité obtenu après séchage dans l'étape 4 de précipitation est soumis à plusieurs purifications chromatographiques et plusieurs cristallisations.

- 15 Selon un mode particulièrement avantageux de réalisation de l'invention, le précipité obtenu après séchage dans l'étape de précipitation est soumis à trois purifications chromatographiques et à trois cristallisations. Ces purifications et cristallisations successives constituent les étapes A à F, ci-après explicitées.

A – Première purification chromatographique

- 20 Dans la première étape de purification chromatographique, la biomasse obtenue dans l'étape 4 de précipitation est remise en solution dans un solvant volatil et la solution de ce solvant est mélangée avec un gel de silice et séchée sous ventilation, puis le gel de silice recouvert de la biomasse est déposé sur une colonne chromatographique contenant le même type de gel, la biomasse est alors purifiée à l'aide d'un mélange d'élution comprenant de 30 à 40% d'acétone et de 60 à 70% d'hexane.

- 25 Selon un mode préférentiel de réalisation de cette étape, le mélange d'élution comprend environ 40% d'acétone et environ 60% d'hexane.

Le deuxième précipité formé dans l'étape 4 est très fin et léger, ce qui rend sa filtration très difficile.

Le précipité ne peut être que partiellement récupéré par une centrifugation à faible vitesse (5000 tpm). Une vitesse comprise entre 15 000 et 20 000 tpm permet de
5 bien séparer le précipité de sa solution. Un relargage de la solution par le chlorure de sodium permet d'obtenir une floculation, ceci rend le précipité plus lourd, plus aggloméré et plus facile à filtrer ou à centrifuger à faible vitesse. La concentration du chlorure de sodium est de 25 à 100 g par litre de solution, préférentiellement de 50 à 75 g par litre de solution. Le chlorure de sodium est ajouté rapidement dans
10 la solution sous forte agitation.

Le précipité obtenu est dissous avec un minimum d'acétone et filtré pour éliminer les particules insolubles. La solution d'acétone est mélangée avec du gel de silice et puis séchée sous ventilation ou sous vide.

Le gel imprégné de paclitaxel et de ses analogues est chargé sur une colonne
15 (142 cm x 7,6 cm de diamètre intérieur) contenant 2,2-2,3 kg de gel de silice. Le gel de la colonne est lavé et équilibré avec un mélange de solvant: acétone – hexane (40–60%, volume par volume). L'élution des fractions est réalisée avec le même mélange de solvant, le débit est de 100 ml/min, la pression varie entre 0-30 psi.

20 **B – Deuxième étape de purification chromatographique**

Dans cette étape, les fractions enrichies en paclitaxel récupérées dans l'étape précédente de première purification chromatographique sont préférentiellement groupées ensemble puis évaporées à sec jusqu'à obtention d'un résidu.

Un mélange dudit résidu est alors préparé par solubilisation dans un solvant
25 volatil. Le mélange ainsi obtenu est alors repurifié par chromatographie dans les mêmes conditions que dans l'étape précédente pour fournir de nouvelles fractions enrichies en paclitaxel.

Selon un mode préférentiel, le résidu est redissous dans de l'acétone, puis mélangé avec du gel de silice et séché.

Le gel imprégné de paclitaxel et de ses analogues est chargé sur une colonne (142 cm x 7,6 cm de diamètre intérieur) contenant 2,2-2,3 kg de gel de silice. Le
5 gel de la colonne est lavé et équilibré avec un mélange de solvant: acétone – hexane (40–60%, volume par volume). L'élution des fractions est réalisée avec le même mélange de solvant, le débit est de 100 ml/min, la pression varie entre 0-30 psi.

Les fractions contenant le paclitaxel (en général de 40 à 60% de paclitaxel) sont
10 groupées ensemble.

C – Première cristallisation

Dans cette étape, les fractions contenant du paclitaxel, obtenues par chromatographie dans l'étape précédente de purification, sont regroupées et évaporées à sec, remises en solution dans l'acétone, la quantité d'acétone étant
15 ajustée de façon à obtenir une absorbance de cette solution ayant une valeur de 1,0 à 1,5 D.O. pour le pic correspondant au paclitaxel selon l'analyse par HPLC, puis le paclitaxel est cristallisé en ajoutant de 3 à 4 volumes d'hexane dans la solution d'acétone.

Les cristaux se forment rapidement, le mélange est laissé au repos toute la nuit à
20 température ambiante ou à une température comprise entre 2 et 8°C pour compléter la cristallisation.

D – Deuxième cristallisation

Dans cette étape, les cristaux obtenus par recristallisation dans l'étape précédente de première cristallisation sont séparés par filtration, remis en solution dans
25 l'acétone avec un volume d'acétone ajusté de façon à obtenir une absorbance de

la solution variant de 1,0 à 1,5 D.O. pour le pic correspondant au paclitaxel selon l'analyse par HPLC.

Puis le paclitaxel contenu dans cette solution est recristallisé par ajout de 3 à 4 volumes d'hexane dans la solution d'acétone.

- 5 Les cristaux obtenus dans cette étape ont, selon les analyses HPLC, une pureté en paclitaxel >80%.

E – Troisième purification chromatographique

Dans cette étape, les cristaux obtenus dans l'étape précédente de deuxième cristallisation sont filtrés puis remis en solution dans le chlorure de méthylène.

- 10 La solution ainsi obtenue est alors mélangée avec un gel de silice et séchée sous ventilation.

Le gel de silice est alors recouvert de paclitaxel et déposé sur une colonne chromatographique contenant le même type de gel. Le paclitaxel est alors repurifié pour la troisième fois par un mélange d'élution à base de solvant

- 15 organique.

De préférence, le mélange d'élution comprend de 95 à 98% de chlorure de méthylène et de 2 à 5% d'isopropanol.

Selon un mode préférentiel, les cristaux sont dissous avec du chlorure méthylène, ensuite mélangés avec du gel de silice, puis séchés. Le gel imprégné de paclitaxel

20 est chargé sur une colonne chromatographique (76 cm x 7,6 cm de diamètre intérieur) contenant 1,5-1,6 kg de gel de silice. Le gel de la colonne est lavé et équilibré avec un mélange de solvants: chlorure méthylène et iso-propanol (98 – 2%, volume par volume). L'élution des fractions est réalisée avec le même mélange de solvants, le débit est de 50 ml/min, la pression varie entre 0-30 psi.

F – Troisième cristallisation

Dans cette étape, les fractions enrichies contenant du paclitaxel récupérées par chromatographie dans l'étape précédente de purification sont regroupées selon leur pureté, de préférence selon les puretés +98 à 99% et 90 à 98%, puis
5 évaporées à sec puis remises en solution dans le méthanol.

Le volume de méthanol ajouté est ajusté de façon à obtenir une absorbance variant de 1,0 à 1,5 D.O. pour le pic correspondant au paclitaxel selon l'analyse par HPLC.

Puis le paclitaxel est recristallisé pour la troisième fois par ajout de 2 à 10 volumes
10 d'eau dans la solution de méthanol.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le paclitaxel est recristallisé pour la troisième fois par ajout de 4 à 7 volumes d'eau dans la solution de méthanol.

De façon préférentielle, et plus particulièrement dans la dernière étape de
15 purification et de recristallisation, l'eau utilisée est une eau préalablement purifiée.

La purification de l'eau est, de préférence, réalisée par désionisation et/ou par distillation.

Selon un autre mode préférentiel, 7 à 10 volumes d'eau pure préalablement refroidie à une température comprise entre 2-4°C sont ajoutés dans un volume de
20 la solution de méthanol refroidie dans de la glace. Les cristaux apparaissent immédiatement. La cristallisation est poursuivie toute la nuit à une température comprise entre 2-4°C. L'addition de l'eau dans la solution de méthanol peut se faire à la température ambiante. La formation des cristaux sera alors plus lente, elle sera complétée durant la nuit à 2-4°C. Les cristaux sont filtrés et séchés sous
25 ventilation ou sous vide, pour obtenir une poudre fine et détachée, les cristaux

sont remis en suspension dans de l'eau pure et lyophilisés pendant 66 à 72 heures à une température de l'ordre de -60°C .

Les fractions de taxanes sont analysées par chromatographie HPLC (Waters system) comprenant 1 Autosampler (Waters 717 plus), 1 Photodiode Array
5 Detector (Waters 996), 1 Multisolvant Delivery System (Waters* 600E) et 1 colonne Nova-Pak* C18, 60 Å, 4µm (3,9 x 150 mm).

L'analyse des fractions est effectuée par injection d'un volume de 5 µl; le débit de la phase mobile est de 1ml/min., en utilisant un gradient de solvant : acetonitrile – eau – méthanol (au début 20 : 50 : 30; à la fin 35 : 35 : 30).

10 Les pics des composés sont détectés à 228 nm et le temps d'analyse d'un échantillon est de 36 minutes.

Selon un mode particulièrement avantageux de réalisation du procédé selon la présente invention, le solvant volatil utilisé dans les étapes 5, 6 et 9 de purification chromatographique pour la solubilisation du résidu est choisi dans le groupe
15 constitué par les cétones, les alcools légers en C1-C3, l'acétate éthyle, le chlorure de méthylène et les mélanges de ces solvants.

À la fin de l'étape F après cristallisation du paclitaxel dans l'eau, après filtration puis séchage, on recueille un mélange de cristaux de paclitaxel.

Ce mélange de cristaux de paclitaxel est constitué, après filtrage et séchage des
20 cristaux, de :

- 53% de cristaux d'une pureté supérieure à 99%,
- 22% de cristaux d'une pureté supérieure à 98%, et
- 23% de cristaux d'une pureté supérieure à 92%.

* marque de commerce

EXEMPLES DE MISE EN ŒUVRE DU PROCÉDÉ SELON L'INVENTION

Les exemples ci-après sont donnés à titre purement illustratif et ne sauraient être considérés comme constituant une limitation de la présente invention.

EXEMPLE 1

- 5 50 kg d'aiguilles et de petites branches sèches de *Taxus canadensis* sont lavées avec de l'eau déionisée et séchées sous ventilation. Les matières premières sont broyées et transférées dans un sac en coton. Ce sac est ensuite mis dans une cuve inoxydable contenant 150 L d'un mélange de solvant (Chlorure méthylène – Méthanol; 1:1 volume par volume). L'extraction se fait pendant 16 heures à la
- 10 température ambiante. L'extrait est ensuite pompé à travers des filtres dans une deuxième cuve à double parois. Le solvant est distillé à l'aide d'une circulation d'eau chaude à 70°C dans la double paroi jusqu'à l'obtention d'un liquide très épais.

Première précipitation

- 15 Le concentré de l'extrait est récupéré et dilué avec 2 L de méthanol. La biomasse est isolée par précipitation en ajoutant l'extrait dans une solution de NaOH à 20 mM. Un précipité très fin se forme au fur et à mesure de l'ajout de l'extrait dans la solution de NaOH. Le rapport de l'extrait par rapport à la solution basique est de 1:15.
- 20 Ce précipité fin est très difficile à filtrer, la centrifugation à haute vitesse :15 000-20 000 tpm peut permettre de récupérer la biomasse. Un relargage de la solution par NaCl à raison de 50g/L de solution permet de rendre le précipité plus aggloméré. Le précipité est filtré ou centrifugé à 4200 tpm à 20°C pendant 30 minutes (Centrifugeuse Beckman J6MC, rotor JS 4.2). Une centrifugeuse à flot
- 25 continu peut être utilisée pour un grand volume.

Le précipité récupéré est séché à l'air ou sous vide ou lyophilisé (Freeze dryer – FTS Systems), le poids du précipité est de 500-550 g. Ce précipité est solubilisé dans 2 L d'acétone et filtré ou centrifugé à 4200 tpm, à 0-2°C pendant 30 minutes pour enlever les particules insolubles.

5 **Percolation**

- Ensuite, 1 L de solution d'acétone est transvasé dans une ampoule à décanter de 6 L, la solution est percolorée par 4 L d'hexane en ajoutant 1 L à la fois avec une forte agitation manuelle à chaque fois. Le mélange est laissé à reposer pendant une dizaine de minutes, la phase huileuse est récupérée au fond de l'ampoule. Le
- 10 volume d'acétone peut être traité totalement en une seule fois en utilisant un grand b cher ou une cuve adéquate, la phase hexane est siphonnée et le liquide restant est transvasé dans une ampoule à décanter pour terminer la récupération de la phase huileuse. La phase hexane très colorée est  cart e.

Deuxième précipitation

- 15 La phase huileuse est ensuite évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 2 L de méthanol. La biomasse est isolée pour la deuxième fois par précipitation en ajoutant la solution de méthanol dans une solution de HCl à 20 mM. Un précipité très fin se forme au fur et à mesure de l'ajout de l'extrait. Le rapport de l'extrait par rapport à la solution acide est de 1:5. Ce précipité fin est très difficile à filtrer, la
- 20 centrifugation à haute vitesse :15 000-20 000 tpm peut permettre de récupérer la biomasse. Un relargage de la solution par NaCl (50 g/L de solution) permet de rendre le précipité plus aggloméré. Le précipité est filtré ou centrifugé à 4200 tpm à 20°C pendant 30 minutes (Centrifuge Beckman J6MC, rotor JS 4.2). Une centrifugeuse à flot continu peut être utilisée pour un grand volume.

25 **Première purification par chromatographie sur gel de silice à basse pression**

Le précipité récupéré est séché à l'air ou sous vide ou lyophilisé, le poids du précipité est de 240-260 g. Ce précipité est solubilisé dans 0.5 L d'acétone et filtré

ou centrifugé à 4200 tpm, à 0-2°C pendant 30 minutes pour enlever les particules insolubles. La solution d'acétone est mélangée avec 200-250 g de gel de silice (230-400 mesh, qualité pharmaceutique, Silicycle*, Québec, Canada). Le gel imprégné de l'extrait est séché à l'air sous ventilation ou sous vide. Le gel séché
5 est chargé sur une colonne (142 x 7,6 cm de diamètre intérieur) contenant 2,2 kg de gel de silice (230-400 mesh). Le gel est lavé et équilibré avec un mélange d'acétone et d'hexane (40:60%, volume par volume). L'élution est effectuée avec le même solvant à l'aide d'un système de délivrance de solvant Dynamax*, le débit de l'élution est de 100 ml/min. avec une pression entre 10-30 psi. Le volume
10 du mélange de solvant est de 30 L et chaque fraction est collectée avec 1 L de solvant. Les analyses par HPLC indiquent qu'il y a 9 fractions qui contiennent du paclitaxel, de la 17^e fraction à la 25^e fraction.

Les teneurs de paclitaxel déterminées par HPLC dans ces fractions sont comme suit : 11; 24; 32; 40; 38; 33; 29; 14 et 9%. L'ordre des fractions contenant du
15 paclitaxel peut être décalé d'une ou de deux fractions d'une purification à l'autre.

Deuxième purification par chromatographie sur gel de silice à basse pression

Les fractions contenant du paclitaxel sont groupées ensemble et évaporées à sec. Le résidu est resolubilisé dans 100 ml d'acétone et mis en contact avec 100 g de
20 gel de silice. Le gel enrobé de paclitaxel est séché à l'air sous ventilation ou sous vide. Le gel séché est chargé sur une colonne (142 x 7,6 cm de diamètre intérieur) contenant 2,2 kg de gel de silice (230-400 mesh). Le gel est lavé et équilibré avec un mélange d'acétone et d'hexane (40:60%, volume par volume). L'élution est effectuée avec le même solvant à l'aide d'un système de délivrance de solvant, le
25 débit de l'élution est de 100 ml/min. avec une pression entre 10-30 psi. Le volume du mélange de solvant est de 30 L et les fractions sont collectées avec 1 L de solvant par fraction. Les analyses par HPLC indiquent qu'il y a 5 fractions qui contiennent du paclitaxel de la 22^e fraction à la 26^e fraction, la teneur de paclitaxel

* marque de commerce

déterminée par HPLC dans ces fractions sont comme suit : 40; 58; 66; 50 et 49%. L'ordre des fractions contenant du paclitaxel peut être décalé d'une ou de deux fractions d'une purification à l'autre.

Première cristallisation

- 5 Les fractions contenant du paclitaxel sont groupées ensemble et évaporées à sec. Le résidu est resolubilisé dans 800 ml d'acétone. L'ajustement du volume d'acétone est nécessaire selon l'analyse par HPLC de façon à obtenir une absorbance d'1,0 à 1,5 D.O. pour le pic de paclitaxel. 3 volumes d'hexane (2.4 L) sont ajoutés à la solution d'acétone. Les cristaux se forment dans l'heure qui suit.
- 10 Le mélange est gardé à une température comprise entre 2-8° C pour toute la nuit pour compléter la cristallisation.

Deuxième cristallisation

- Les cristaux sont filtrés et redissous dans 400 ml d'acétone. 3 volumes d'hexane (1,2 L) sont ajoutés à la solution d'acétone. Les cristaux se forment dans l'heure
- 15 qui suit. Le mélange est gardé à une température comprise entre 2-8° C pour toute la nuit pour compléter la cristallisation. Les cristaux sont séchés à l'air ou sous vide.

Le poids sec obtenu est de 10 g $\pm$ 0,2 g. L'analyse par HPLC indique que la teneur de paclitaxel est de l'ordre de 80% et plus.

20 3° purification par chromatographie sur gel de silice à basse pression

- Les cristaux sont dissous dans 75 ml de chlorure méthylène et mis en contact avec 75 g de gel de silice. Le gel enrobé de paclitaxel est séché à l'air sous ventilation ou sous vide. Le gel séché est chargé sur une colonne (76 x 7,6 cm de diamètre intérieur) contenant 1,5 kg de gel de silice (230-400 mesh). Le gel est
- 25 lavé et équilibré avec un mélange de chlorure méthylène et d'isopropanol (98:2%, volume par volume). L'élution est effectuée avec le même solvant à l'aide d'un

système de délivrance de solvant Dynamax*, le débit de l'élution est de 50 ml/min. avec une pression entre 10-30 psi. Le volume du mélange de solvant est de 30 L et les fractions sont collectées avec 1 L de solvant par fraction. Les analyses par HPLC indiquent qu'il y a 12 fractions qui contiennent du paclitaxel de la 11^e fraction à la 22^e fraction, les teneurs de paclitaxel déterminées par HPLC, dans ces fractions, sont comme suit : 80; 97; 99,50; 99,70; 99,70; 99,30; 98,60; 97,30; 94; 92; 89 et 85%. L'ordre des fractions contenant du paclitaxel peut être décalé d'une ou de deux fractions d'une purification à l'autre.

3^e cristallisation

10 Les fractions contenant du paclitaxel sont groupées ensemble selon les puretés et évaporées à sec. Les fractions de 12 à 16 sont dissoutes dans 100 ml de méthanol (HPLC grade), les fractions 17 et 18 sont dissoutes dans 45 ml de méthanol (HPLC grade) et les fractions de 19 à 22 sont dissoutes dans 75 ml de méthanol (HPLC grade).

15 1) 700 ml d'eau (HPLC grade) préalablement refroidie à 2-8°C sont ajoutés dans la solution du méthanol (fractions 12 à 16) refroidi dans la glace. Les cristaux blancs sont apparus immédiatement.

20 2) 300 ml d'eau (HPLC grade) préalablement refroidie à 2-8°C sont ajoutés dans la solution de méthanol (fractions 17 et 18) refroidi dans la glace. Les cristaux blancs sont apparus immédiatement.

3) 500 ml d'une eau (HPLC grade) préalablement refroidie à 2-8°C sont ajoutés dans la solution du méthanol (fractions 19 à 22) refroidi dans la glace. Les cristaux blancs sont apparus immédiatement.

25 Ces cristaux sont filtrés séparément et séchés à l'air ou sous vide. Les poids secs et les puretés des cristaux analysées par HPLC sont comme suit :

* marque de commerce

Fractions 12 à 16 : 3,40 g – Pureté : 99,30%

Fractions 17 à 18 : 1,40 g – Pureté : 98,85%

Fractions 19 à 22 : 1.60g – Pureté : 92,70%

5 Les cristaux qui ont une pureté inférieure à 98% sont conservés et repurifiés ensemble par chromatographie dans les mêmes conditions que dans la 3^e purification ci-dessus décrite. Cette repurification permet d'obtenir encore environ 75% de la quantité totale de ces cristaux avec une pureté supérieure à 99%.

EXEMPLE 2

10 L'exemple 2 ne concerne que deux étapes de précipitation, les autres étapes du procédé sont identiques à celles présentées dans l'exemple 1.

Première précipitation

15 Le concentré de l'extrait est récupéré et dilué avec 2 L de méthanol. La biomasse est isolée par précipitation en ajoutant l'extrait dans une solution de HCl à 20 mM. Un précipité très fin se forme au fur et à mesure de l'ajout de l'extrait. Le rapport de l'extrait par rapport à la solution acide est de 1:10. Ce précipité fin est très difficile à filtrer, la centrifugation à haute vitesse :15 000-20 000 tpm permet de récupérer la biomasse. Un relargage de la solution par NaCl (50 g/L de solution) permet de rendre le précipité plus aggloméré. Le précipité est filtré ou centrifugé à 4200 tpm à 20°C pendant 30 minutes (Centrifugeuse Beckman* J6MC, rotor JS 20 4.2). Une centrifugeuse à flot continu peut être utilisée pour un grand volume.

Le précipité récupéré est séché à l'air ou sous vide ou lyophilisé, le poids du précipité est de 500-520 g. Ce précipité est solubilisé dans 2 L d'acétone et filtré ou centrifugé à 4200 tpm, à 0-2°C pendant 30 minutes pour enlever les particules insolubles.

* marque de commerce

Deuxième précipitation

La phase huileuse est ensuite évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 2 L méthanol. La biomasse est isolée pour la deuxième fois par précipitation en ajoutant la solution du méthanol dans une solution de NaOH à 20 mM. Un
5 précipité très fin se forme au fur et à mesure de l'ajout de l'extrait. Le rapport de l'extrait par rapport à la solution basique est de 1:5. Ce précipité fin est très difficile à filtrer, la centrifugation à haute vitesse :15 000-20 000 tpm peut permettre de récupérer la biomasse. Un relargage de la solution par NaCl (50 g/L de solution) permet de rendre le précipité plus aggloméré. Le précipité est filtré ou centrifugé à
10 4200 tpm à 20°C pendant 30 minutes (Centrifugeuse Beckman J6MC, rotor JS 4.2). Une centrifugeuse à flot continu peut être utilisée pour un grand volume.

Les rendements et les puretés du paclitaxel sont sensiblement identiques à ceux obtenus pour l'exemple 1.

Les exemples donnés ci-dessus démontrent que la présente invention apporte
15 une nette diminution du coût de production de paclitaxel par rapport aux différentes techniques décrites dans l'art ultérieur. Cette diminution du coût est constituée par une augmentation du rendement de paclitaxel avec une pureté thérapeutique acceptable; par une économie appréciable en terme de consommables (solvants, gel...) et en temps de production. En plus de ces
20 avantages, la présente invention présente un procédé très simple, rapide et facilement applicable à l'échelle industrielle sans être limité par la trop faible quantité de paclitaxel dans les biomasses traitées.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'extraction et de purification du paclitaxel à partir d'une source naturelle de taxanes contenant le paclitaxel à extraire, ledit procédé comportant les étapes suivantes :

- 1) extraction, à l'aide d'un solvant organique, d'une matière première comportant du paclitaxel à partir de ladite source naturelle de taxanes;
- 2) première précipitation de la biomasse contenue dans ladite matière première, à l'aide d'une base ou d'un acide, suivie de l'isolation de ladite biomasse et de son séchage ;
- 3) percoloration par l'enlèvement de la résine et des pigments naturels contenus dans la biomasse isolée dans l'étape précédente, par préparation d'un mélange par mise en solution dans l'acétone de ladite biomasse puis par ajout d'un ou de plusieurs solvants non polaires, jusqu'à l'obtention d'une phase huileuse enrichie en paclitaxel;
- 4) deuxième précipitation par une base ou par un acide de la biomasse contenue dans la phase huileuse enrichie en paclitaxel récupérée dans l'étape précédente, suivie de l'isolation du précipité et de son séchage;
- 5) d'au moins une étape de purification chromatographique de la solution dans un solvant volatil du précipité isolé dans l'étape précédente et d'au moins une étape de cristallisation à partir de la solution purifiée obtenue par chromatographie.

2. Procédé d'extraction et de purification du paclitaxel à partir d'une source naturelle de taxanes contenant le paclitaxel à extraire, ledit procédé comportant les étapes suivantes :

- 1) extraction, à l'aide d'un solvant organique, d'une matière première comportant du paclitaxel à partir de ladite source naturelle de taxanes;
- 2) première précipitation de la biomasse contenue dans ladite matière première, à l'aide d'une base ou d'un acide, suivie de l'isolation de ladite biomasse et de son séchage ;
- 3) percoloration par l'enlèvement de la résine et des pigments naturels contenus dans la biomasse isolée dans l'étape précédente, par préparation d'un mélange par mise en solution dans l'acétone de ladite biomasse puis par ajout d'un ou de plusieurs solvants non polaires, jusqu'à l'obtention d'une phase huileuse enrichie en paclitaxel;
- 4) deuxième précipitation par une base ou par un acide de la biomasse contenue dans la phase huileuse enrichie en paclitaxel récupérée dans l'étape précédente, suivie de l'isolation du précipité et de son séchage;
- 5) première étape de purification chromatographique par mise en solution dans un solvant volatil du précipité isolé dans l'étape précédente, la préparation d'un mélange de la solution ainsi obtenue avec du gel de silice, traitement dudit mélange sur une colonne chromatographique contenant le même type de gel, et récupération de fractions enrichies en paclitaxel;
- 6) deuxième étape de purification chromatographique par évaporation à sec des fractions enrichies en paclitaxel récupérées dans l'étape précédente jusqu'à obtention d'un résidu et préparation d'un mélange par solubilisation dudit résidu dans un solvant volatil, ledit mélange étant repurifié par chromatographie dans les mêmes conditions que dans l'étape précédente pour fournir de nouvelles fractions enrichies en paclitaxel;
- 7) première cristallisation par évaporation à sec des fractions enrichies en paclitaxel recueillies dans l'étape précédente jusqu'à obtention d'un résidu, préparation d'un mélange dudit résidu dans l'acétone et

cristallisation du paclitaxel contenu dans le mélange par un solvant non polaire;

8) deuxième cristallisation par solubilisation des cristaux de paclitaxel obtenus dans l'étape précédente dans de l'acétone et par recristallisation du paclitaxel dans les mêmes conditions que dans l'étape précédente;

9) troisième purification chromatographique par préparation d'une solution par solubilisation des cristaux obtenus par recristallisation dans l'étape précédente dans un solvant volatil, puis par préparation d'un mélange de ladite solution avec du gel de silice et par traitement dudit mélange sur une colonne chromatographique contenant le même type de gel, pour obtenir à l'aide d'un solvant d'élution des fractions enrichies en paclitaxel; et

10) troisième cristallisation par l'évaporation à sec des fractions enrichies en paclitaxel obtenues dans l'étape précédente, par préparation d'un mélange par solubilisation du résidu résultant de ladite évaporation dans un alcool ou dans une cétone ou dans un mélange alcool-cétone, et par cristallisation du paclitaxel contenu dans le mélange par de l'eau.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la source naturelle de taxanes est du genre *Taxus*.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la source naturelle du genre *Taxus* est une espèce de conifères contenant du paclitaxel.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'espèce de conifères contenant du paclitaxel est choisie dans le groupe constitué par *Taxus brevifolia*, *Taxus baccata*, *Taxus canadensis*, *Taxus walichiana*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus densiformis*, *Taxus hicksii*, *Taxus wardii*, *Taxus cuspidata*, *Taxus capitata*, *Taxus brownii*.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que dans l'étape 1 d'extraction, toutes les parties constitutives de la source naturelle de taxanes qui contiennent du paclitaxel sont traitées.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que, dans l'étape 1 d'extraction, les écorces de la source naturelle de taxanes sont traitées.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les branches et les aiguilles de la source naturelle de taxanes sont simultanément traitées.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que dans l'étape 1 d'extraction, le solvant organique est choisi dans le groupe constitué par les alcools, les hydrocarbures halogénés et les mélanges d'alcools et d'hydrocarbures halogénés.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le solvant est un mélange de méthanol et de dichlorométhane ou un mélange de méthanol et de trichlorométhane.
11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que le rapport volumique du mélange alcool-hydrocarbure halogéné varie de 9:1 à 1:9.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le rapport volumique du mélange alcool-hydrocarbure halogéné est d'environ 1:1.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que dans l'étape 2, la précipitation de la biomasse est réalisée en milieu basique.
14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le milieu basique est constitué par une solution d'un sel basique.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le sel basique est sélectionné dans le groupe constitué par un acétate de sodium, un acétate de potassium, un hydroxyde de sodium ou du tris(hydroxyméthyl)aminométhane.
16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le sel basique est l'hydroxyde de sodium.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la concentration en hydroxyde de sodium de la solution basique est comprise entre 10 mM et 80 mM par litre de solution.
18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la concentration en hydroxyde de sodium est comprise entre 20 mM et 50 mM par litre de solution.
19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, caractérisé en ce que le pH du milieu est compris entre 8,5 et 11.
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le pH du milieu est compris entre 9 et 10.
21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que dans l'étape 2, la précipitation est réalisée en milieu acide.
22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le milieu acide est constitué par une solution d'un acide minéral ou organique.
23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que l'acide est choisi dans le groupe constitué par les acides chlorhydrique, acétique et citrique.
24. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 23, caractérisé en ce que la concentration en acide de ladite solution est comprise entre 10 mM et 50 mM par litre de solution.

25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que la concentration en acide est comprise entre 20 mM et 30 mM par litre de solution.
26. Procédé selon l'une quelconque des revendications 21 à 25, caractérisé en ce que le pH du milieu acide est compris entre 2 et 4.
27. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, caractérisé en ce que dans l'étape 2, le volume de la solution basique ou acide ajoutée pour provoquer la précipitation de la biomasse est compris entre 1 à 20 fois le volume de l'extrait obtenu dans l'étape 1.
28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le volume de la solution basique ajoutée est compris entre 1 à 15 fois le volume de l'extrait obtenu dans l'étape 1.
29. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le volume de la solution acide ajoutée est compris entre 1 à 10 fois le volume de l'extrait obtenu dans l'étape 1.
30. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 29, caractérisé en ce que la biomasse obtenue par précipitation dans l'étape 2 est en outre relarguée avant isolation et séchage par ajout de chlorure de sodium jusqu'à une concentration comprise entre 25 et 200 g par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.
31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que le chlorure de sodium est ajouté jusqu'à une concentration comprise entre 50 et 100 g par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.
32. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 31, caractérisé en ce que la biomasse précipitée dans l'étape 2, est séparée de la solution par filtration ou par centrifugation puis séchée par ventilation ou par lyophilisation.

33. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 32, caractérisé en ce que le ou les solvant(s) non polaire(s) utilisé(s) dans l'étape 3 de percoloration est (sont) choisi(s) dans le groupe constitué par les hydrocarbures.
34. Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que le solvant non polaire est l'hexane ou l'heptane.
35. Procédé selon la revendication 31, caractérisé en ce que dans l'étape 3, la biomasse séchée obtenue dans l'étape 2 est remise en solution sous forme d'un mélange obtenu par addition d'acétone jusqu'à un volume égal à 2 volumes de la matière première extraite dans l'étape 1 et avant précipitation.
36. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que la biomasse séchée est remise en solution sous forme d'un mélange obtenu par ajout d'acétone puis par ajout d'eau.
37. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce que l'eau est ajoutée à raison de 2 à 10 volumes pour 100 volumes d'acétone ajouté.
38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que l'eau est ajoutée à raison de 5 à 7 volumes pour 100 volumes d'acétone ajouté.
39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 38, caractérisé en ce que dans l'étape 4, la phase enrichie en paclitaxel obtenue dans l'étape 3 est évaporée à sec et remise en solution dans le méthanol, ladite solution de méthanol est alors précipitée en milieu basique lorsque la première précipitation décrite dans l'étape 2 a été réalisée en milieu acide, ou en milieu acide lorsque la première précipitation décrite dans l'étape 2 a été réalisée en milieu basique, pour donner une biomasse contenant du paclitaxel, et dans laquelle le paclitaxel est sous forme de précipité.
40. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 39, caractérisé en ce que la biomasse obtenue par précipitation dans l'étape 4 est en outre relarguée

avant isolation et séchage par ajout de chlorure de sodium jusqu'à une concentration comprise entre 30 et 200 g par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.

41. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que le chlorure de sodium est ajouté jusqu'à une concentration comprise entre 50 et 100 g par litre de solution acide ou basique résultant de la précipitation.

42. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 41, caractérisé en ce que dans l'étape 5, la biomasse obtenue dans l'étape 4, est remise en solution dans un solvant volatil et la solution de solvant volatil est mélangée avec un gel de silice et séchée sous ventilation, puis le gel de silice recouvert de la biomasse est déposé sur une colonne chromatographique contenant le même type de gel, la biomasse est alors purifiée à l'aide d'un mélange d'élution comprenant de 30% à 40% d'acétone et de 60% à 70% d'hexane.

43. Procédé selon la revendication 42, caractérisé en ce que le mélange d'élution comprend environ 40% d'acétone et environ 60% d'hexane.

44. Procédé selon la revendication 42 ou 43, caractérisé en ce que dans l'étape 6, les fractions enrichies contenant du paclitaxel, obtenues par chromatographie selon l'étape 5, sont regroupées et évaporées à sec, remises en solution dans un solvant volatil, puis la solution obtenue est mélangée avec un gel de silice et séchée sous ventilation, le gel de silice recouvert de la biomasse est déposé sur une colonne de chromatographie contenant le même type de gel, puis le paclitaxel est repurifié par un mélange de solvant organique comprenant de 30 à 40% d'acétone et de 60 à 70% d'hexane.

45. Procédé selon la revendication 44 caractérisé en ce que le mélange de solvant organique contient environ 40% d'acétone et 60% d'hexane.

46. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 45, caractérisé en ce que dans l'étape 7, les fractions contenant du paclitaxel, obtenues par

chromatographie dans l'étape 6, sont regroupées et évaporées à sec, remises en solution dans l'acétone, la quantité d'acétone étant ajustée de façon à obtenir une absorbance de ladite solution ayant une valeur de 1,0 à 1,5 D.O., pour le pic correspondant au paclitaxel selon l'analyse par HPLC, puis le paclitaxel est cristallisé en ajoutant de 3 à 4 volumes d'hexane dans la solution d'acétone.

47. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 46, caractérisé en ce que dans l'étape 8, les cristaux obtenus dans l'étape 7 sont séparés par filtration, remis en solution dans l'acétone, le volume d'acétone étant ajusté de façon à obtenir une absorbance de ladite solution variant de 1,0 à 1,5 D.O. pour le pic correspondant au paclitaxel selon l'analyse par HPLC, puis le paclitaxel est recristallisé en ajoutant de 3 à 4 volumes d'hexane dans la solution d'acétone.

48. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 47, caractérisé en ce que dans l'étape 9, les cristaux obtenus dans l'étape 8, sont filtrés, puis remis en solution dans le chlorure de méthylène, la solution ainsi obtenue est alors mélangée avec un gel de silice et séchée sous ventilation, le gel de silice est recouvert de paclitaxel est déposé sur une colonne chromatographique contenant le même type de gel, le paclitaxel est alors repurifié pour la troisième fois par un mélange d'élution à base de solvants organiques.

49. Procédé selon la revendication 48, caractérisé en ce que le mélange d'élution comprend de 95 à 98% de chlorure de méthylène et de 2 à 5% d'isopropanol.

50. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 49, caractérisé en ce que dans l'étape 10, les fractions enrichies contenant du paclitaxel, obtenues par chromatographie dans l'étape 9, sont regroupées selon leur pureté et évaporées à sec et puis remise en solution dans le méthanol, le volume de méthanol étant ajouté de façon à obtenir une absorbance variant de 1,0 à 1,5 D.O. pour le pic correspondant au paclitaxel selon l'analyse par HPLC, puis le paclitaxel est recristallisé pour la troisième fois par ajout de 2 à 10 volumes d'eau dans la solution de méthanol.

51. Procédé selon la revendication 50, caractérisé en ce que le paclitaxel est recristallisé pour la troisième fois par ajout de 4 à 7 volumes d'eau dans la solution de méthanol.

52. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 51, caractérisé en ce que l'eau utilisée est purifiée.

53. Procédé selon la revendication 51, caractérisé en ce que l'eau est purifiée par désionisation et/ou par distillation.

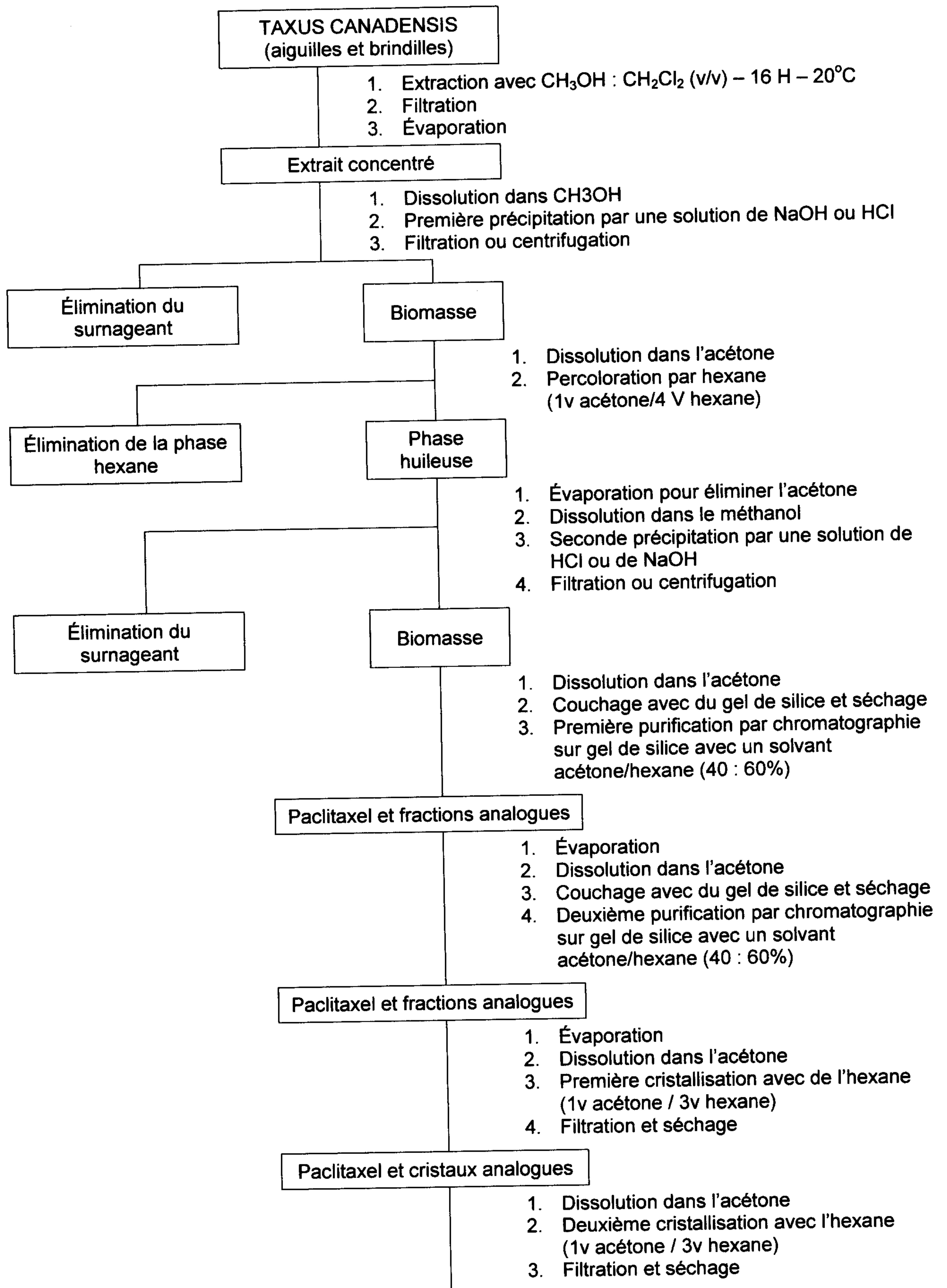
54. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 53, caractérisé en ce que le solvant volatil utilisé dans les étapes 5, 6 et 9 est choisi dans le groupe constitué par les cétones, les alcools légers en C1-C3, l'acétate d'éthyle, le chlorure de méthylène et les mélanges de ces solvants.

55. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 54, caractérisé en ce que, dans l'étape 10, après cristallisation du paclitaxel dans l'eau, un mélange de cristaux de paclitaxel est obtenu après filtration puis séchage.

56. Mélange de cristaux de paclitaxel obtenus par l'un des procédés définis dans l'une quelconque des revendication 2 à 55.

57. Mélange de cristaux de paclitaxel selon la revendication 56 caractérisé en ce que, après filtrage et séchage des cristaux, ledit mélange est constitué de :

- 53% de cristaux d'une pureté > 99%,
- 22% de cristaux d'une pureté > 98%, et
- 23% de cristaux d'une pureté > 92%.



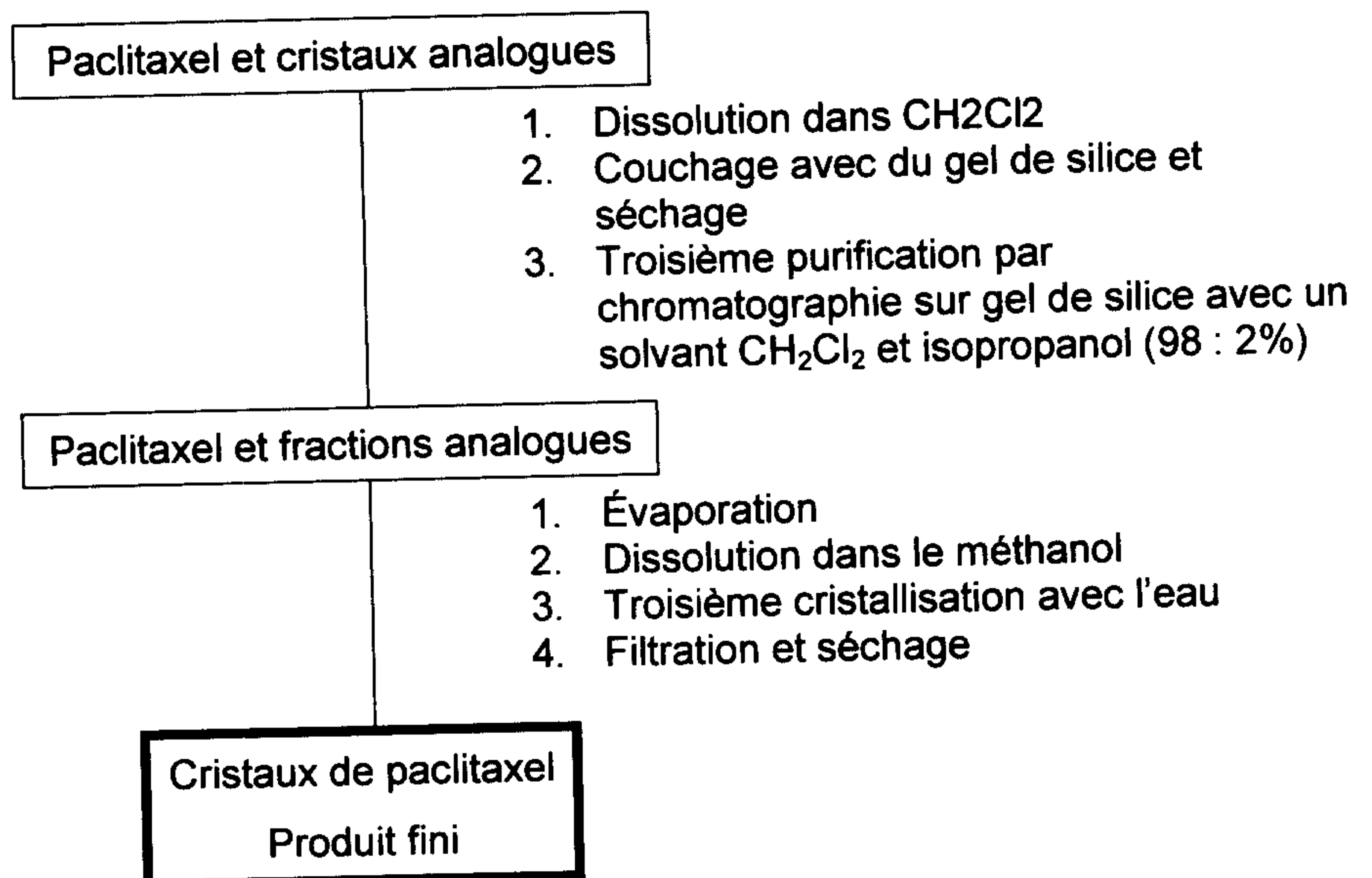


FIGURE I