



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 890**

51 Int. Cl.:  
**C07D 305/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05768158 .7**

96 Fecha de presentación : **01.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1765802**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de paclitaxel.**

30 Prioridad: **02.07.2004 US 585401 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

73 Titular/es: **IVAX Pharmaceuticals S.R.O.**  
**Ostravska 29**  
**747 70 Opava 9, CZ**

72 Inventor/es: **Buchta, Martin;**  
**Cvak, Ladislav;**  
**Sobotik, Roman y**  
**Stverka, Pavel**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 315 890 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento de paclitaxel.

5 **Campo de la invención**

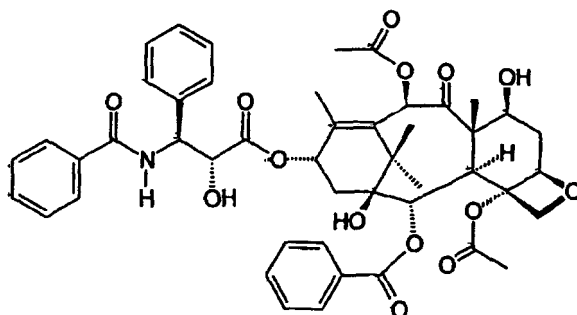
La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación mediante cromatografía de paclitaxel a partir de mezclas que contienen paclitaxel.

10 **Antecedentes**

El paclitaxel, anteriormente conocido como "taxol", es un importante agente quimioterapéutico útil para el tratamiento de tumores de ovario, mama y pulmón en seres humanos. Ha mostrado resultados prometedores en varios casos de cánceres en humanos y se ha descrito sobre sus utilidades clínicas en varios artículos de revistas, como en Rowinsky, E.K., Ann. Rev. Med. 48:353 1997; Van Hoff., D. D., Semin. Oncol. 24:3 (1997); DeFuria, M. D., Phytomedicine 4:273 (1997); y Eisenhauer, E. A., Vermorken, J. B., Drugs 55:5 (1998).

El paclitaxel es un compuesto natural y lo aisló por primera vez Wani, *et al.*, a partir de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). J. Am. Chem. Soc. 93:2325 (1971). Desde entonces, los investigadores han reconocido que el paclitaxel existe en todas las demás especies del *Taxus* genus, incluyendo el tejo europeo (*Taxus baccata*), el tejo del Himalaya (*Taxus Wallichiana*), el tejo chino (*Taxus celebica*), el tejo japonés (*Taxus cuspidata*), tejo canadiense (*Taxus canadensis*), tejo mejicano (*Taxus globosa*), tejo de Florida (*Taxus floridana*), y el tejo ornamental (*Taxus media*) y en todos sus híbridos y cultivos.

La fórmula estructural del paclitaxel se ha determinado y se reproduce a continuación.



El aislamiento del paclitaxel a partir de todos los tipos de fuentes vegetales potenciales es complejo y difícil, en parte debido a su muy baja concentración en la biomasa y en parte debido a la presencia de otros compuestos distintos, principalmente los taxanos, que presentan unas propiedades similares a las del paclitaxel. Debido a su alta demanda y a su baja disponibilidad, se han buscado con interés fuentes potenciales adicionales para la producción industrial de paclitaxel (Cragg, G. M., *et al.*, J. Nat. Prod. 56:1657 (1993)). Algunas de estas fuentes incluyen la renovación de partes de todo tipo de plantas del género *Taxus* (hojas, hierbas, y plantas completas cultivadas hidropónicamente), la fermentación de cultivos tisulares del *Taxus*, la fermentación de hongos parásitos en el *Taxus*, etc.

Normalmente, el paclitaxel se aísla mediante primero, la extracción de una biomasa con unos solventes adecuados para obtener extractos que se refinan mediante procedimientos de extracción líquido-líquido. Después de los procedimientos de extracción, el aislamiento del paclitaxel normalmente continúa con una etapa de cromatografía de fase inversa. Se pueden encontrar muchos ejemplos sobre esta técnica en la bibliografía, incluyendo: Dauh-Rung Wu, *et al.*, J. Chrom. A, 702:233 (1995); Koppaka V. Rao, *et al.*, Pharm. Res. 12:1003 (1995); y Xuefeng Yang, *et al.*, J. Chrom. A, 813:201 (1998). La cromatografía de fase inversa para la purificación final también se describe en diversas patentes, como: la patente US n° 5.279.949; la patente US n° 5.380.916; y la patente US n° 5.969.165. También se desarrolló un procedimiento continuo basado en un proceso de cromatografía de fase inversa sobre un lecho móvil simulado. Dauh-Rung Wu, *et al.*, J. Chrom. A, 855:71 (1999). Sin embargo, una desventaja de la utilización de la cromatografía de fase inversa es la necesidad de utilizar unos solventes que contengan agua, que pueden causar contrariamente la isomerización del paclitaxel en un 7-*epi*-paclitaxel no deseado.

La utilización de la cromatografía de fase normal también es conocida para el aislamiento del paclitaxel. Sin embargo, este procedimiento utiliza unas fases estacionarias caras, como las fases alquilo fenilo y pentafluor fenilo. Dauh-Rung Wu, *et al.*, J. Chrom. A, 702:233 (1995). Los métodos más recientes para el aislamiento del paclitaxel se basan en unos complicados procesos de elución por gradiente, o en varias etapas de cromatografías que utilizan distintas composiciones de fase móvil, o en una combinación tanto de cromatografía de fase inversa como de fase normal. Ver, por ejemplo, Young Kwang Park, *et al.*, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 22 (18): 2755 (1999); Jun Xue, *et al.*, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 23 (16): 2499 (2000); la patente US n° 5.478.736. Otro enfoque es la utilización de una cromatografía de fase normal que utiliza alumbre como adsorbente. Desafortunadamente, los solventes orgánicos

clorados se utilizan a menudo como fase móvil con alumbre. Además, tanto la epimerización como la descomposición química del paclitaxel tienen lugar en este sistema, dependiendo del tiempo de elución. Zhiqiang Z., Zhiguo S., J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 23 (17): 2683 (2000).

5 Recientemente, se ha dado a conocer en la patente US nº 6.333.419 el aislamiento de paclitaxel mediante una cromatografía de fase normal que utiliza una fase estacionaria de sílice y una fase móvil de éster de ácido carboxílico. El procedimiento descrito en la presente memoria se diseñó para la separación del paclitaxel a partir de la cefalomanina.

10 Existe, sin embargo, una continua necesidad de un aislamiento a gran escala del paclitaxel a partir de una variedad de componentes no deseados con operaciones de purificación simples y eficaces.

### Sumario de la exposición

15 Una ventaja de la presente invención es un método simple, barato y eficaz para el aislamiento a gran escala y para la producción de paclitaxel de alta pureza.

20 Estas y otras ventajas se han alcanzado, por lo menos en parte, mediante un procedimiento para el aislamiento del paclitaxel a partir de mezclas de paclitaxel que utiliza una cromatografía de fase normal basada en un compuesto a base de poliamida. El procedimiento incluye la aplicación de una mezcla de partida que comprende paclitaxel en un contenedor que comprende un compuesto a base de poliamida y después la aplicación de una solución que comprende una o más diaquilcetonas junto con un solvente menos polar en el contenedor. La solución se añade para producirlo y los componentes de la mezcla para eluir del contenedor. Después, se recogen una o más fracciones de la solución de elución que contienen el paclitaxel.

25 El procedimiento se puede utilizar ventajosamente para la purificación a gran escala del paclitaxel. El material de partida del paclitaxel puede ser de una fuente que contiene paclitaxel y algún componente no deseado. Por ejemplo, la mezcla de partida puede ser un extracto crudo o purificado obtenido a partir de fuentes vegetales, o mediante la extracción de cultivos celulares o cepas de bacterias. La mezcla de partida puede ser una mezcla de paclitaxel, cefalomanina y otros taxanos, pero no se limitan a esto.

30 Las formas de realización de la presente invención incluyen la aplicación de aproximadamente una parte en peso de la mezcla de partida a un contenedor, por ejemplo, una columna, rellena con más de aproximadamente 20 partes en peso de un compuesto a base de poliamida, por ejemplo, policaprolactama, poliundecanolactama, polilaurillactama o poli(hexametileno adipamida co-caprolactama); la aplicación de una solución que comprende acetona como una o más dialquilcetonas y bien tolueno o hexano como el solvente menos polar; y el aumento de la concentración de diaquilcetona en relación con el solvente menos polar cuando se aplica la solución al contenedor. Después se puede aislar el paclitaxel puro o el paclitaxel concentrado a partir de las fracciones adecuadas que contienen las concentraciones más elevadas de paclitaxel mediante evaporación y cristalización.

40 Las ventajas adicionales de la presente invención se pondrán más claramente de manifiesto para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada, en la que sólo se muestra y se describe la forma de realización preferida, simplemente a título ilustrativo de la mejor forma contemplada de llevar a cabo la invención. Como se pondrá de manifiesto, la invención es capaz de otras formas de realización distintas, y sus varios detalles se pueden modificar con respecto a varios aspectos evidentes, sin alejarse, por ello, de la invención. La presente invención se puede realizar sin algunos o todos estos detalles específicos. En otros casos, los procedimientos operativos bien conocidos no se han descrito en detalle, para no dificultar innecesariamente la presente invención. En consecuencia, las figuras y la descripción deben contemplarse como ilustrativas en su naturaleza, y no de forma restrictiva.

### Breve descripción de las figuras

50 Se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que:

55 La Figura 1 ilustra la composición del material de partida utilizado en el Ejemplo 1, determinado mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

60 La Figura 2 ilustra la composición de las fracciones principales del Ejemplo 1, determinadas mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

La Figura 3 ilustra la composición del material de partida utilizado en el Ejemplo 2, determinado mediante el análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

65 La Figura 4 ilustra la composición de las fracciones principales del Ejemplo 2, que se eluyeron a aproximadamente 40°C determinadas mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

## ES 2 315 890 T3

La Figura 5 ilustra la composición de las fracciones principales del Ejemplo 2, que se eluyeron a aproximadamente 70°C determinadas mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

5 La Figura 6 ilustra la composición del material de partida utilizado en el Ejemplo 3, determinado mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

10 La Figura 7 ilustra la composición de las fracciones principales del Ejemplo 3, determinadas mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

15 La Figura 8 ilustra la composición del producto cristalino del Ejemplo 3, determinada mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

20 La Figura 9 ilustra la composición del material de partida utilizado en el Ejemplo 4, determinado mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

La Figura 10 ilustra la composición de las fracciones principales del Ejemplo 4, determinadas mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

25 La Figura 11 ilustra la composición del material de partida utilizado en el Ejemplo 5, determinado mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

30 La Figura 12 ilustra la composición de las fracciones principales del Ejemplo 5, determinadas mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

35 La Figura 13 ilustra la composición del material de partida utilizado en el Ejemplo 6, determinado mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

40 La Figura 14 ilustra la composición de las fracciones principales del Ejemplo 6, determinadas mediante análisis por HPLC, en la que el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos, y el eje de ordenadas representa las unidades de absorbancia.

### **Descripción detallada de la presentación**

La presente invención se desarrolló durante la investigación de los procedimientos para el aislamiento a gran escala del paclitaxel. Después de la experimentación e investigación, se descubrió que el paclitaxel se puede purificar eficazmente mediante cromatografía cuando la fase estacionaria comprende un absorbente basado en poliamida y cuando la fase móvil comprende una mezcla de una o más diaquiltetonas junto a otro cosolvente menos polar. La presente invención permite ventajosamente la separación del paclitaxel a partir de mezclas que contienen impurezas de taxanos, que de otra forma son difíciles de extraer pero que están asociadas normalmente con las mezclas de paclitaxel.

50 Como se utiliza en la presente memoria, las formas en singular “un(a)” y “el/la” específicamente engloban también las formas plurales de los términos a los que se refieren, a no ser que el contexto claramente dicte lo contrario.

55 El término “aproximadamente” se utiliza en la presente memoria para significar, en la zona de, más o menos, o alrededor de. Cuando el término “aproximadamente” se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término “aproximadamente” se utiliza en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido mediante una varianza del 20%.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, tanto en una frase de transición como en el cuerpo de la reivindicación, los términos “comprende(n)” y “que comprende(n)” se han de interpretar con un significado abierto-cerrado. Esto es, los términos se han de interpretar como sinónimos de las frases “presenta por lo menos” o “incluye por lo menos”. Cuando se utiliza en el contexto de un procedimiento, el término “que comprende(n)” significa que el procedimiento incluye por lo menos las etapas citadas, pero que puede incluir unas etapas adicionales. Cuando se utiliza en el contexto de un compuesto o una composición, el término “que comprende(n)” significa que el compuesto o la composición incluye por lo menos las características o componentes citados, pero que también puede incluir unas características o componentes adicionales.

## ES 2 315 890 T3

Como se utiliza en la presente memoria, la enumeración de un intervalo numérico para una variable pretende expresar que la invención se puede realizar con la variable igual a cualquiera de los valores dentro del intervalo. Así, para una variable que es inherentemente discreta, la variable puede ser igual a cualquier valor entero del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. Similarmente, para una variable que es inherentemente continua, la variable puede ser igual a cualquier valor real del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. A modo de ejemplo, una variable que se describe presentando unos valores entre 0 y 2, puede ser 0, 1 ó 2 para variables que son inherentemente discretas, y puede ser 0,0, 0,1, 0,01, 0,0001, o cualquier otro valor real para variables que son inherentemente continuas.

Como se utiliza en la presente memoria, a no ser que específicamente se indique lo contrario, la palabra “o” se utiliza en el sentido de “inclusión” de “y/o” y no en el sentido de “exclusión” de “uno u otro”.

A continuación, se hace referencia en detalle a las formas específicas de realización de la invención. Aunque la invención se describirá junto con estas formas de realización específicas, se debe entender que no se pretende limitar la invención a dichas formas específicas de realización. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión rigurosa de la presente invención. La presente invención se puede realizar sin algunos o sin ninguno de estos detalles específicos. En otras ocasiones, los procedimientos operativos bien conocidos no se han descrito en detalle para no oscurecer innecesariamente la presente invención.

Se puede utilizar cualquiera de los materiales y/o los procedimientos adecuados conocidos por los expertos en la técnica para realizar la presente invención. Sin embargo, se describen los materiales y los métodos preferidos. A no ser que se indique lo contrario, los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en la siguiente descripción y ejemplos se pueden obtener comercialmente.

La mezcla de partida de paclitaxel se puede formar a partir de cualquier fuente que contenga paclitaxel y algún componente no deseado. En la realización de la presente invención, se puede utilizar cualquier mezcla de partida de paclitaxel. Por ejemplo, la mezcla de partida puede ser una mezcla de paclitaxel, cefalomanina y otros taxanos, pero sin limitarse a estos. La mezcla de partida también puede ser un extracto crudo o parcialmente purificado de paclitaxel, que se puede obtener a partir de fuentes habituales como mediante la extracción de la corteza fresca o seca, de raíces y/o ramas de toda la planta de una planta que contiene paclitaxel, por ejemplo, una plana *Taxus*. También se contempla otra fuente de paclitaxel para su utilización en la realización de la presente invención, incluyendo un extracto crudo o purificado obtenido a partir de cultivos celulares de una planta *Taxus* cultivada, un caldo de fermentación preparado mediante el cultivo de un hongo productor de taxano; una fermentación de un caldo preparado mediante el cultivo de cepas de bacterias específicas modificadas genéticamente para la producción de paclitaxel.

Las mezclas de paclitaxel utilizadas en la invención pueden tener orígenes distintos y pueden contener una amplia gama de concentraciones de paclitaxel. Las mezclas bien definidas que presentan un contenido elevado de paclitaxel y otros taxanos (cefalomanina, dihidrocefalomanina, taxol C, 7-*epi*-paclitaxel, etc.), se describen normalmente como paclitaxel cristalino crudo o paclitaxel cristalino concentrado, se puede purificar ventajosamente esencialmente mediante un procedimiento de cromatografía de fase única que utiliza un adsorbente a base de poliamida. El material de partida puede ser cualquier concentrado de paclitaxel preparado mediante procedimientos conocidos a partir de biomásas que contienen paclitaxel. Cuando se utiliza un material de partida complejo, el procedimiento de purificación se puede complicar debido a la presencia de impurezas no taxanos. El inicio con una mezcla de paclitaxel compleja puede dar como resultado el aislamiento del paclitaxel con una pureza que es inferior a la deseada. Por consiguiente, la presente invención contempla más de una etapa de purificación para purificar el paclitaxel así como una etapa de cromatografía o una etapa de cristalización repetida.

En un aspecto de la presente invención, el paclitaxel se separa de los componentes no deseados mediante cromatografía de fase normal. En la cromatografía de fase normal, se aplica a una columna o un contenedor que soporta un adsorbente una mezcla que se va a purificar. A continuación, se aplica un solvente o una mezcla de solventes, es decir, una fase móvil, a la columna para conseguir que los constituyentes de la mezcla pasen a través y se eluyan de la columna. La fase móvil se puede colocar por gravedad o aplicar mediante la utilización de unas bombas mecánicas y/o válvulas para mantener un control más exacto del procedimiento, como se sabe en la técnica de la cromatografía. Bajo condiciones adecuadas, los constituyentes de la mezcla se parten y se eluyen a partir del final de la columna a distintos intervalos de tiempo.

Al llevar a cabo las formas de realización de la presente invención, se aplica una mezcla de paclitaxel a un contenedor, por ejemplo, una columna, que comprende un compuesto a base de poliamida para iniciar la purificación de la mezcla. Aunque se cree que el compuesto a base de poliamida utilizado en la presente invención facilita la separación de varios constituyentes debido a los principios de adsorción, no se limitan a ellos o necesariamente deben actuar en concordancia con los mismos. Los principios por los que se separa el paclitaxel a partir de una mezcla según la presente invención no están limitados por ninguna teoría.

Se cree que la utilización de un adsorbente basado en poliamida como fase estacionaria en una cromatografía de fase normal no es habitual. Sin embargo, se cree que las poliamidas presentan una buena estabilidad química y física en una amplia gama de solventes orgánicos, que facilitan su utilización en la separación de los componentes de la mezcla. Según las formas de realización de la presente invención, el procedimiento de cromatografía se basa en una poliamida como fase estacionaria. Aunque existen muchas variaciones potenciales en la composición química de una

## ES 2 315 890 T3

estructura de poliamida, la unidad estructural central -la unión amida (-CO-NH-)- está presente en todos los casos. Se cree que el orden y el número de unidades de metileno entre dos uniones amidas son responsables de la eficacia de la separación de un polímero de poliamida particular.

5 En base a los experimentos, se determinó que las polilactamas, y especialmente la policaprolactama, presentan las mejores propiedades de separación bajo las condiciones utilizadas. Estos materiales muestran un elevado grado de estabilidad después de repetidas operaciones de cromatografía sin un cambio apreciable en su eficacia de separación. La estabilidad y la eficacia de separación no cambiaron incluso cuando se utilizó la etapa de elución del gradiente, por ejemplo, cuando se aumenta la concentración de diaquilcetona en relación con el solvente menos polar durante la adición y elución de la solución y a partir de la columna. Las propiedades de una fase estacionaria de poliamida contrastan con las fases estacionarias orgánicas, como sílice. Por ejemplo, el cambio de una fase móvil polar a una fase móvil no polar se puede realizar muy rápidamente sin la necesidad de una gran cantidad de una fase móvil no polar para la eliminación del solvente polar a partir de los centros activos y sin secar la fase estacionaria. La utilización de una poliamida en la cromatografía de fase normal conduce a una capacidad de hinchazón más baja y constante en comparación con su utilización en cromatografía de fase inversa, con una fase móvil que contiene agua.

Las poliamidas se fabrican a escala industrial en una amplia gama de tamaños. El tamaño de partícula más adecuado para la separación a escala industrial es de aproximadamente 0,05 a 0,16 mm, lo que permite un rendimiento elevado de la fase móvil a un goteo de baja presión. La buena separación del paclitaxel se consiguió incluso cuando sólo se utilizaron aproximadamente 20 partes en peso de poliamida por aproximadamente una parte del material de partida. No obstante, la cantidad de la fase estacionaria depende de la composición del material de partida y de la pureza deseada del producto final de paclitaxel. Las poliamidas adecuadas que se pueden utilizar en la realización de la presente invención incluyen policaprolactama, poliundecanolactama, polilaurilactama, poli(hexametileno adipamida co-caprolactama), etc.

Otra ventaja de la separación de materiales que contienen paclitaxel en fases estacionarias de poliamida es la separación selectiva mejorada observada con el aumento de la temperatura. Se ha determinado que la utilización de temperaturas elevadas durante el procedimiento conduce a una mejora en la separación entre taxanos particulares. Se ha descubierto que mediante el mantenimiento de la fase estacionaria o móvil a una temperatura superior a la temperatura ambiente, por ejemplo, a aproximadamente 40-70°C, se mejora la separación del paclitaxel de su cefalomanina análoga, que presenta un comportamiento de separación muy similar. Además, las temperaturas elevadas disminuyen la viscosidad de la fase móvil y, consecuentemente, deberían disminuir los costes de producción. La utilización de cromatografía a temperaturas elevadas no es aplicable fácilmente a otros procedimientos de separación, especialmente en los que se utiliza la cromatografía de fase inversa debido a la epimerización del paclitaxel en los solventes que contienen agua. Por el contrario, la epimerización de paclitaxel en una solución que sustancialmente excluye agua o un alcohol es insignificante y por consiguiente no limita el procedimiento a temperaturas más bajas.

La selección de los solventes adecuados para la fase móvil influye en la eficacia de la separación. Se encontró que la mejor separación de paclitaxel a partir de las impurezas presentes en un material que contiene paclitaxel en crudo se consiguió con un procedimiento de elución del gradiente. En una forma de realización de la presente invención, se aplica una mezcla de paclitaxel a un compuesto de poliamida seguido por una primera fase móvil, que contiene una concentración baja de diaquilcetona en el solvente menos polar, por ejemplo, en el que la solución comprende la diaquilcetona a una proporción de solvente menos polar de aproximadamente 5% (V/V) a aproximadamente 15% (V/V). Después de que se haya aplicado una cantidad suficiente de la primera fase móvil al compuesto de poliamida en condiciones isocráticas, es decir, sin cambio de la composición del solvente, se puede aplicar una segunda fase móvil bajo una condición de gradiente, es decir, en la que la concentración de diaquilcetona aumenta de una concentración baja a una concentración alta.

Se cree que en condiciones isocráticas, todas las sustancias lipofílicas se eluyen a partir de la columna con la primera fase móvil y que cuando la concentración de diaquilcetona en la fase móvil aumenta, se cree que todas las sustancias restantes se eluyen. Este tipo de perfil de elución puede separar eficazmente no sólo las sustancias que son taxanos sino que también proporciona una buena separación para todas las sustancias que poseen el esqueleto del taxano. Al realizar ciertas formas de realización de la presente invención, se ha observado que el paclitaxel se eluye como la última sustancia de todos los taxanos comunes. Bajo estas circunstancias, se cree que tiene lugar el efecto de desplazamiento del paclitaxel y se ha observado que la zona de elución del paclitaxel es brusca sin solaparse con ninguna sustancia de elución previa. Consecuentemente, la elución del paclitaxel como el último taxano puede excluir efectos "acompañados", que han sido un problema en el pasado.

En base a experimentos de laboratorio, se demostró que se puede separar eficazmente el paclitaxel a partir de otras sustancias mediante cromatografía utilizando una base estacionaria a base en poliamida y utilizando mezclas de diaquilcetona y un cosolvente menos polar como fase móvil. Las diaquilcetona adecuadas que se pueden utilizar en la realización de la presente invención incluyen acetona, metil isobutil cetona, 2-butanona, metiletilcetona, etc. La acetona y la metilisobutilcetona son los solventes más preferidos de entre el grupo de diaquilcetona. No son tóxicas y son baratas. Sin embargo, tienden a ser demasiado polares para utilizarse solas como un componente separado de la fase móvil. Por consiguiente la polaridad de la fase móvil disminuye mediante la adición de uno o más cosolventes menos polares como el hidrocarburo alifático, un hidrocarburo aromático, o un éter dialquilo.

## ES 2 315 890 T3

En una forma de realización de la presente invención, los puntos de ebullición de los solventes utilizados como fase móvil deberían ser inferiores a aproximadamente 130°C. Esto se debe a que el producto preferiblemente se recupera a partir de la fracciones cromatográficas mediante evaporación. Si los puntos de ebullición de los solventes son demasiado bajos, sin embargo, la evaporación de los solventes eleva las preocupaciones medioambientales. Por lo tanto, los solventes menos polares preferidos utilizados en la realización de las formas de realización de la presente invención incluyen (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>) hidrocarburos alifáticos, como hexano o heptano; (C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>) hidrocarburos aromáticos, como tolueno; (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) éteres dialquilos, como éter dibutilo; éter disobutilo o éter metil pert-butil; o una mezcla de estos.

Se pueden crear muchas combinaciones de soluciones a partir de solventes adecuados. Para mejorar la eficacia del procedimiento, los solventes individuales se pueden recuperar después del procedimiento de separación, por ejemplo, mediante destilación. Es preferible utilizar una combinación de solventes que presentan una amplia diferencia suficiente entre sus puntos de ebullición para facilitar su separación mediante destilación. En base a su punto de ebullición, el tolueno es el solvente preferido de entre el grupo de los solventes menos polares.

Otra consideración en relación a la elección de los solventes para su utilización como fase móvil depende del material que se va a separar. Normalmente, las mezclas complejas con un bajo contenido de paclitaxel también contienen algunas impurezas muy polares para extraerse. Estas impurezas, en última instancia, se han de lavar de la columna. Parece que estas mezclas de paclitaxel se separan más fácilmente mediante la combinación de acetona y tolueno como fase móvil.

Las fracciones elucionadas que contienen una alta concentración de paclitaxel se pueden entonces aislar más mediante evaporación al vacío. La extensión del secado dictará si el producto da como resultado un residuo viscoso o una masa sólida, tanto uno como otro se pueden cristalizar a partir de solventes adecuados para obtener paclitaxel en forma cristalina. La utilización de un sistema de solventes completamente orgánico junto a una evaporación rápida de estos solventes reduce ventajosamente o elimina completamente la isomerización no deseada del paclitaxel a 7-*epi*-paclitaxel. Esta es otra ventaja sobre los procedimientos de aislamiento conocidos basados en cromatografía de fase inversa.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se destinan a ilustrar más ciertas formas de realización preferidas de la invención y no son limitantes en su naturaleza. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de establecer, utilizando tan solo una experimentación rutinaria, varios equivalentes a las sustancias específicas y a los procedimientos descritos en la presente memoria.

#### Ejemplo 1

Se disuelven aproximadamente 0,71 g de una mezcla cruda que contiene aproximadamente 8,38% de paclitaxel y aproximadamente 2,23% de cefalomanina (como se muestra en la Figura 1) en aproximadamente 10 ml de una mezcla que contiene acetona y tolueno en una proporción de 10:90 (V/V). La solución se carga en una columna rellena con aproximadamente 45 g de adsorbente a base de poliamida (Polyamide Roth, tamaño de la partícula de aproximadamente 50-160  $\mu$ m). Después, la columna se eluye con aproximadamente 600 ml de una solución de acetona y tolueno 10:90 (V/V). Después se añaden aproximadamente 1200 ml de una solución de acetona y tolueno a la columna mientras se aumenta linealmente el gradiente de la acetona desde una proporción de partida de 10:90 (V/V) hasta una proporción final de 100:0 (V/V). El flujo de la fase móvil se mantuvo a aproximadamente 50 ml/min durante todo el proceso de elución. Se tomaron las fracciones de la solución de elución aproximadamente cada 50 ml desde el tiempo de inyección hasta el tiempo final de la elución del gradiente y se analizaron mediante HPLC. Las fracciones de la solución de elución que contienen paclitaxel se evaporan hasta su secado consiguiendo aproximadamente 0,14 g de producto que contiene aproximadamente 37,54% de paclitaxel hasta aproximadamente 6,80% de cefalomanina (en la Figura 2 se muestra el análisis mediante HPLC).

#### Ejemplo 2

Se disuelven aproximadamente 0,75 g de una mezcla cruda que contiene aproximadamente 1,99% de paclitaxel y aproximadamente 0,89% de cefalomanina (como se muestra en la Figura 3) en 15 ml de una mezcla de acetona y tolueno 10:90 (V/V). La solución se carga en una columna rellena con aproximadamente 45 g de poliamida (Polyamide Roth, tamaño de la partícula de aproximadamente 50-160  $\mu$ m). Después, la columna se eluye con aproximadamente 600 ml de una solución de acetona y tolueno 10:90 (V/V) mientras se mantiene la temperatura a aproximadamente 40°C. Después se añaden aproximadamente 1200 ml de una solución de acetona y tolueno a la columna mientras se aumenta linealmente el gradiente de la acetona desde una proporción de partida de 10:90 (V/V) hasta una proporción final de 100:0 (V/V). Se tomaron fracciones de la solución de elución cada 50 ml. Las fracciones se analizaron mediante HPLC. Se realizó el mismo experimento con un material de partida idéntico y en las mismas condiciones excepto que la columna se mantuvo a aproximadamente 50°C, 60°C o 70°C. Se evaluaron las fracciones correspondientes que contienen paclitaxel de las cuatro separaciones para encontrar el contenido tanto de paclitaxel como de cefalomanina. Se encontró que el aumento de temperatura conduce a una mejora en la separación entre estas dos sustancias desde una proporción de aproximadamente 3:89:1 a 40°C (el análisis mediante HPLC se muestra en la Figura 4) hasta una proporción de aproximadamente 5:31:1 a 70°C (en la Figura 5 se muestra el análisis mediante HPLC).

## ES 2 315 890 T3

### Ejemplo 3

Se disuelven aproximadamente 198,0 g de una mezcla de paclitaxel crudo que contiene aproximadamente 7,3% de paclitaxel y aproximadamente 2,3% de cefalomanina (la proporción inicial de paclitaxel/cefalomanina es de aproximadamente 3:17:1 según un análisis mediante HPLC, como muestra la Figura 6) en 4 l de acetona y tolueno (10:90 V/V). La solución se carga en una columna rellena con aproximadamente 6.830 g de poliamida (Polyamide Roth, tamaño de partícula 50-160  $\mu\text{m}$ ). A continuación, se eluye la columna con 100 l de acetona y tolueno (10:90 (V/V)). Se eluye nuevamente con 200 l de una mezcla de acetona y tolueno mientras se aumenta linealmente el gradiente de la acetona desde una proporción de partida de 10:90 (V/V) hasta una proporción final de 100:0 (V/V). Se tomaron fracciones de la solución de elución cada 20 l y se analizaron mediante HPLC. Las fracciones de la solución de elución que contienen paclitaxel puro se evaporaron hasta su secado consiguiendo aproximadamente 22,42 g de producto que contiene aproximadamente 60,5% de paclitaxel y aproximadamente 1,3% de cefalomanina (el análisis mediante HPLC se muestra en la Figura 7). La pureza del paclitaxel después de la cristalización a partir de una mezcla de acetona y hexano (50:50 V/V) es aproximadamente un 98,9% (en la Figura 8 se muestra el análisis mediante HPLC).

### Ejemplo 4

Se disuelven aproximadamente 68,3 g de una mezcla de paclitaxel cristalino crudo que contiene aproximadamente 55,0% de paclitaxel y aproximadamente 19,0% de cefalomanina (la proporción inicial de paclitaxel/cefalomanina es de aproximadamente 2,89:1 según un análisis mediante HPLC, como muestra la Figura 6) en 2 l de acetona y tolueno (10:90 V/V). La solución se carga después en una columna rellena con aproximadamente 6.830 g de poliamida (Polyamide Roth, tamaño de partícula 50-160  $\mu\text{m}$ ). Después, se eluye la columna a 50°C con 100 l de acetona y tolueno (10:90 (V/V)) y se eluye nuevamente con 200 l de una mezcla de acetona y tolueno mientras se aumenta linealmente el gradiente de la acetona desde una proporción de partida de 10:90 (V/V) hasta una proporción final de 100:0 (V/V). Se tomaron fracciones de la solución de elución cada 20 l y se analizaron mediante HPLC. Las fracciones de la solución de elución que contienen paclitaxel puro se evaporaron hasta secado consiguiendo aproximadamente 28,61 g de producto que contiene aproximadamente 83,1% de paclitaxel y aproximadamente 1,0% de cefalomanina (el análisis mediante HPLC se muestra en la Figura 10).

### Ejemplo 5

Se disuelven aproximadamente 0,33 g de una mezcla de paclitaxel crudo que contiene aproximadamente 15,28% de paclitaxel y aproximadamente 3,35% de cefalomanina (como muestra la Figura 11) en 8 ml de acetona y hexano 31:69 (V/V). La solución se carga después en una columna rellena con aproximadamente 45 g de poliamida (Polyamide Roth, tamaño de partícula 50-160  $\mu\text{m}$ ). Después, se eluye la columna con 600 ml de acetona y hexano 20:80 (V/V). La columna se eluye nuevamente con 1200 ml de una mezcla de acetona y hexano mientras se aumenta linealmente el gradiente de la acetona desde una proporción de partida de 20:80 (V/V) hasta una proporción final de 100:0 (V/V). Se tomaron fracciones de la solución de elución cada 50 ml y se analizaron mediante HPLC. Las fracciones que contienen paclitaxel puro se evaporaron hasta secado consiguiendo aproximadamente 0,07 g de producto que contiene aproximadamente 29,7% de paclitaxel y aproximadamente 3,5% de cefalomanina (el análisis mediante HPLC se muestra en la Figura 12).

### Ejemplo 6

Se disuelven aproximadamente 0,35 g de paclitaxel concentrado que contiene aproximadamente 65,78% de paclitaxel y aproximadamente 2,08% de Taxol C (como muestra la Figura 13) en 20 ml de acetona y tolueno 15:85 (V/V). La solución se carga después en una columna rellena con aproximadamente 35 g de poliamida (Polyamide Roth, tamaño de partícula 315  $\mu\text{m}$ ). A continuación, se eluye la columna con 750 ml de acetona y tolueno 15:85 (V/V). La columna se eluye nuevamente con 750 ml de una mezcla de acetona y hexano mientras se aumenta linealmente el gradiente de la acetona desde una proporción de partida de 15:85 (V/V) hasta una proporción final de 50:50 (V/V). Se tomaron fracciones de la solución de elución cada 50 ml y se analizaron mediante HPLC. Las fracciones que contienen paclitaxel puro se evaporaron hasta secado consiguiendo aproximadamente 0,25 g de producto que contiene aproximadamente 68,63% de paclitaxel y aproximadamente 0,63% de taxol C (el análisis mediante HPLC se muestra en la Figura 14).

En esta exposición se han descrito sólo las formas de realización preferidas de la invención y algunos ejemplos de su versatilidad. Se entiende que la invención puede utilizar otras combinaciones y entornos y es capaz de sufrir cambios o modificaciones dentro del alcance del concepto inventivo como se expresa en la presente memoria. Por tanto, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de establecer, utilizando uno o más experimentos de rutina, varios equivalentes a las sustancias específicas y los procesos descritos en la presente memoria. Dichos equivalentes se considera que están comprendidos dentro del alcance de la presente invención, y están cubiertos por las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de paclitaxel, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

- 5 a) aplicar una mezcla de partida que comprende paclitaxel en un contenedor que comprende un compuesto a base de poliamida;
- 10 b) aplicar en dicho contenedor una solución de elución que comprende una o más dialquilcetonas mezcladas con un solvente menos polar en el contenedor;
- c) eluir la mezcla de partida; y
- d) recoger una o más fracciones de la solución de elución que contiene el paclitaxel.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla de partida es un extracto crudo o purificado obtenido por extracción de entre el grupo constituido por la planta *Taxus* entera, su corteza fresca o seca, su raíz, sus hojas o ramas.

20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla de partida es un extracto crudo o purificado obtenido por extracción de cultivos celulares obtenidos a partir de una planta *Taxus*.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla de partida es un extracto crudo o purificado obtenido por extracción de un caldo de fermentación preparado por cultivo de un hongo productor de taxanos.

25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla de partida es un extracto crudo o purificado obtenido por extracción de un caldo de fermentación preparado por cultivo de unas cepas bacterianas específicas modificadas genéticamente para la producción de paclitaxel.

30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el material de partida es una mezcla de paclitaxel, cefalomatinas y otros taxanos.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que una o más dialquilcetonas se seleccionan de entre el grupo constituido por acetona, 2-butanona o metilsobutilcetona.

35 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el solvente menos polar se selecciona de entre el grupo constituido por un hidrocarburo alifático (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>), un hidrocarburo aromático (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>), un dialquiléter (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o sus mezclas.

40 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el hidrocarburo alifático (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>) es hexano o heptano.

10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el hidrocarburo aromático (C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>) es tolueno.

45 11. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el dialquiléter (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) se selecciona de entre el grupo constituido por dibutiléter, diisobutil éter y *tert*-butil metil éter.

12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que una parte en peso de la mezcla de partida se aplica a una columna rellena con más de aproximadamente 20 partes en peso del compuesto a base de poliamida.

50 13. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la poliamida se selecciona de entre el grupo constituido por policaprolactama, poliundecanolactama y polilaurilactama.

14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la poliamida es poli(hexametileno adipamida co-caprolactama).

55 15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la solución comprende una o más dialquilcetonas en una proporción respecto al solvente menos polar de aproximadamente 5% (V/V) a aproximadamente 100% (V/V).

60 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la solución comprende acetona como una o más dialquilcetonas y bien tolueno o hexano como el solvente menos polar.

17. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 16, que comprende asimismo el aumento de la concentración de la dialquilcetona en relación con el solvente menos polar cuando se aplica la solución al contenedor.

Fig. 1/14

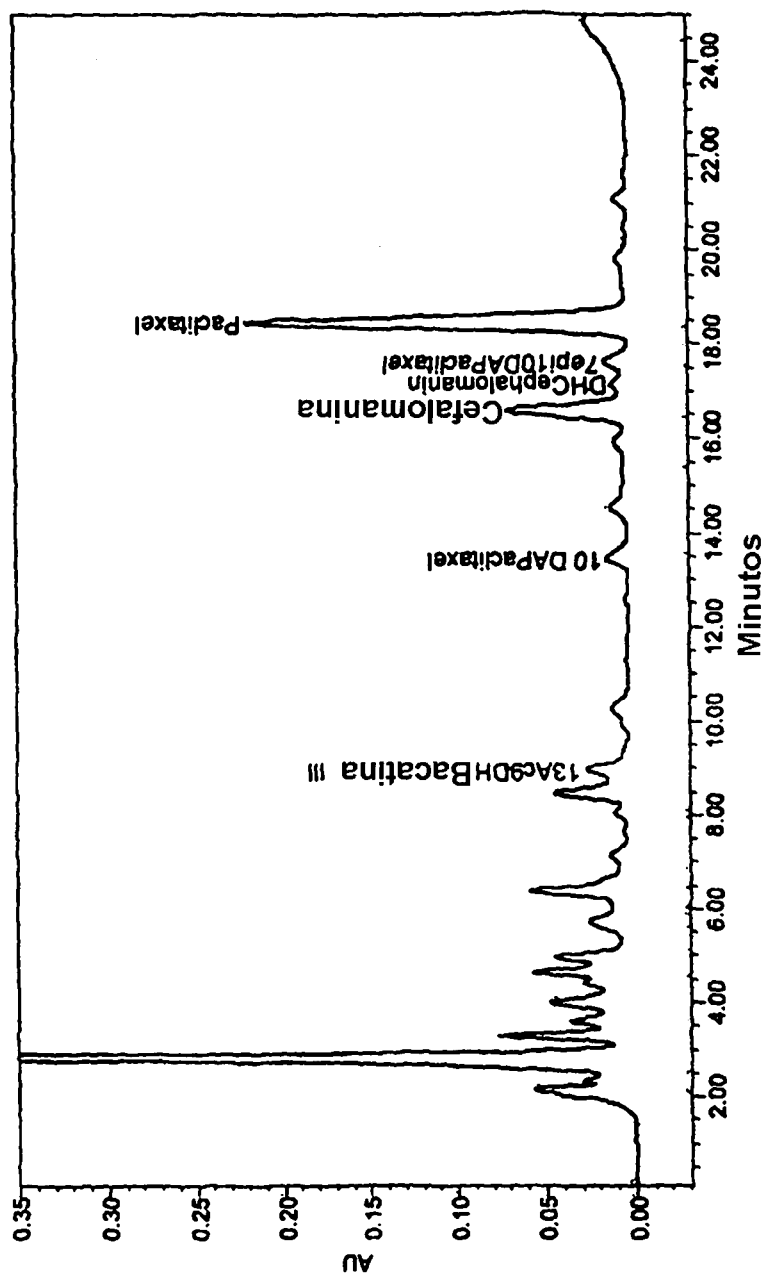


Fig. 2/14

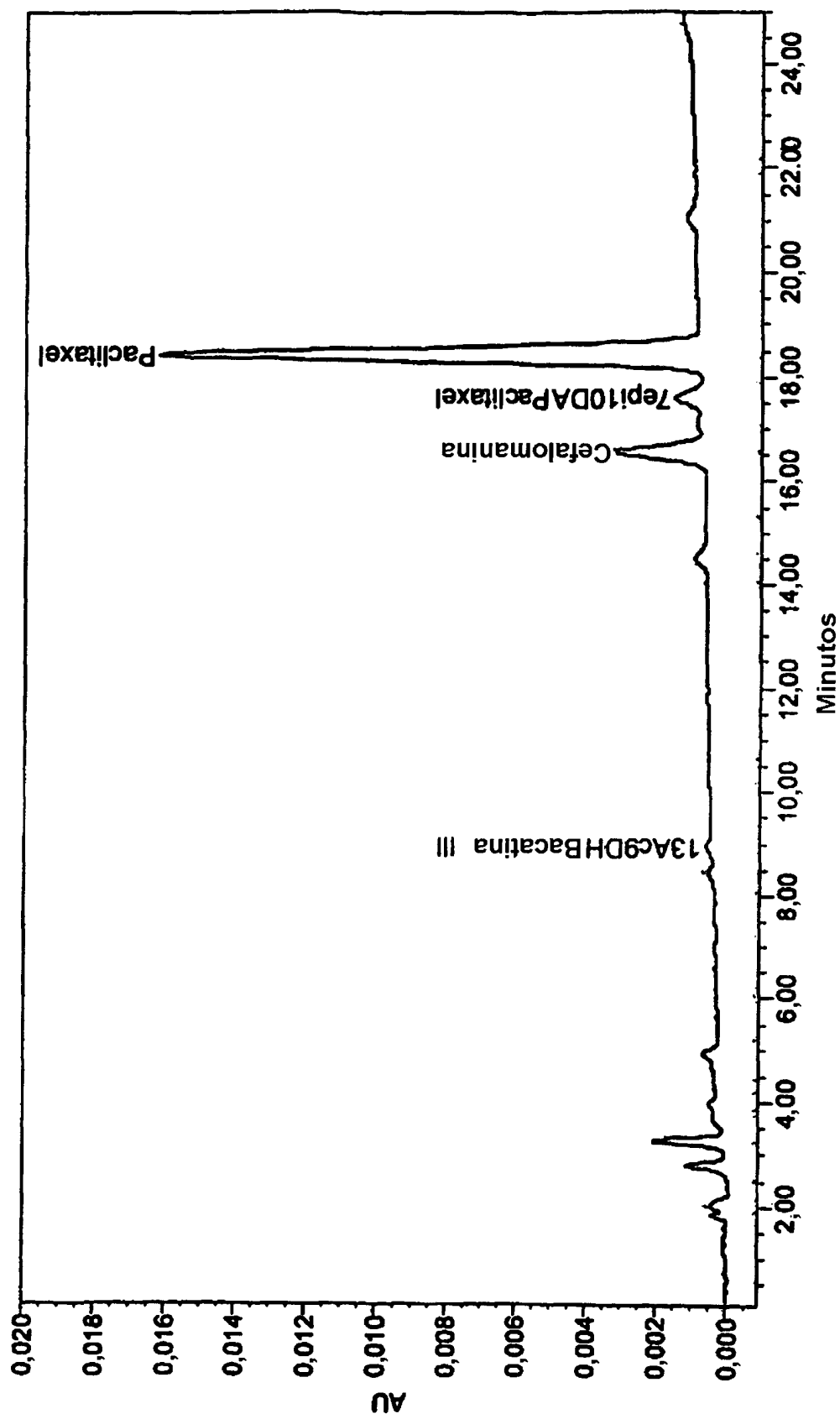


Fig. 3/14

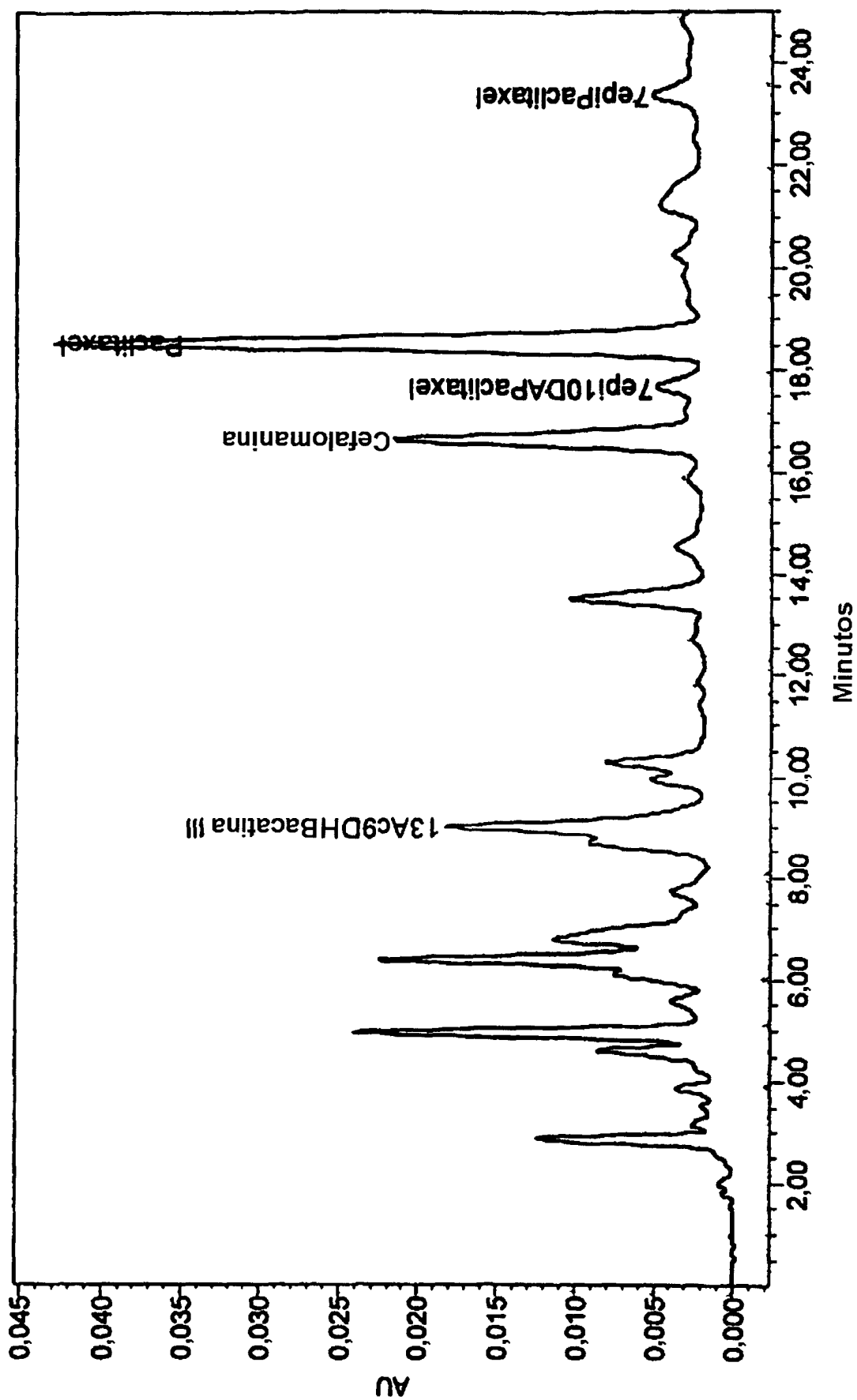
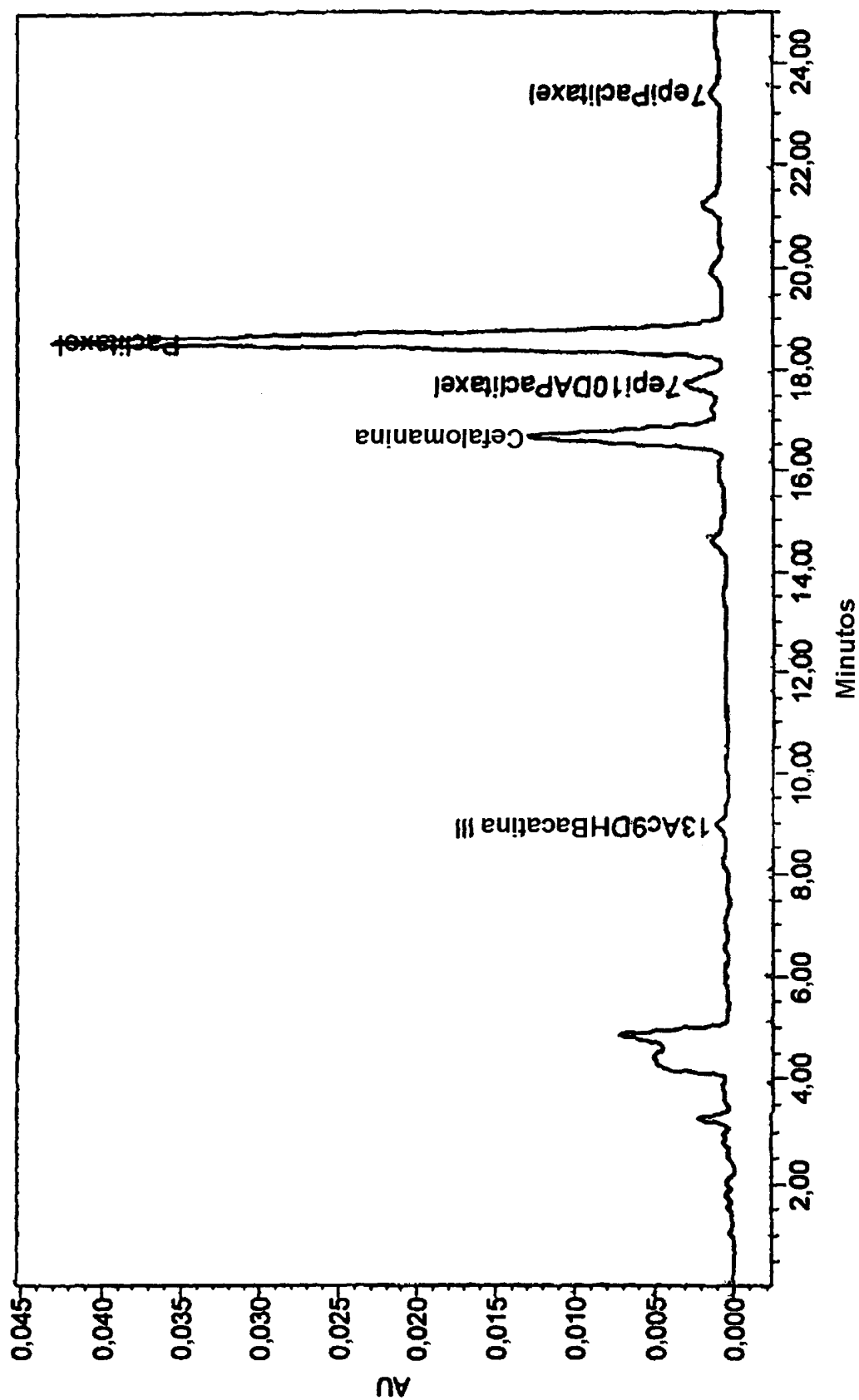


Fig. 4/14



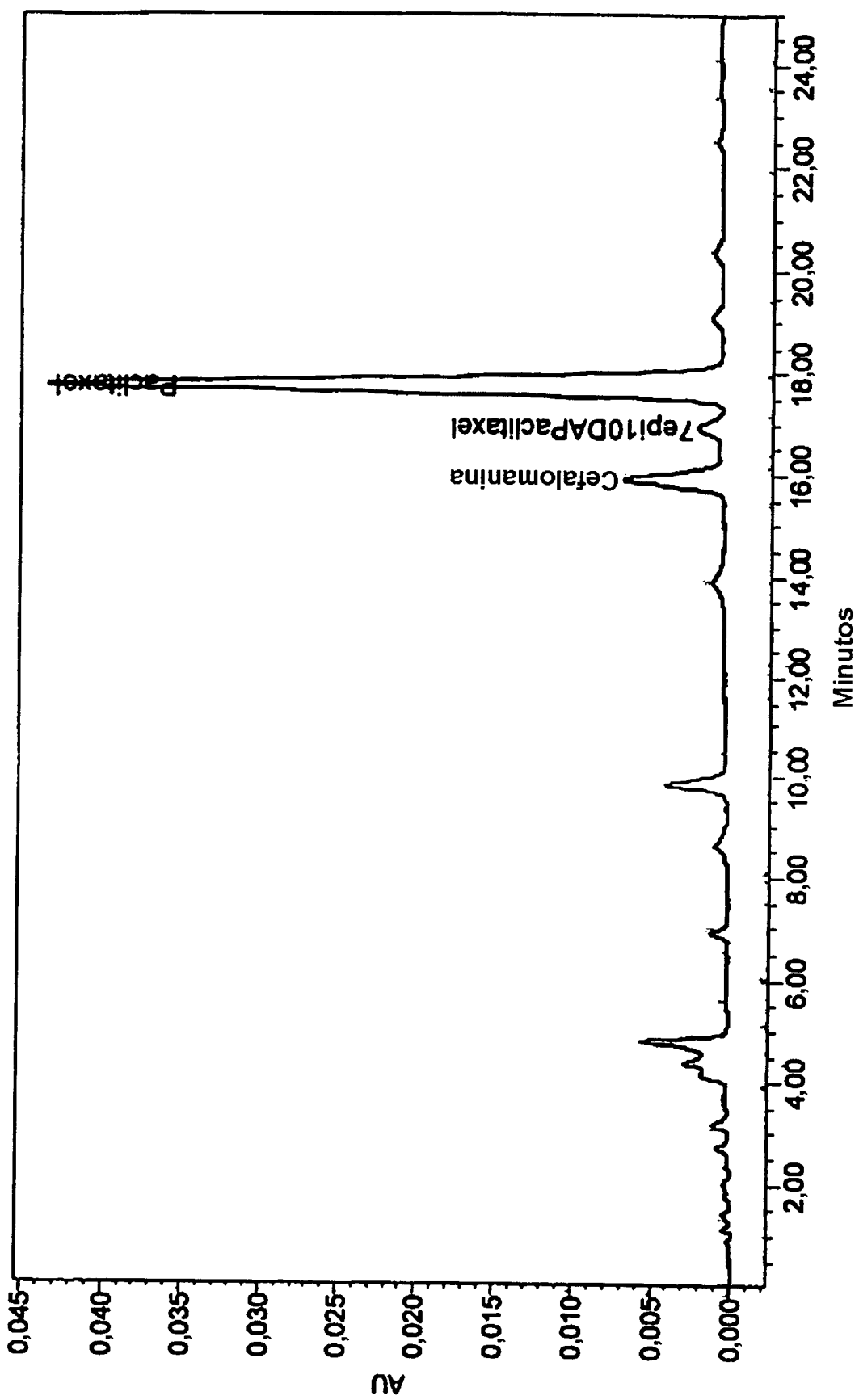


Fig. 5/14

Fig. 6/14

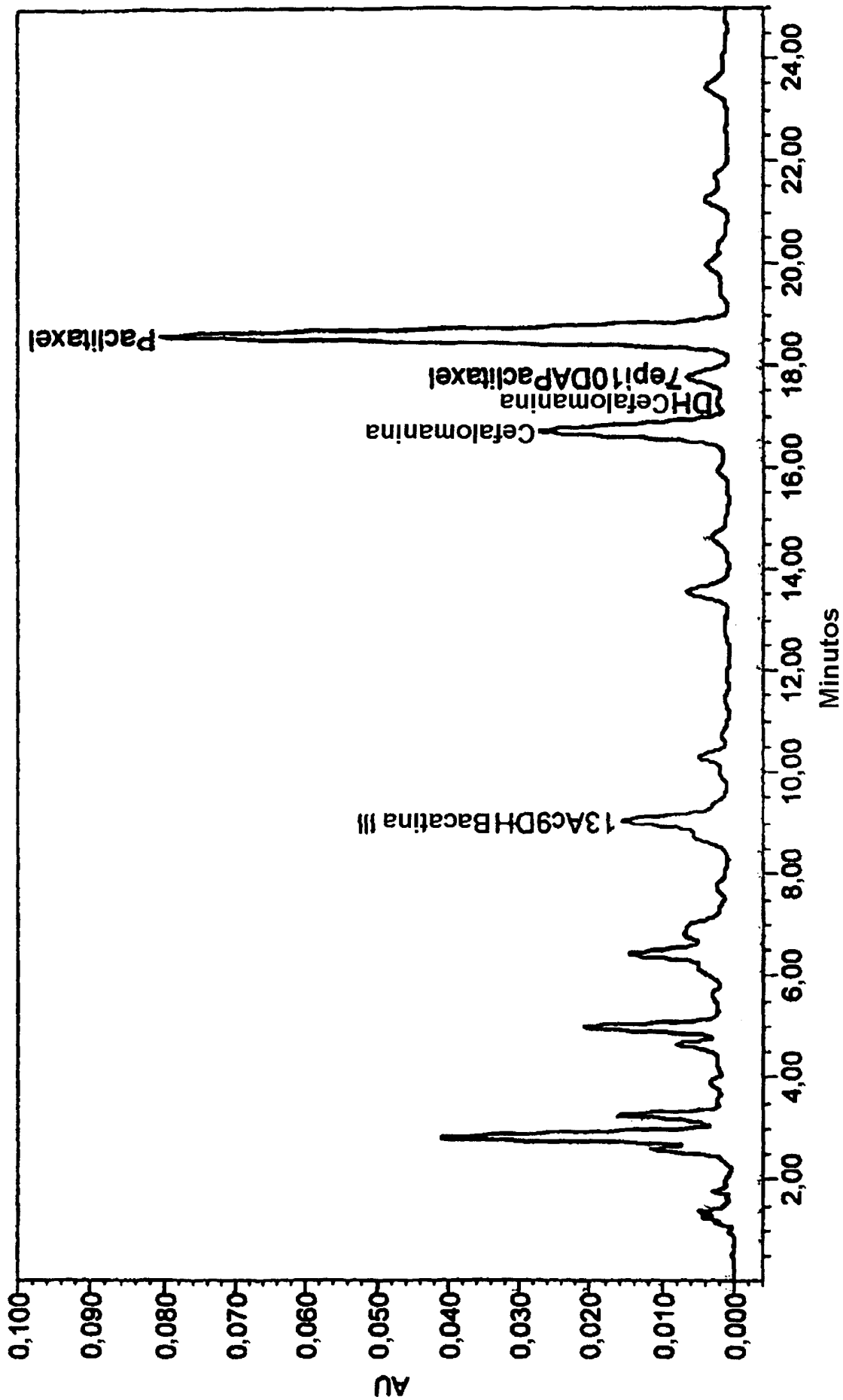
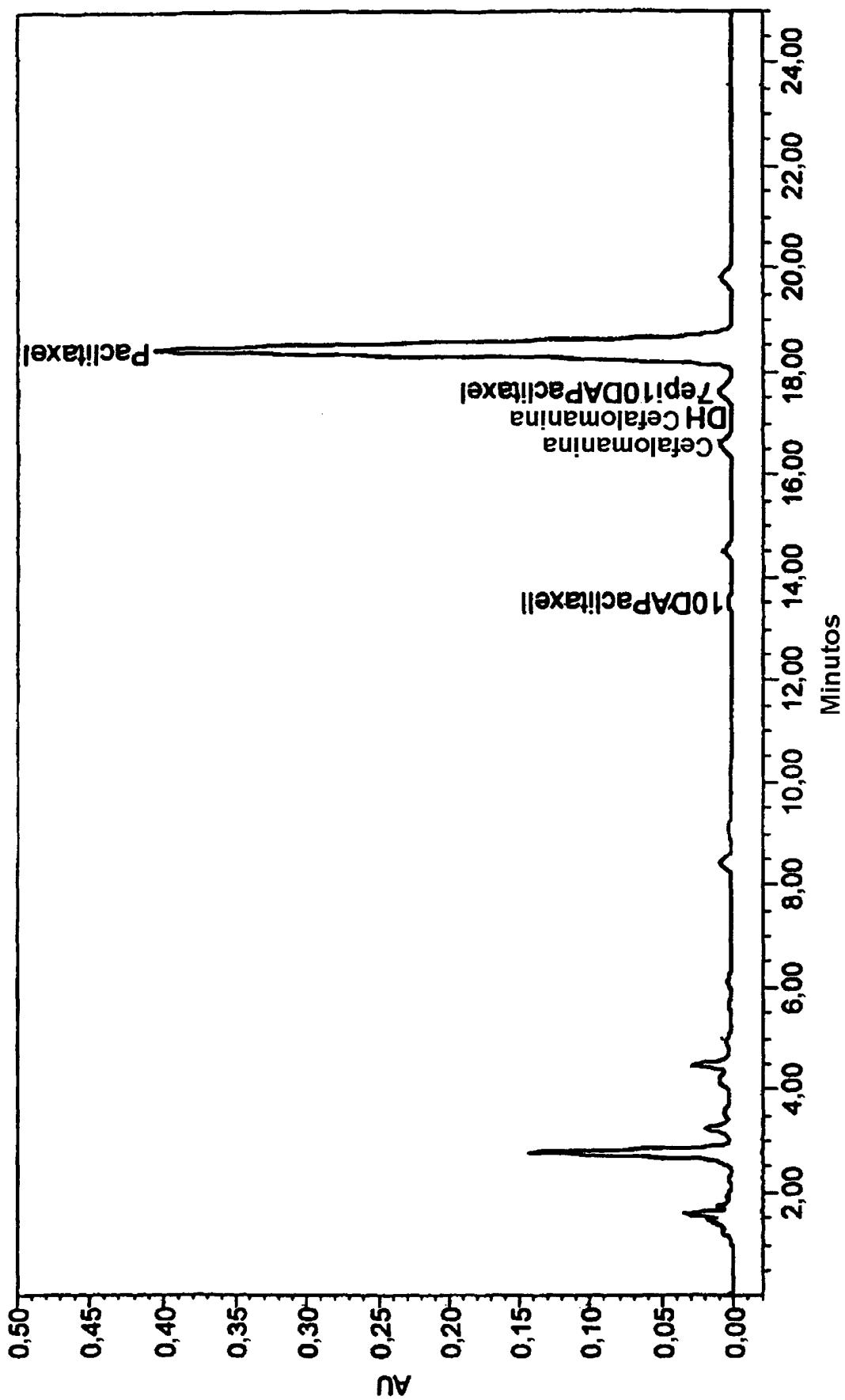


Fig. 7/14



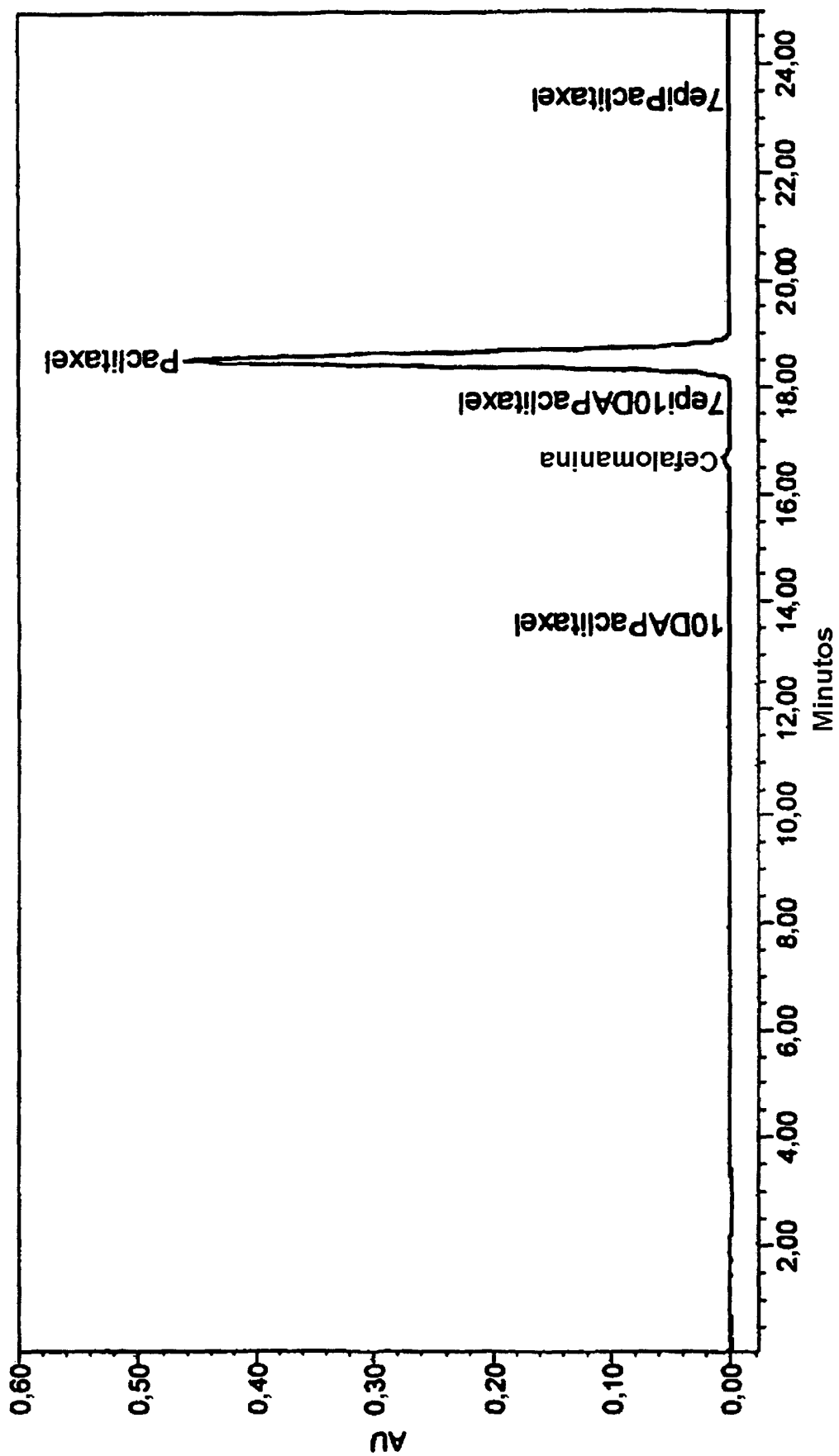


Fig. 8/14

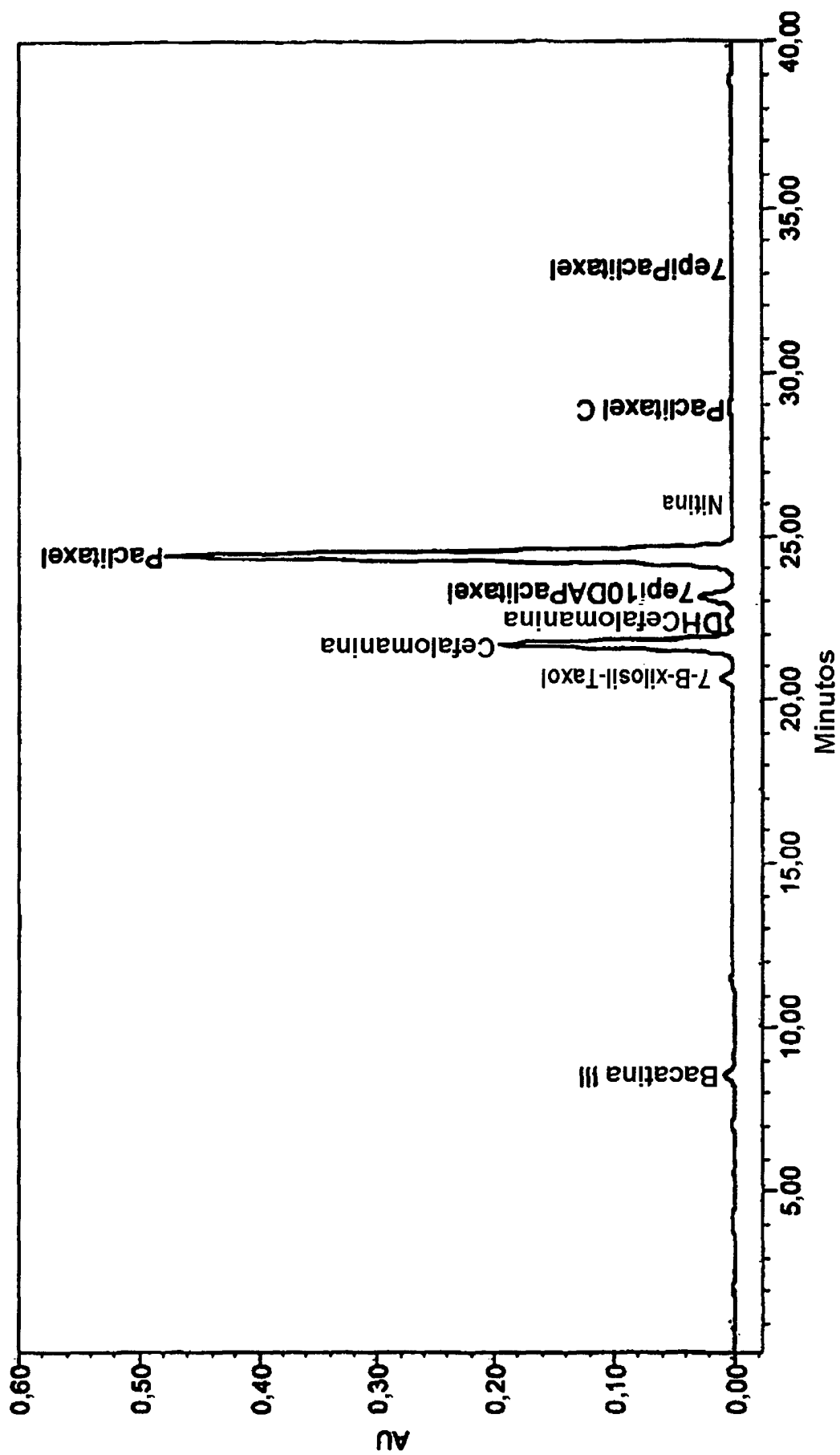


Fig. 9/14

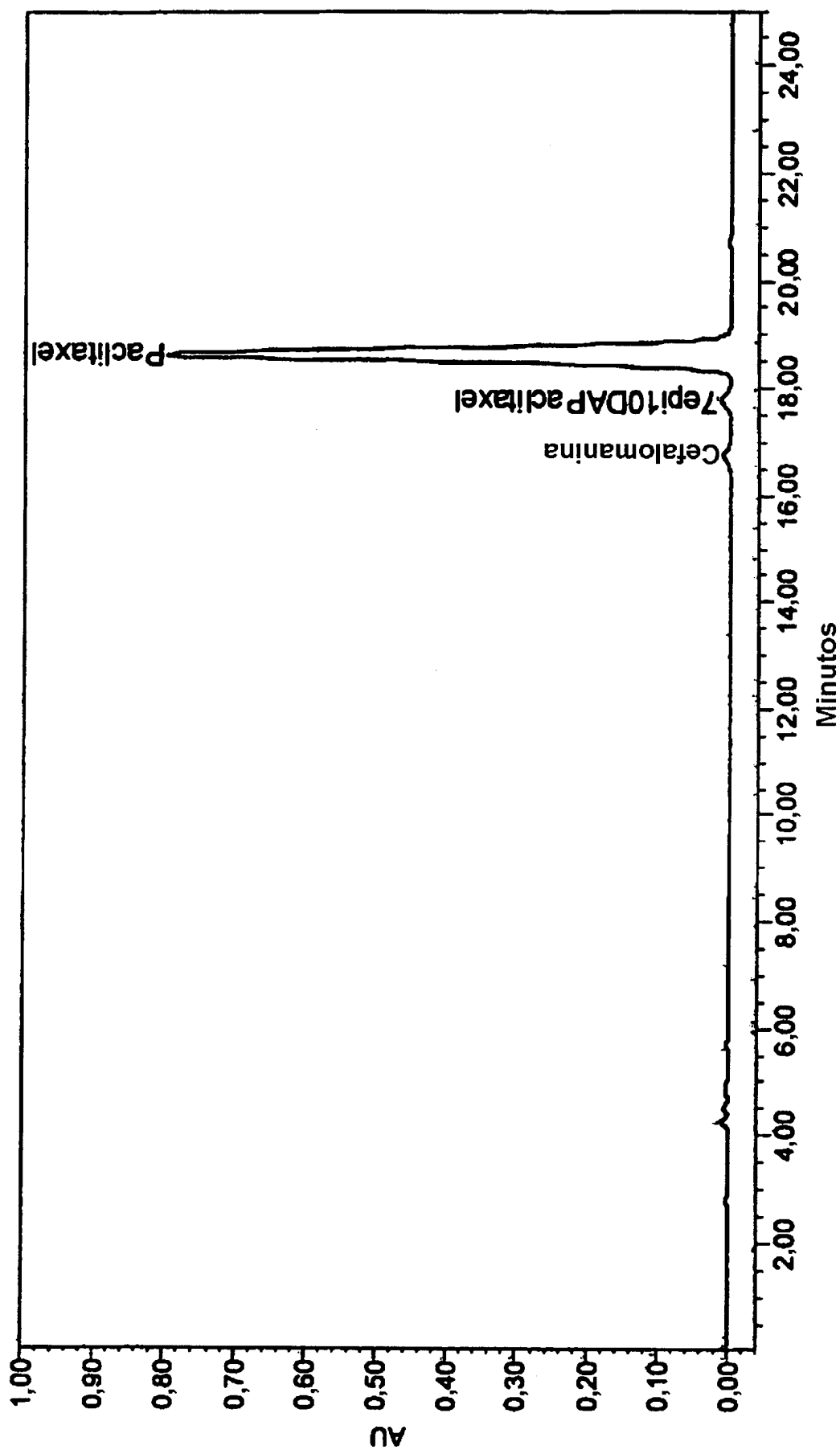


Fig. 10/14

Fig. 11/14

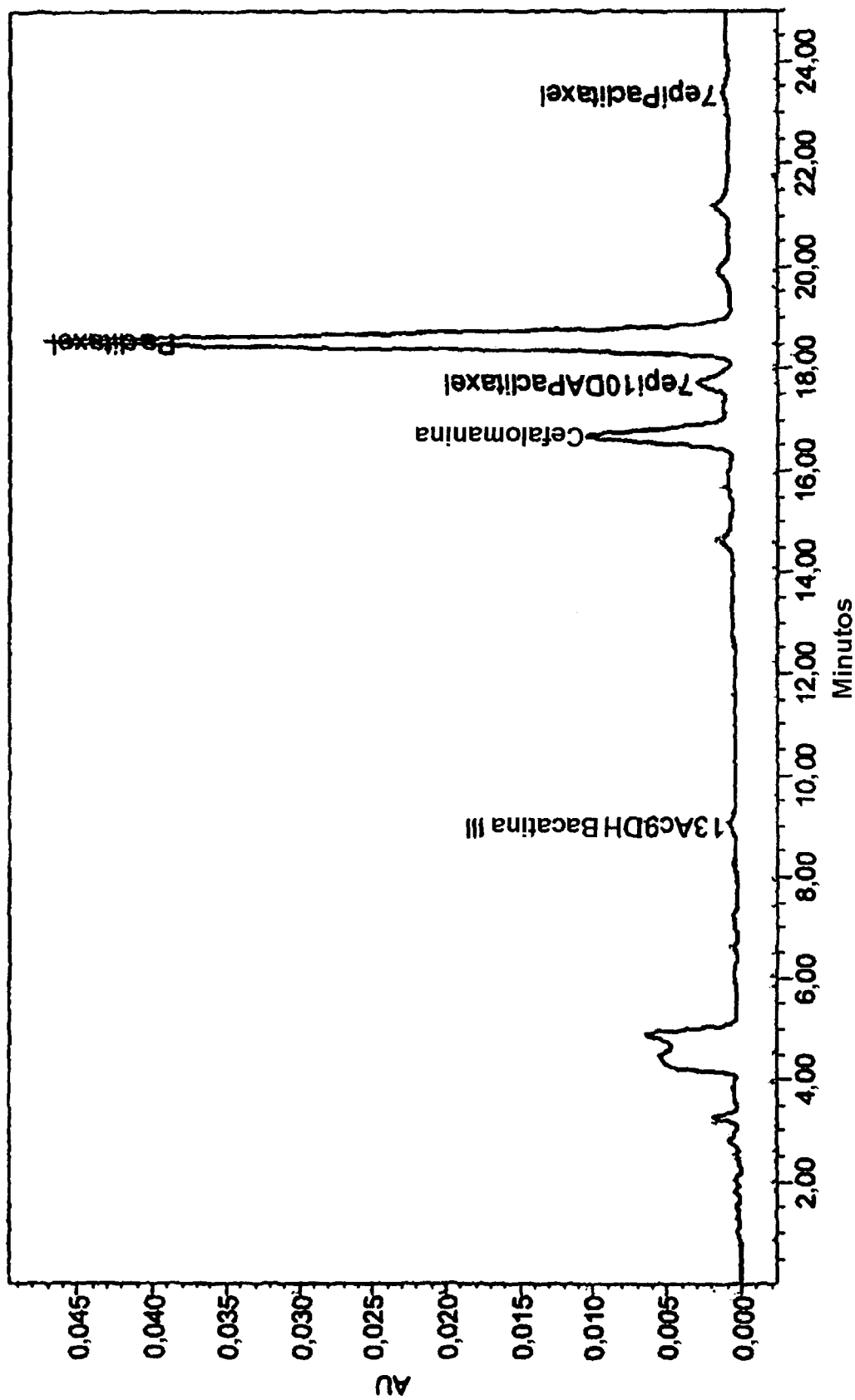


Fig. 12/14

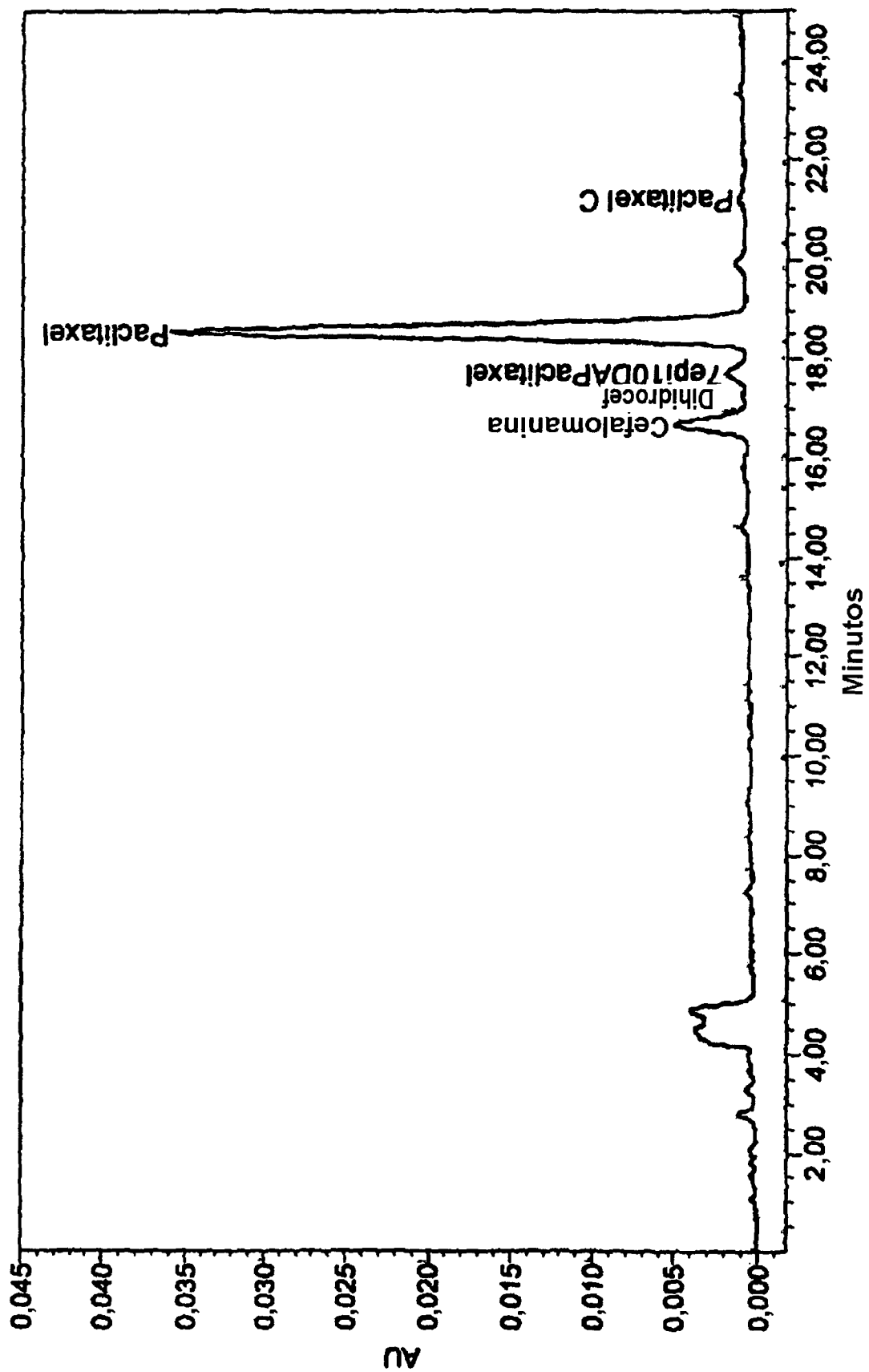
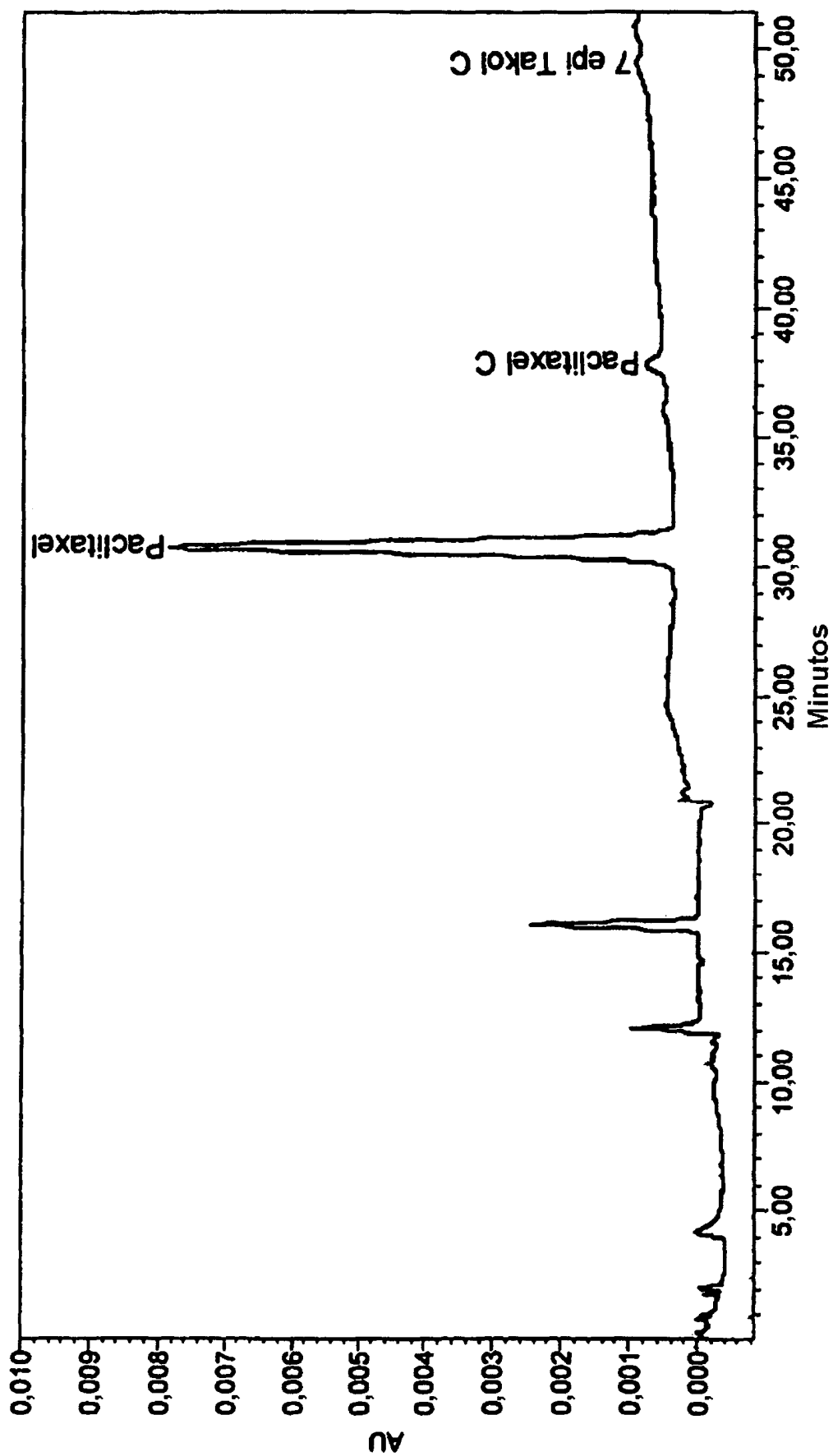


Fig. 13/14



**Fig. 14/14**

