

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.07.01	(73) Titular(es): IVAX PHARMACEUTICALS S.R.O. OSTRAVSKA 29 74770 OPAVA 9	CZ
(30) Prioridade(s): 2004.07.02 US 585401 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2007.03.28	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.10.15 231/2008	MARTIN BUCHTA	CZ
	LADISLAV CVAK	CZ
	ROMAN SOBOTIK	CZ
	PAVEL STVERKA	CZ
	(74) Mandatário:	
	PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA ISOLAMENTO DE PACLITAXEL**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA ISOLAMENTO DE PACLITAXEL"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a purificação por cromatografia de paclitaxel a partir de misturas contendo paclitaxel.

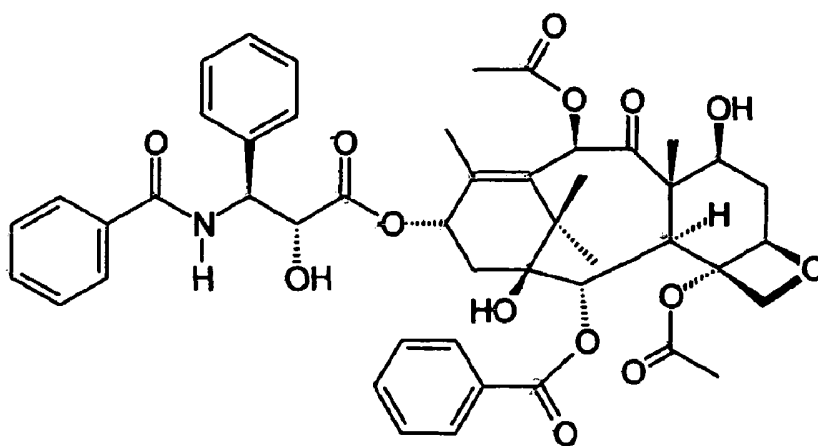
ANTECEDENTES

O paclitaxel, anteriormente conhecido como "taxol", é um importante agente quimioterapêutico útil para o tratamento de tumores humanos do ovário, mama e pulmão. Demonstrou ser prometedora para vários cânceres humanos e as suas utilizações clínicas foram descritas em vários artigos de revisão, tais como 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); e Eisenhauer, E. A., Vermorken, J. B., *Drugs* 55:5 (1998).

O paclitaxel é um composto natural e foi isolado pela primeira vez por Wani *et al.*, a partir da casca do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). *J. Am. Chem. Soc.* 93:2325 (1971) Desde essa altura, os investigadores reconheceram que o paclitaxel existe em todas as outras espécies do género *Taxus*, incluindo o teixo europeu (*Taxus baccata*), teixo dos Himalaias (*Taxus Wallichiana*), teixo chinês (*Taxus celebica*), teixo japonês (*Taxus cuspidata*), teixo canadense (*Taxus canadensis*),

teixo mexicano (*Taxus globosa*), teixo da Florida (*Taxus floridana*) e teixo ornamental (*Taxus media*) e todos os seus híbridos e cultivares.

A fórmula estrutural do paclitaxel foi determinada e está reproduzida a seguir.



O isolamento do paclitaxel de todos os tipos de potenciais fontes vegetais é complexo e difícil, em parte devido à sua concentração muito baixa na biomassa e em parte devido à presença de outros compostos, sobretudo taxanos, que possuem propriedades semelhantes ao paclitaxel. Devido à sua grande procura e pouca disponibilidade, eram muito procuradas potenciais fontes adicionais para a produção industrial de paclitaxel (Cragg, G. M. et al., *J. Nat. Prod.* 56:1657 (1993)). Algumas destas fontes incluem partes renováveis de todos os tipos de plantas do género *Taxus* (folhas, cortes e plantas inteiras cultivadas hidroponicamente), fermentação de culturas de tecidos de *Taxus*, fermentação de fungos parasitas de *Taxus*, etc.

Tipicamente, o paclitaxel é isolado primeiro por extracção de uma biomassa com solventes adequados para se obter extractos que são refinados por processos de extracção líquido-líquido. Após os processos de extracção, o isolamento do paclitaxel normalmente continua por um passo de cromatografia em fase inversa. Numerosos exemplos desta técnica podem ser encontrados na literatura, incluindo: Dauh-Rurng Wu, *et al.*, *J. Chrom. A*, 702:233 (1995); Koppaka V. Rao, *et al.*, *Pharm. Res.* 12:1003 (1995); e Xuefeng Yang *et al.*, *J. Chrom. A*, 813:201 (1998). A cromatografia em fase inversa também está descrita para a purificação final do paclitaxel em várias patentes, tais como: patente U.S. Nº 5279949; patente U.S. Nº 5380916; e patente U.S. Nº 5969165. Também foi desenvolvido um processo contínuo baseado num procedimento de cromatografia em fase inversa em leito móvel simulado. Dauh-Rurng Wu, *et al.*, *J. Chrom. A*, 855:71 (1999). Contudo, uma desvantagem da utilização de cromatografia em fase inversa é a necessidade de solventes contendo água, que podem provocar a isomerização adversa do paclitaxel a 7-*epi*-paclitaxel indesejada.

A utilização de cromatografia em fase normal também é conhecida para o isolamento do paclitaxel. Contudo, este processo utiliza fases estacionárias dispendiosas, tais como as fases de alquilfenilo e pentafluorofenilo. Dauh-Rurng Wu *et al.*, *J. Chrom. A*. 702:233 (1995). Métodos mais recentes para isolamento do paclitaxel são baseados em processos complicados com eluição de gradiente ou em vários passos cromatográficos utilizando diferentes composições da fase móvel ou numa combinação de cromatografia em fase normal e em fase inversa. Ver, e. g., 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); patente U.S. Nº 5478736. Outra abordagem é a utilização de cromatografia em fase normal

utilizando alumina como o adsorvente. Infelizmente, são frequentemente utilizados solventes orgânicos clorados como a fase móvel com alumina. Além disso, neste sistema têm lugar tanto a epimerização como a decomposição química do paclitaxel, dependendo do tempo de eluição. Zhiqiang Z. Zhiguo S., *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23(17):2683 (2000).

Recentemente, foi divulgado um isolamento de paclitaxel por cromatografia em fase normal utilizando uma fase estacionária de sílica e uma fase móvel de um éster de ácido carboxílico na patente U.S. Nº 6333419. O processo aí descrito foi concebido para a separação do paclitaxel de cefalomanina.

Há, contudo, uma necessidade continuada de isolamento em grande escala do paclitaxel de uma variedade de componentes indesejados com operações de purificação simples e eficientes.

SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

Uma vantagem da presente invenção é um método simples, barato e eficiente para o isolamento e produção em grande escala de paclitaxel de pureza elevada.

Estas e outras vantagens são satisfeitas, pelo menos em parte, por um processo de isolamento de paclitaxel a partir de misturas de paclitaxel utilizando cromatografia em fase normal baseada num composto à base de poliamida. O processo inclui a aplicação de uma mistura de partida compreendendo paclitaxel num recipiente compreendendo um composto à base de poliamida e depois aplicação no recipiente de uma solução compreendendo uma ou mais dialquilcetonas conjuntamente com um solvente menos polar. A solução é adicionada para fazer com que ele e os

componentes da mistura eluam do recipiente. São então recolhidas uma ou mais fracções da solução de eluição contendo paclitaxel.

O processo pode, com vantagem, ser utilizado para a purificação em larga escala do paclitaxel. O material de partida paclitaxel pode ser proveniente de qualquer fonte que contenha paclitaxel e algum componente indesejado. Por exemplo, a mistura de partida pode ser um extracto em bruto ou purificado obtido de fontes vegetais ou por extracção de culturas de células ou estirpes de bactérias. A mistura de partida pode ser uma mistura de paclitaxel, cefalomanina e outros taxanos, mas não está limitada a essas.

As formas de realização da presente invenção incluem a aplicação de cerca de uma parte em peso da mistura de partida num recipiente, e. g., uma coluna, cheia com mais de cerca de 20 partes em peso de um composto à base de poliamida, e. g. policaprolactama, poliundecanolactama, polilaurillactama, ou poli(hexametileno adipamida-co-caprolactama); aplicação de uma solução compreendendo acetona como a dialquilcetona e tolueno ou hexano como o solvente menos polar; e aumento da concentração da diarilcetona em relação ao solvente menos polar enquanto se aplica a solução no recipiente. Pode então ser isolado paclitaxel puro ou concentrado de paclitaxel a partir das fracções apropriadas contendo as concentrações mais elevadas de paclitaxel por evaporação e cristalização.

As vantagens adicionais da presente invenção tornar-se-ão prontamente evidentes para os especialistas na técnica a partir da seguinte descrição pormenorizada, em que só é ilustrada e descrita a forma de realização preferida da invenção, simplesmente a título ilustrativo da melhor forma contemplada de

realização da invenção. Como será entendido, a invenção é susceptível de outras formas de realização diferentes em vários aspectos evidentes, todos eles sem afastamento da invenção. A presente invenção pode ser praticada sem alguns de todos estes pormenores específicos. Noutros casos, operações de processo bem conhecidas não foram descritas em pormenor, de forma a não tornar desnecessariamente menos perceptível a presente invenção. Consequentemente, os desenhos e a descrição são para ser considerados como sendo de natureza ilustrativa e não restritiva.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Faz-se referência aos desenhos anexos, em que:

A Fig. 1 ilustra a composição do material de partida utilizado no Exemplo 1, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 2 ilustra a composição das principais fracções do Exemplo 1, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 3 ilustra a composição do material de partida utilizado no Exemplo 2, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 4 ilustra a composição das principais fracções do Exemplo 2, que foram eluídas a cerca de 40 °C, determinada por

análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 5 ilustra a composição das principais fracções do Exemplo 2, que foram eluídas a cerca de 70 °C, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 6 ilustra a composição do material de partida utilizado no Exemplo 3, determinada por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 7 ilustra a composição das principais fracções do Exemplo 3, determinada por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 8 ilustra a composição do produto cristalino do Exemplo 3, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 9 ilustra a composição do material de partida utilizado no Exemplo 4, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 10 ilustra a composição das principais fracções do Exemplo 4, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 11 ilustra a composição do material de partida utilizado no Exemplo 5, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 12 ilustra a composição das principais fracções do Exemplo 5, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 13 ilustra a composição do material de partida do Exemplo 6, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

A Fig. 14 ilustra a composição das principais fracções do Exemplo 6, determinada por análise por HPLC, em que a abcissa representa o tempo de eluição em minutos e a ordenada representa unidades de absorvência.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA DIVULGAÇÃO

A presente invenção foi desenvolvida quando se investigava processos para o isolamento de paclitaxel em grande escala. Após experimentação e investigação, constatou-se que o paclitaxel pode ser purificado eficazmente por cromatografia quando a fase estacionária compreende um adsorvente à base de poliamida e quando a fase móvel compreende uma mistura de uma ou mais dialquilcetonas conjuntamente com outro co-solvente menos polar. A presente invenção permite vantajosamente a separação de paclitaxel de misturas contendo impurezas taxanos, que de outro modo são difíceis de remover mas estão normalmente associadas a

misturas com paclitaxel.

Como utilizado nesta descrição, as formas no singular "um/uma" e "o/a" também abrangem especificamente as formas no plural dos termos a que se referem, salvo indicação clara em contrário pelo contexto.

O termo "cerca de" é aqui utilizado para significar aproximadamente, na região de, grosso modo, ou à volta de. Quando se utiliza o termo "cerca de" em conjunto com uma gama numérica, modifica essa gama alargando os limites acima e abaixo dos valores numéricos indicados. Em geral, o termo "cerca de" é aqui utilizado para modificar um valor numérico acima e abaixo do valor indicado de uma variância de 20%.

Como utilizado nesta descrição, quer seja numa frase de transição quer no corpo da reivindicação, os termos "compreende(m)" e "compreendendo" são para ser interpretados como tendo um significado aberto. Isto é, os termos são para ser interpretados como sinónimos das frases "tendo pelo menos" ou "incluindo pelo menos". Quando utilizado no contexto de um processo, o termo "compreendendo" significa que o processo inclui, pelo menos, os passos descritos, mas pode incluir passos adicionais. Quando utilizado no contexto de um composto ou composição, o termo "compreendendo" significa que o composto ou composição inclui, pelo menos, as características ou componentes descritos, mas também pode incluir características ou componentes adicionais.

Como aqui utilizada, a descrição de uma gama numérica para uma variável pretende significar que a invenção pode ser praticada com a variável igual a qualquer dos valores dentro dessa gama. Assim, para uma variável que é inerentemente discreta, a variável pode ser igual a qualquer valor inteiro da

gama numérica, incluindo os pontos finais da gama. De um modo semelhante, para uma variável que é inerentemente contínua, a variável pode ser igual a qualquer valor real da gama numérica, incluindo os pontos finais da gama. Como exemplo, uma variável que está descrita como tendo valores entre 0 e 2, pode ser 0, 1 ou 2 para variáveis que são inerentemente discretas, e pode ser 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, ou qualquer outro valor real para variáveis que são inerentemente contínuas.

Tal como aqui utilizado, salvo indicação específica em contrário, a palavra "ou" é utilizada no sentido "inclusivo" de "e/ou" e não no sentido "exclusivo" de "um ou outro/ou."

A seguir faz-se aqui referência em pormenor a formas de realização específicas da invenção. Embora a invenção vá ser descrita em conjunto com estas formas de realização específicas, entender-se-á que não é intenção limitar a invenção a essas formas de realização específicas. Na descrição seguinte, são apresentados numerosos pormenores específicos de forma a proporcionar uma compreensão aprofundada da presente invenção. A presente invenção pode ser praticada sem alguns ou todos estes pormenores específicos. Em alguns casos, operações de processo bem conhecidas não foram descritas em pormenor, de forma a não tornar desnecessariamente menos perceptível a presente invenção.

Quaisquer materiais e/ou métodos adequados conhecidos pelos especialistas podem ser utilizados na realização da presente invenção. Contudo, são descritos os materiais e métodos preferidos. Os materiais, reagentes e semelhantes aos quais é feita referência na descrição e exemplos seguintes podem ser obtidos de fontes comerciais, salvo indicação em contrário.

A mistura de partida de paclitaxel pode ser proveniente de

qualquer fonte que contenha paclitaxel e algum componente indesejado. Na prática da presente invenção, pode ser utilizada qualquer mistura de partida de paclitaxel. Por exemplo, a mistura de partida pode ser uma mistura de paclitaxel, cefalomanina e outros taxanos, mas não está a ela limitada. A mistura de partida também pode ser um extracto em bruto ou parcialmente purificado de paclitaxel, que pode ser obtido de fontes comuns tal como por extracção de casca, raízes, folhas e/ou ramos frescos ou secos ou da planta inteira de uma planta contendo paclitaxel, e. g. uma planta *Taxus*. Também estão contempladas outras fontes de paclitaxel para utilização na prática da presente invenção, incluindo um extracto em bruto ou purificado obtido de culturas de células de uma planta *Taxus* cultivada, um meio de fermentação preparado por cultura de um fungo produtor de taxanos; um caldo de fermentação preparado por cultura de estirpes bacterianas específicas modificadas geneticamente para produção de paclitaxel.

As misturas de paclitaxel utilizadas na invenção podem ser de origem diferente e podem conter uma ampla gama de concentrações de paclitaxel. As misturas bem definidas que têm um teor elevado de paclitaxel e outros taxanos (cefalomanina, di-hidrocefalomanina, taxol C, 7-*epi*-paclitaxel, etc.), são normalmente referidas como paclitaxel cristalino em bruto ou concentrado de paclitaxel cristalino, podem ser vantajosamente purificadas por um processo de cromatografia essencialmente num só passo utilizando um adsorvente à base de poliamida. O material de partida pode ser qualquer concentrado de paclitaxel preparado por processos conhecidos a partir de biomassa contendo paclitaxel. Quando se utiliza um material de partida complexo, o processo de purificação pode ser complicado pela presença de impurezas não taxanos. Começando com uma mistura de paclitaxel complexa pode resultar no isolamento de paclitaxel numa pureza

que é inferior á desejada. Assim, a presente invenção contempla mais do que um passo de purificação para purificar paclitaxel tal como um passo de cromatografia ou um passo de cristalização repetido.

Num aspecto da presente invenção, o paclitaxel é separado de componentes indesejados por cromatografia em fase normal. Na cromatografia em fase normal, uma mistura a ser purificada é aplicada numa coluna ou recipiente contendo um adsorvente. Um solvente ou mistura de solventes, *i. e.*, a fase móvel, é subsequentemente aplicado na coluna para fazer com que os constituintes da mistura passem através da coluna e dela eluam. A fase móvel pode ser alimentada por gravidade ou aplicada por utilização de bombas mecânicas e/ou válvulas para manter um controlo mais preciso do processo, como é conhecido na técnica da cromatografia. Em condições apropriadas, os constituintes da mistura são partilhados e eluídos da extremidade da coluna a intervalos de tempo diferentes.

Na prática das formas de realização da presente invenção, uma mistura de paclitaxel é aplicada num recipiente, *e. g.*, uma coluna, compreendendo um composto à base de poliamida para iniciar a purificação da mistura. Embora se creia que o composto à base de poliamida empregue na presente invenção facilita a separação de vários constituintes devido a princípios de adsorção, não está a eles limitada ou tem de actuar necessariamente de acordo com eles. Os princípios pelos quais o paclitaxel é separado de uma mistura de acordo com a presente invenção não estão limitados por qualquer teoria.

Crê-se que a utilização de um adsorvente à base de poliamida como uma fase estacionária em cromatografia em fase normal não é comum. Contudo, crê-se que as poliamidas apresentam

boa estabilidade química e física numa ampla gama de solventes orgânicos, o que facilita a sua utilização na separação de componentes de uma mistura. De acordo com formas de realização da presente invenção, o processo cromatográfico baseia-se numa poliamida como a fase estacionária. Embora haja muitas variações potenciais na composição química de uma estrutura de poliamida, a unidade estrutural central - a ligação amida (-CO-NH-) - está presente em todos os casos. Crê-se que a ordem e o número de unidades metileno entre duas ligações amida sejam responsáveis pela eficácia de separação de um polímero de poliamida específico.

Com base em experimentação, foi determinado que polilactamas, e especialmente policaprolactama, apresentam as melhores propriedades de separação nas condições empregues. Estes materiais apresentaram um elevado grau de estabilidade após operações de cromatografia repetidas sem uma alteração perceptível na sua eficácia de separação. A estabilidade e a eficácia de separação não se alteram mesmo quando se utilizou um passo de eluição com gradiente, e. g., quando se aumentou a concentração da dialquilcetona em relação ao solvente menos polar durante a adição e eluição da solução para e da coluna. As propriedades de uma fase estacionária de poliamida contrastam com as de fases estacionárias inorgânicas, tal como sílica. Por exemplo, a mudança de uma fase móvel polar para não polar pode ser feita muito rapidamente sem necessidade quer de uma grande quantidade de uma fase móvel não polar para a eliminação do solvente polar dos centros activos, quer de secagem da fase estacionária. A utilização de uma poliamida em cromatografia em fase normal leva a uma capacidade de inchamento menor e constante em comparação com a sua utilização em cromatografia em fase inversa, com uma fase móvel contendo água.

As poliamidas são produzidas em escala industrial numa ampla gama de tamanhos de partícula. O tamanho de partícula mais adequado para separação em escala industrial é cerca de 0,05-0,16 mm, que permite uma alta produtividade da fase móvel a uma baixa perda de carga. Conseguiu-se uma boa separação do paclitaxel, mesmo quando se utilizou só cerca de 20 partes em peso de poliamida para cerca de uma parte do material de partida. No entanto a quantidade da fase estacionária depende da composição do material de partida e da pureza desejada do produto paclitaxel final. As poliamidas adequadas que podem ser utilizadas na prática da presente invenção incluem policaprolactama, poliundecanolactama, polilauril lactama, poli(hexametileno adipamida-co-caprolactama), etc.

Outra vantagem da separação de materiais contendo paclitaxel numa fase estacionária de poliamida é a selectividade de separação melhorada observada com o aumento da temperatura. Foi determinado que utilizando temperaturas mais elevadas durante o processo conduz a um melhoramento da separação entre taxanos específicos. Verificou-se que por manutenção da fase estacionária ou móvel a uma temperatura acima da ambiente, e. g., a cerca de 40-70 °C, é melhorada a separação do paclitaxel do seu análogo cefalomanina, que apresenta um comportamento de separação muito semelhante. Além disso, as temperaturas mais elevadas fazem baixar a viscosidade da fase móvel e, conseqüentemente, devem baixar os custos de produção. A cromatografia que utiliza alta temperatura não é facilmente aplicável a outros processos de separação, especialmente aqueles que utilizam cromatografia em fase inversa por causa da epimerização do paclitaxel em solventes contendo água. Em contraste, a epimerização do paclitaxel numa solução que, substancialmente, exclui água ou um álcool é negligenciável e assim não limita o processo a temperaturas mais baixas.

A escolha de solventes adequados para a fase móvel influencia a eficácia de separação. Verificou-se que a melhor separação de paclitaxel de impurezas presentes num material contendo paclitaxel em bruto era conseguida com um processo por eluição com gradiente. Numa forma de realização da presente invenção, uma mistura de paclitaxel é aplicada num composto poliamida seguida por uma primeira fase móvel, que compreende uma baixa concentração de dialquilcetona no solvente menos polar, e. g., em que a solução compreende a dialquilcetona numa proporção para o solvente menos polar de cerca de 5% (V/V) a cerca de 15% (V/V). Depois de uma quantidade suficiente da primeira fase móvel ter sido aplicada no composto poliamida em condições isocráticas, i. e., sem alteração da composição dos solventes, pode ser aplicada uma segunda fase móvel em condições de gradiente, i. e., em que a concentração da dialquilcetona é aumentada desde uma concentração baixa até uma concentração elevada.

Em condições isocráticas crê-se que todas as substâncias lipófilas eluem da coluna com a primeira fase móvel e quando a concentração da dialquilcetona na fase móvel é aumentada, crê-se que todas as restantes substâncias são eluídas. Este tipo de perfil de eluição pode efectivamente separar não só as substâncias não taxanos mas também proporciona boa separação para todas as substâncias que possuem o esqueleto de taxano. Na prática de certas formas de realização da presente invenção, observou-se que o paclitaxel elui como a última substância de todos os taxanos comuns. Nestas circunstâncias, crê-se que ocorre o efeito de deslocamento do paclitaxel e foi observado que a zona de eluição do paclitaxel é bem definida sem sobreposição de quaisquer substâncias que eluem previamente. Consequentemente, a eluição do paclitaxel como o último taxano

pode excluir efeitos de "arrastamento", que no passado constituíram um problema.

Com base em experiências laboratoriais, demonstrou-se que o paclitaxel pode ser eficazmente separado de outras substâncias por cromatografia utilizando uma fase estacionária à base de poliamida e utilizando misturas de dialquilcetonas e um co-solvente orgânico menos polar como a fase móvel. As dialquilcetonas adequadas que podem ser utilizadas na prática da presente invenção incluem acetona, metilisobutilcetona, 2-butanona, metiletilcetona, etc. A acetona e a metilisobutilcetona são os solventes mais preferidos entre o grupo das dialquilcetonas. São não tóxicas e baratas. Contudo, tendem a ser excessivamente polares para ser utilizadas como uma fase móvel de um só componente. Portanto a polaridade da fase móvel é diminuída pela adição de um ou mais co-solventes menos polares tais como um hidrocarboneto alifático, um hidrocarboneto aromático ou um éter dialquílico.

Numa forma de realização da presente invenção, os pontos de ebulição dos solventes utilizados como a fase móvel devem ser inferiores a cerca de 130 °C. Isto é porque o produto é de preferência recuperado das fracções cromatográficas por evaporação. Se os pontos de fusão dos solventes forem excessivamente baixos contudo, a evaporação dos solventes levanta preocupações ambientais. Assim, os solventes menos polares preferidos utilizados na prática de formas de realização da presente invenção incluem hidrocarbonetos alifáticos em C₅-C₈, tais como hexano ou heptano; hidrocarbonetos aromáticos em C₆-C₈, tal como tolueno; éteres dialquílicos em C₁-C₄, tal como éter dibutílico, éter diisobutílico ou éter terc-butílico metílico; ou uma sua mistura.

Podem ser criadas muitas combinações de soluções a partir de solventes adequados. Para melhorar a eficiência do processo, os solventes individuais podem ser recuperados após o processo de separação, como por destilação. É preferida a utilização de uma combinação de solventes que tenham uma diferença suficiente dos seus pontos de ebulição por forma a facilitar a sua separação por destilação. Com base no seu ponto de ebulição, o tolueno é o solvente preferido entre os solventes menos polares.

Outra consideração relativa à escolha de solventes a utilizar como a fase móvel depende do material a ser separado. Normalmente as misturas complexas com uma baixo teor de paclitaxel também contêm algumas impurezas muito polares a ser retiradas. Essas impurezas têm em última análise de ser removidas por lavagem da coluna. Essas misturas de paclitaxel parecem ser mais prontamente separadas pela combinação de acetona e tolueno como uma fase móvel.

As fracções eluídas contendo uma elevada concentração de paclitaxel podem ser depois isoladas por evaporação em vácuo. A extensão da secagem vai ditar se o produto resulta num resíduo viscoso ou numa massa sólida, podendo qualquer delas ser cristalizada de solventes adequados para se obter paclitaxel em forma cristalina. A utilização de um sistema de solventes completamente orgânicos conjuntamente com a evaporação rápida destes solventes com vantagem reduz ou elimina completamente a isomerização indesejada do paclitaxel a 7-*epi*-paclitaxel. Esta é outra vantagem em relação a métodos de isolamento conhecidos à base de cromatografia em fase inversa.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes pretendem ilustrar melhor certas formas de realização preferidas da invenção e não têm natureza limitativa. Os especialistas na técnica reconhecerão, ou estará ao seu alcance determinar, sem utilizar mais do que experimentação de rotina, numerosos equivalentes das substâncias e processos específicos aqui descritos.

Exemplo 1

Cerca de 0,71 g de uma mistura em bruto contendo cerca de 8,38% de paclitaxel e cerca de 2,23% de cefalomanina (tal como ilustrado na Fig. 1) foi dissolvida em cerca de 10 mL de uma mistura contendo acetona e tolueno numa proporção de 10:90 (V/V). A solução foi aplicada numa coluna cheia com cerca de 45 g de um adsorvente à base de poliamida (Poliamida Roth, tamanho de partícula de cerca de 50-160 μm). A coluna foi depois eluída com cerca de 600 mL de uma solução de acetona e tolueno 10:90 (V/V). Em seguida adicionou-se à coluna cerca de 1200 mL de uma solução de acetona e tolueno enquanto se aumentava linearmente o gradiente de acetona desde uma proporção de partida de 10:90 (V/V) até uma proporção final de 100:0 (V/V). O caudal da fase móvel foi mantido a cerca de 50 mL/min durante todo o processo de eluição. Foram recolhidas fracções da solução de eluição a aproximadamente cada 50 mL desde o momento de injeção até ao momento final da eluição de gradiente e analisadas por HPLC. As fracções da solução de eluição contendo paclitaxel foram evaporadas até à secura para dar cerca de 0,14 g de produto contendo cerca de 37,54% de paclitaxel e cerca de 6,80% de cefalomanina (análise por HPLC ilustrada na Fig. 2).

Exemplo 2

Cerca de 0,75 g de uma mistura em bruto contendo cerca de 1,99% de paclitaxel e cerca de 0,89% de cefalomanina (tal como ilustrado na Fig. 3) foram dissolvidos em 15 mL de uma mistura de acetona e tolueno 10:90 (V/V). A solução foi aplicada numa coluna cheia com cerca de 45 g de poliamida (Poliamida Roth, tamanho de partícula de cerca de 50-160 μm). A coluna foi então eluída com 600 mL de uma solução de acetona e tolueno 10:90 (V/V) enquanto se mantinha uma temperatura de cerca de 40 °C. Adicionou-se aproximadamente 1200 mL de uma combinação de acetona e tolueno enquanto se aumentava linearmente o gradiente de acetona desde uma proporção de partida de 10:90 (V/V) até uma proporção final de 100:0 (V/V). Foram recolhidas fracções da solução de eluição a aproximadamente cada 50 mL. As fracções foram analisadas por HPLC. A mesma experiência com material de partida idêntico foi realizada nas mesmas condições excepto que a coluna foi mantida a cerca de 50 °C, 60 °C ou 70 °C. As fracções correspondentes contendo paclitaxel de todas as quatro separações foram avaliadas quanto ao teor de paclitaxel e de cefalomanina. Verificou-se que uma temperatura aumentada conduz a um melhoramento da separação entre estas duas substâncias desde uma proporção de cerca de 3,89:1 a 40 ° (análise por HPLC ilustrada na Fig. 4) até uma proporção de cerca de 5,31:1 a 70 °C (análise por HPLC ilustrada na Fig. 5).

Exemplo 3

Cerca de 198,0 g de uma mistura de paclitaxel em bruto contendo cerca de 7,3% de paclitaxel e cerca de 2,3% de cefalomanina (a proporção inicial de paclitaxel/cefalomanina era

cerca de 3,17:1 de acordo com a análise por HPLC, como ilustrado na Fig. 6) foram dissolvidos em 4 L de acetona e tolueno (10:90 V/V). A solução foi aplicada numa coluna cheia com cerca de 6830 g de poliamida (Poliamida Roth, tamanho de partícula de cerca de 50-160 µm). A coluna foi então eluída com 100 L de acetona e tolueno (10:90 V/V). Foi adicionalmente eluída com 200 L de mistura de acetona e tolueno enquanto se aumentava linearmente o gradiente de acetona desde uma proporção de partida de 10:90 (V/V) até uma proporção final de 100:0 (V/V). Foram recolhidas fracções da solução de eluição a cada 20 mL e analisadas por HPLC. As fracções contendo paclitaxel puro foram evaporadas até à secura dando cerca de 22,42 g de produto contendo cerca de 60,5% de paclitaxel e cerca de 1,3% de cefalomanina (análise por HPLC ilustrada na Fig. 7). A pureza do paclitaxel após cristalização de uma mistura de acetona e hexano (50:50 V/V) era cerca de 98,9% (análise por HPLC ilustrada na Fig. 8).

Exemplo 4

Cerca de 68,3 g de paclitaxel cristalino em bruto contendo cerca de 55,0% de paclitaxel e cerca de 19,0% de cefalomanina (a proporção inicial de paclitaxel/cefalomanina era aproximadamente 2,89:1 de acordo com a análise por HPLC tal como ilustrado na Fig. 9) foram dissolvidos em 2 L de acetona e tolueno (10:90 V/V). A solução foi então aplicada numa coluna cheia com cerca de 6830 g de poliamida (Poliamida Roth, tamanho de partícula de 50-160 µm). A coluna foi então eluída a 50 °C com 100 L de acetona e tolueno (10:90 V/V) e adicionalmente eluída com 200 L de acetona e tolueno enquanto se aumentava linearmente o gradiente de acetona desde uma proporção de partida de 10:90 (V/V) até uma proporção final de 100:0 (V/V). Foram recolhidas fracções da solução de eluição a cada 20 mL e analisadas por

HPLC. As fracções contendo paclitaxel puro foram evaporadas até à secura dando cerca de 28,61 g de produto contendo cerca de 83,1% de paclitaxel e cerca de 1,0% de cefalomanina (análise por HPLC ilustrada na Fig. 10).

Exemplo 5

Cerca de 0,33 g de uma mistura de paclitaxel em bruto contendo cerca de 15,28% de paclitaxel e cerca de 3,35% de cefalomanina (como ilustrado na Fig. 11) foram dissolvidos em 8 mL de acetona e hexano 31:69 (V/V). A solução foi então aplicada numa coluna cheia com cerca de 45 g de poliamida (Poliamida Roth, tamanho de partícula de cerca de 50-160 µm). A coluna foi depois eluída com 600 mL de uma mistura de acetona e hexano 20:80 (V/V). A coluna foi depois adicionalmente eluída com 1200 mL de acetona e hexano enquanto se aumentava linearmente o gradiente de acetona desde uma proporção de partida de 20:80 (V/V) até uma proporção final de 100:0 (V/V). Foram recolhidas fracções da solução de eluição a cada 50 mL e analisadas por HPLC. As fracções contendo paclitaxel puro foram evaporadas até à secura dando cerca de 0,07 g de produto contendo cerca de 29,7% de paclitaxel e cerca de 3,5% de cefalomanina (análise por HPLC ilustrada na Fig. 12).

Exemplo 6

Cerca de 0,35 g de concentrado de paclitaxel contendo cerca de 65,78% de paclitaxel e cerca de 2,08% de taxol C (como ilustrado na Fig. 13) foram dissolvidos em 20 mL de acetona e tolueno (15:85 V/V). A solução foi então aplicada numa coluna cheia com cerca de 35 g de poliamida (Poliamida Roth, tamanho de

partícula de 315 µm). A coluna foi depois eluída com 750 mL de uma mistura de acetona e tolueno 15:85 (V/V). Foi depois adicionalmente eluída com 750 mL de uma mistura de acetona e tolueno enquanto se aumentava linearmente o gradiente de acetona desde uma proporção de partida de 15:85 (V/V) até uma proporção final de 50:50 (V/V). Foram recolhidas fracções da solução de eluição a cada 50 mL e analisadas por HPLC. As fracções contendo paclitaxel puro foram evaporadas até à secura dando cerca de 0,25 g de produto contendo cerca de 68,63% de paclitaxel e cerca de 0,63% de taxol C (análise por HPLC ilustrada na Fig. 14).

Nesta divulgação só se descreve as formas de realização preferidas da invenção e apenas alguns exemplos da sua versatilidade. Entender-se-á que a invenção é susceptível de utilização em várias outras combinações e ambientes e é susceptível de alterações ou modificações dentro do âmbito do conceito inventivo tal como aqui expresso. Assim, por exemplo, os especialistas na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar, utilizando não mais do que experimentação de rotina, numerosos equivalentes das substâncias e processos específicos aqui descritos. Esses equivalentes são considerados como estando dentro do âmbito desta invenção, e estão abrangidos pelas reivindicações anexas.

Lisboa, 12 de Novembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a purificação de paclitaxel, compreendendo o processo os passos de:
 - a) aplicação de uma mistura de partida compreendendo paclitaxel num recipiente compreendendo um composto à base de poliamida;
 - b) aplicação no referido recipiente de uma solução de eluição compreendendo uma ou mais dialquilcetonas misturadas com um solvente menos polar;
 - c) eluição da mistura de partida; e
 - d) recolha de uma ou mais fracções da solução de eluição contendo paclitaxel.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura de partida é um extracto em bruto ou purificado obtido por extracção do grupo consistindo de uma planta de *Taxus* inteira, ou a sua casca, raiz, folha ou ramo fresco ou seco.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura de partida é um extracto em bruto ou purificado obtido por extracção de culturas de células obtidas de uma planta de *Taxus*.
4. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura de partida é um extracto em bruto ou purificado obtido por extracção de um caldo de fermentação preparado por cultura

de fungos produtores de taxanos.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura de partida é um extracto em bruto ou purificado obtido por extracção de um caldo de fermentação preparado por cultura de estirpes bacterianas específicas modificadas geneticamente para produção de paclitaxel.
6. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a mistura de partida é uma mistura de paclitaxel, cefalomanina e outros taxanos.
7. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a uma ou mais dialquilcetonas são seleccionadas do grupo consistindo em acetona, 2-butanona, ou metilisobutilcetona.
8. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o solvente menos polar é seleccionado do grupo consistindo num hidrocarboneto alifático em (C₅-C₈), um hidrocarboneto aromático em (C₆-C₈), e um éter dialquílico em (C₁-C₄) ou uma sua mistura.
9. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que o hidrocarboneto alifático em (C₅-C₈) é hexano ou heptano.
10. Processo de acordo com a reivindicação 8 em que o hidrocarboneto aromático em (C₆-C₈) é tolueno.
11. Processo de acordo com a reivindicação 8, em que o éter dialquílico em (C₁-C₄) é seleccionado do grupo consistindo em éter dibutílico, éter diisobutílico e éter terc-butilmetílico.

12. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que cerca de uma parte em peso da mistura de partida é aplicada numa coluna cheia com mais do que cerca de 20 partes em peso do composto à base de poliamida.
13. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a poliamida é seleccionada do grupo consistindo em policaprolactama, poliundecanolactama e polilaurillactama.
14. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a poliamida é poli(hexametileno adipamida-co-caprolactama).
15. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a solução compreende uma ou mais dialquilcetonas numa proporção para o solvente menos polar de cerca de 5% (V/V) a cerca de 100% (V/V).
16. Processo de acordo com a reivindicação 15, em que a solução compreende acetona como a uma ou mais dialquilcetonas e ou tolueno ou hexano como o solvente menos polar.
17. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 16, compreendendo ainda o aumento da concentração da dialquilcetona em relação ao solvente menos polar durante a aplicação da solução no recipiente.

Lisboa, 12 de Novembro de 2008

Fig. 1

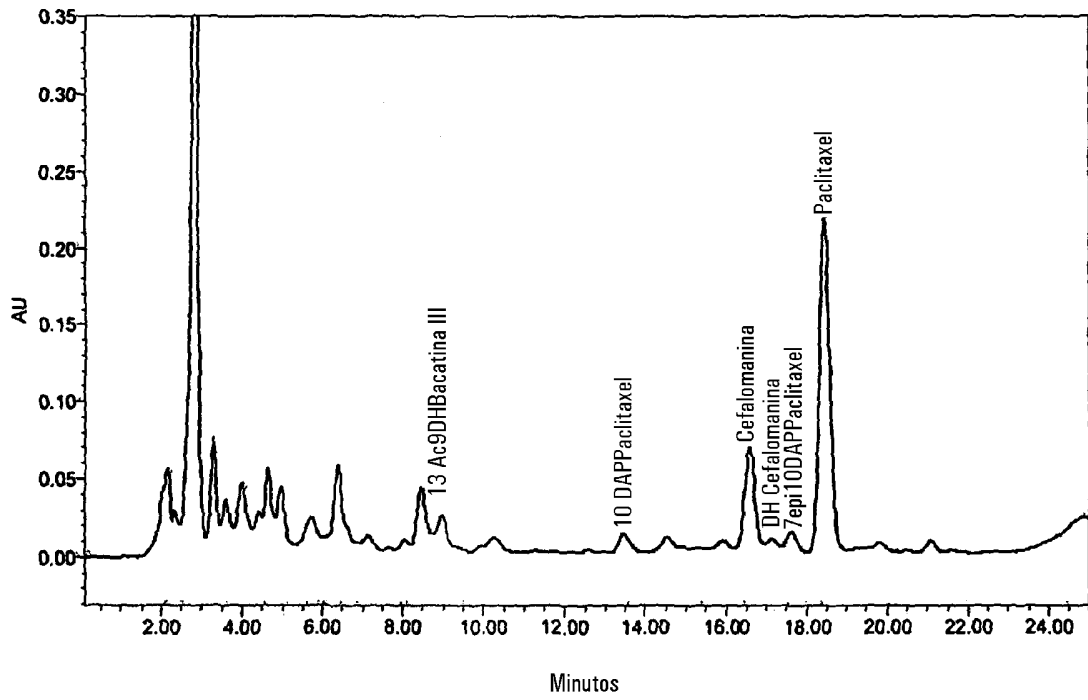


Fig. 2

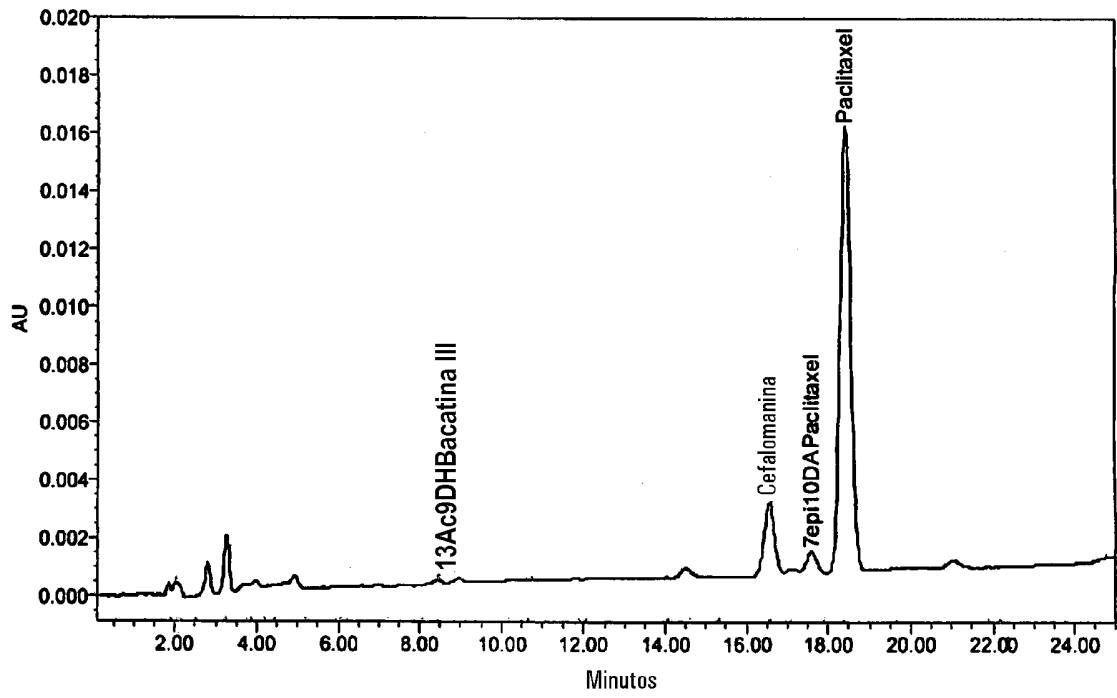


Fig. 3

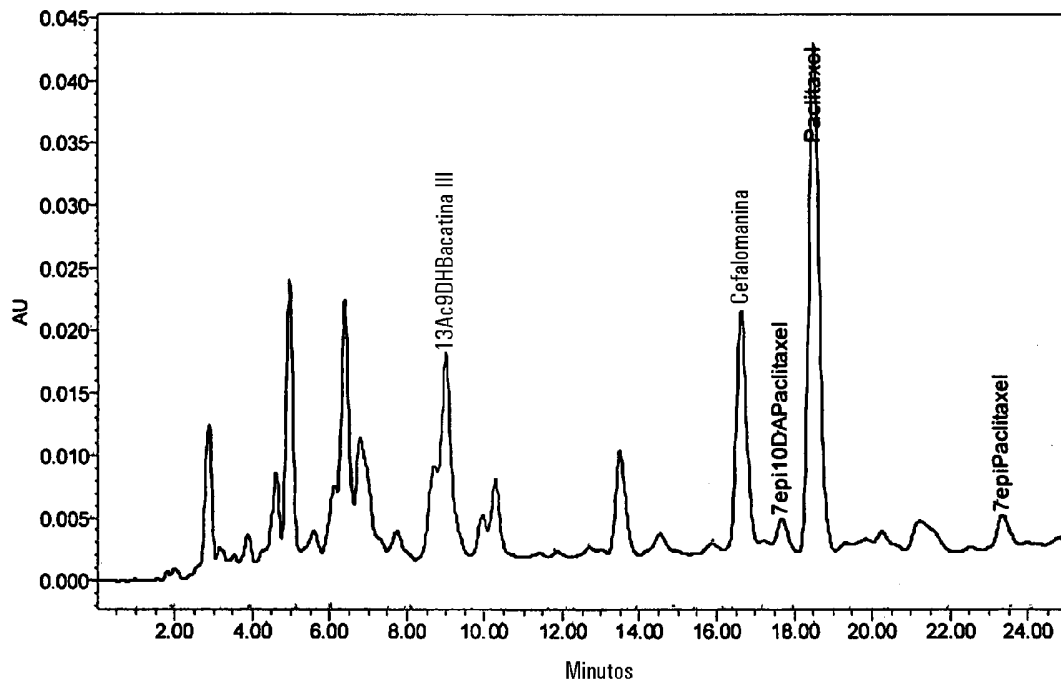


Fig. 4

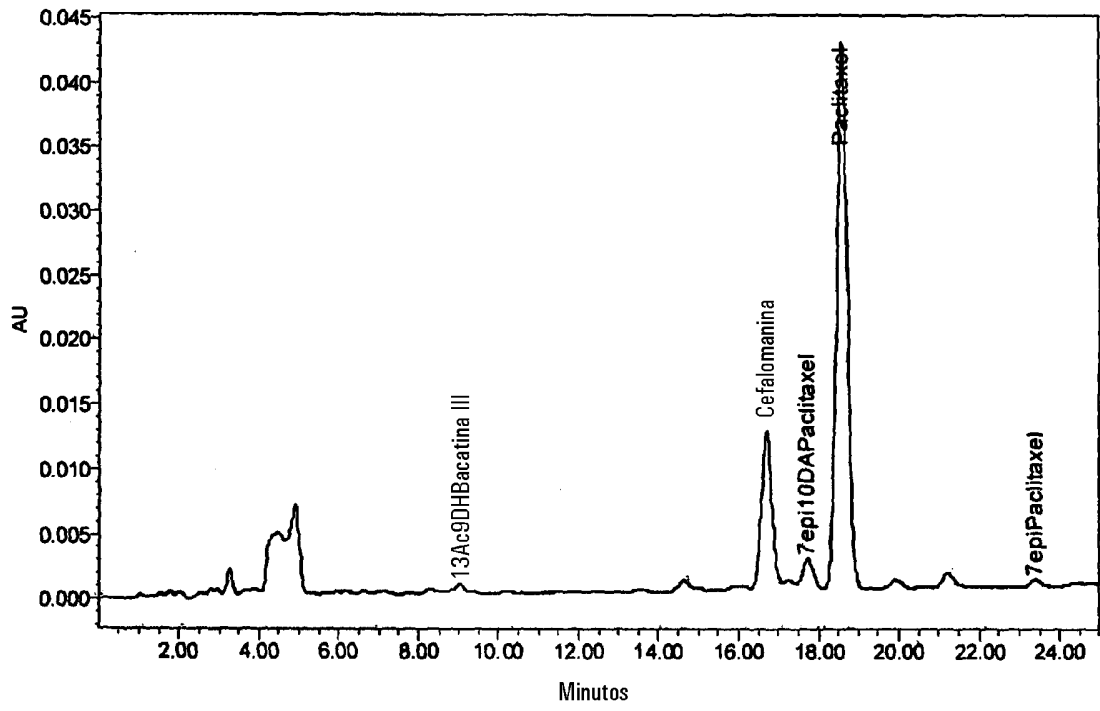


Fig. 5

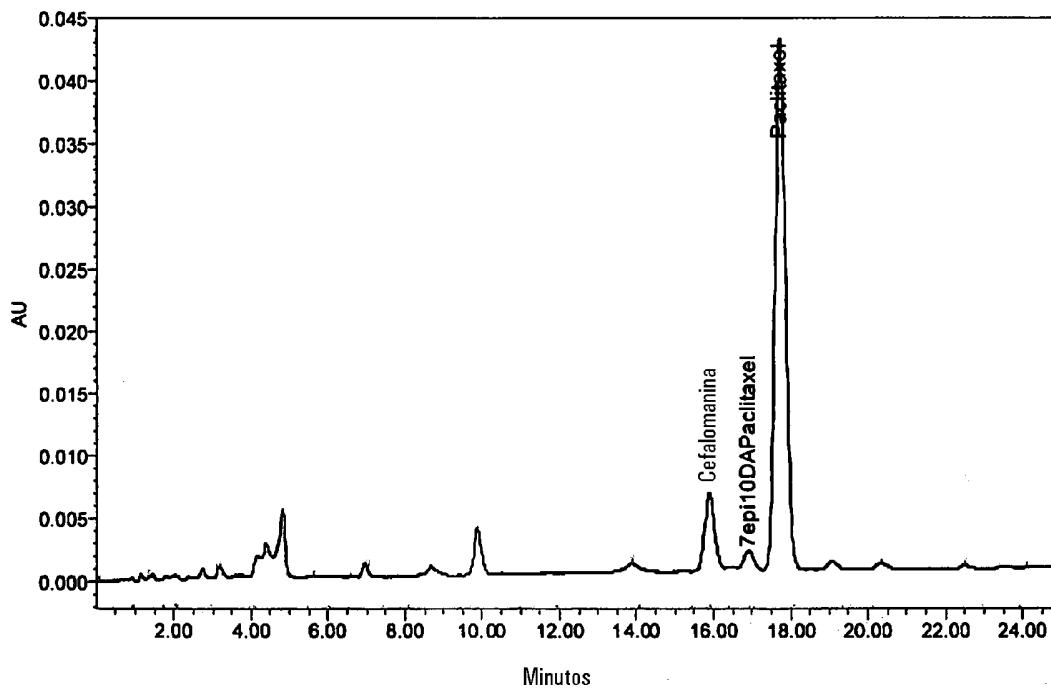


Fig. 6

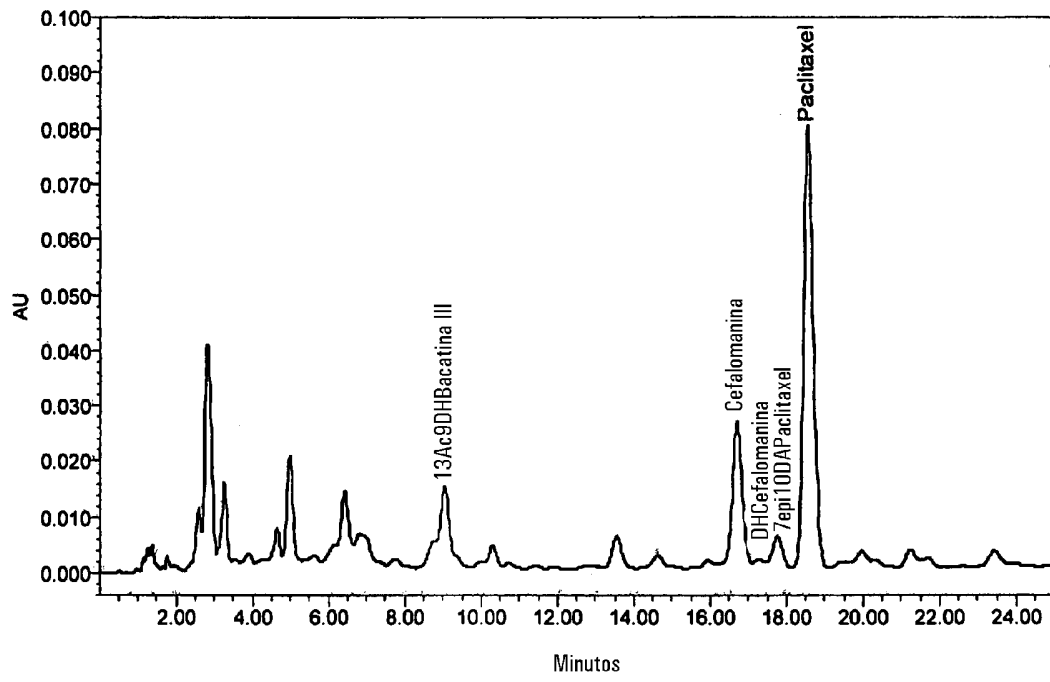


Fig. 7

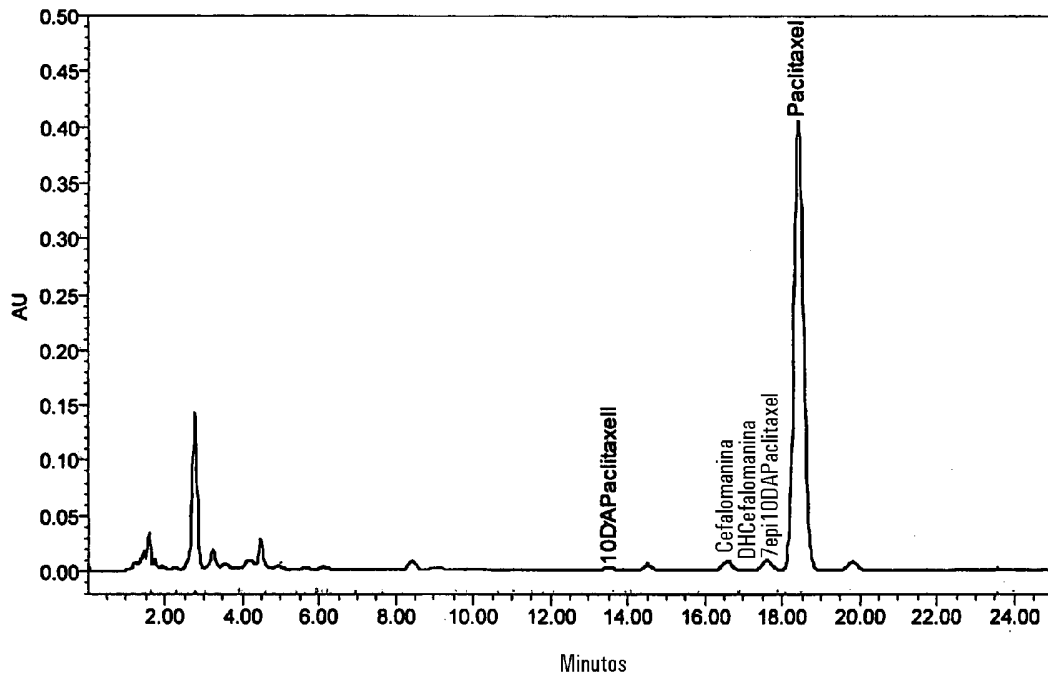


Fig. 8

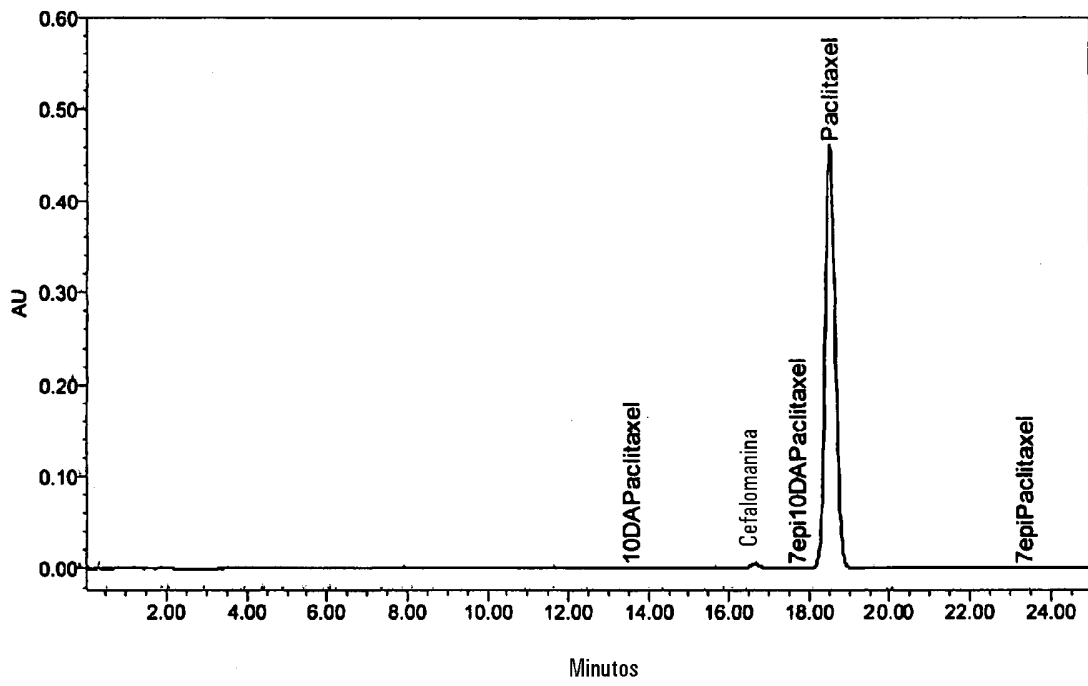


Fig. 9

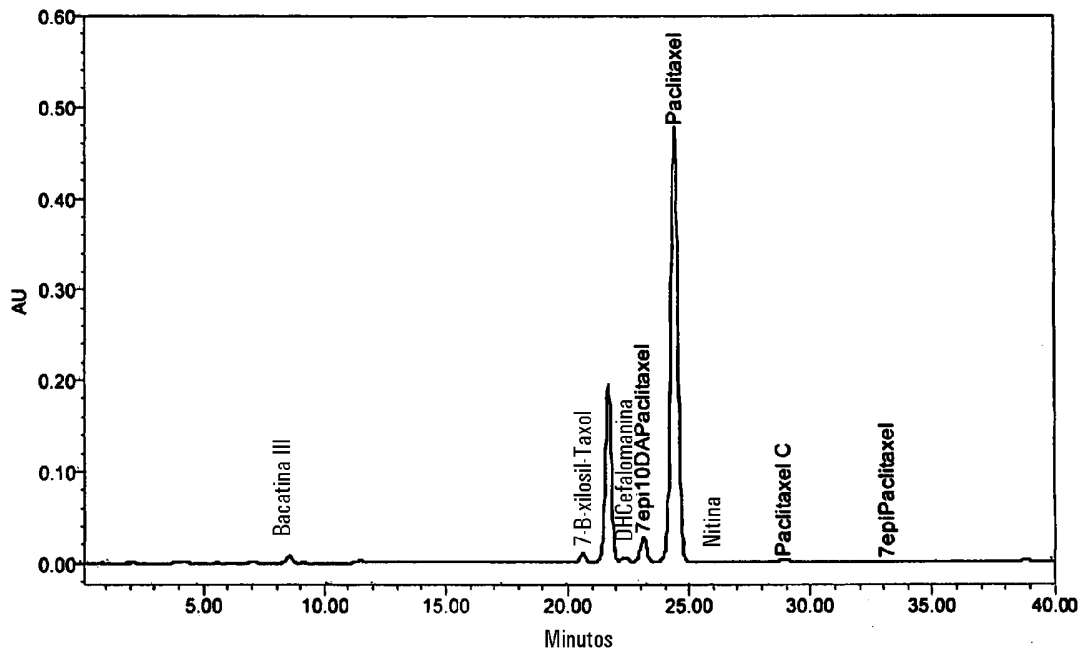
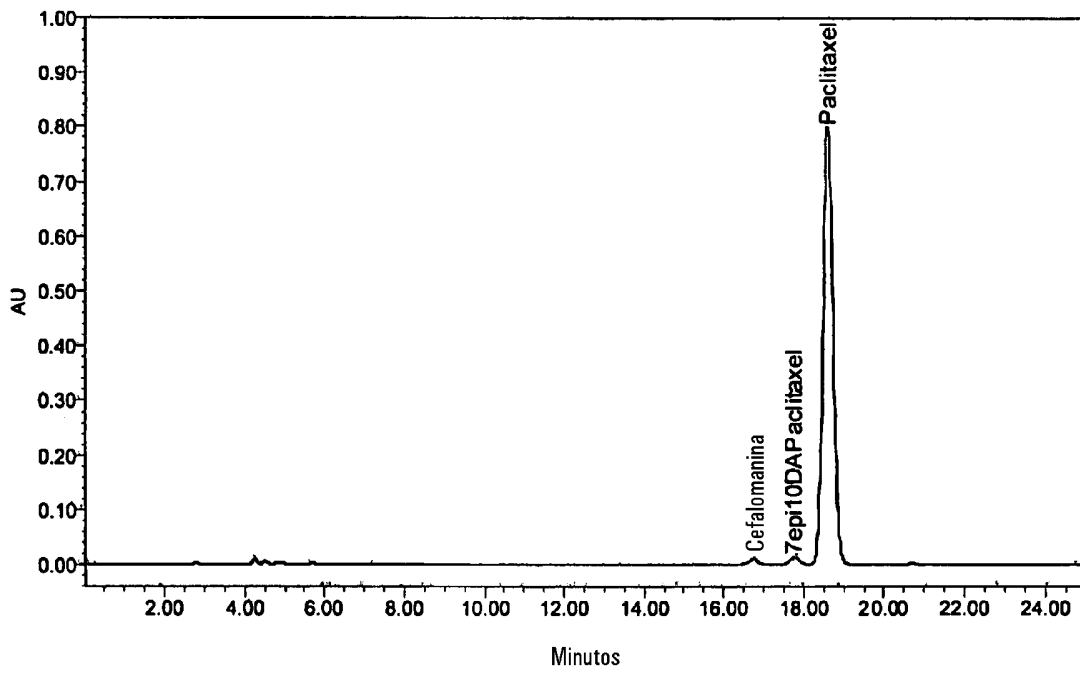


Fig. 10



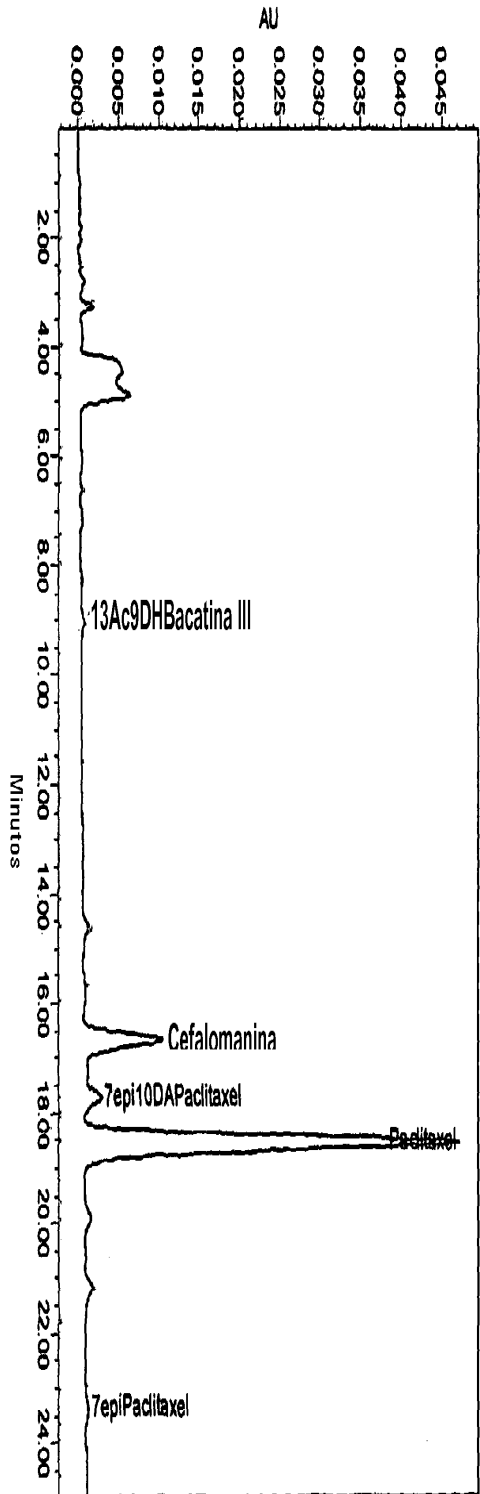


Fig. 11

Fig. 12

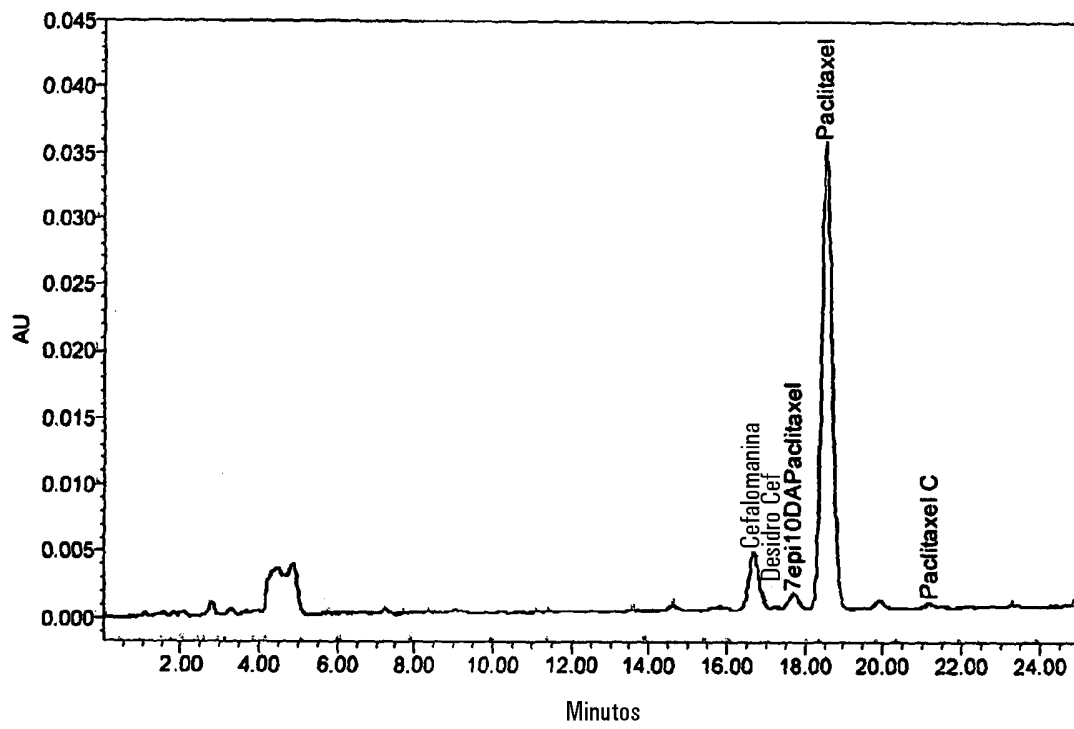


Fig. 13

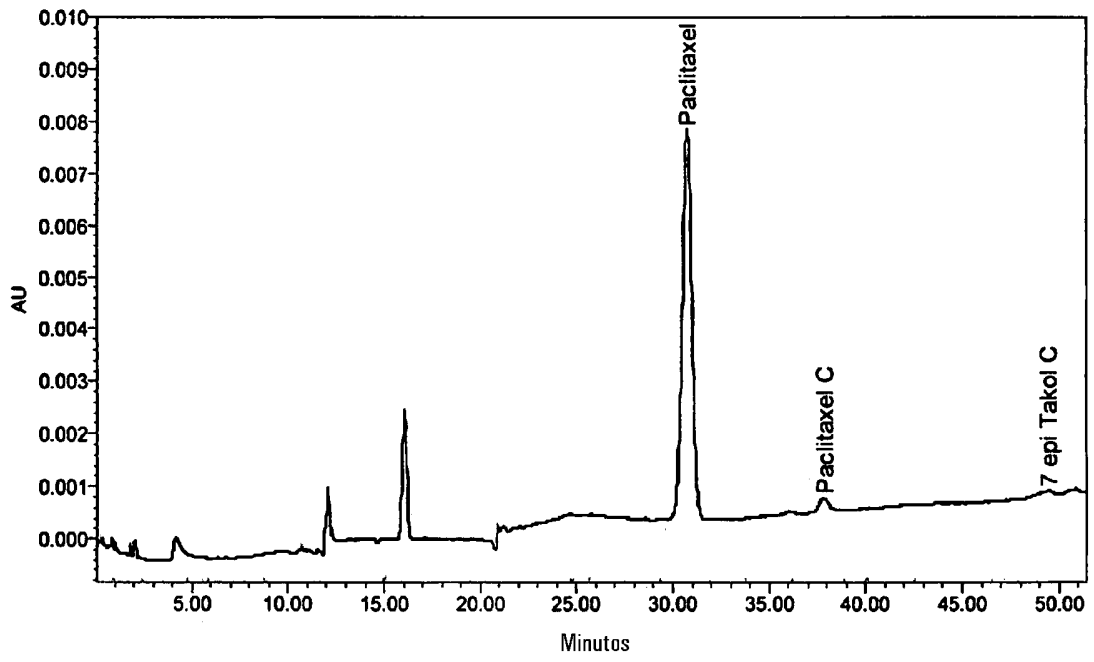
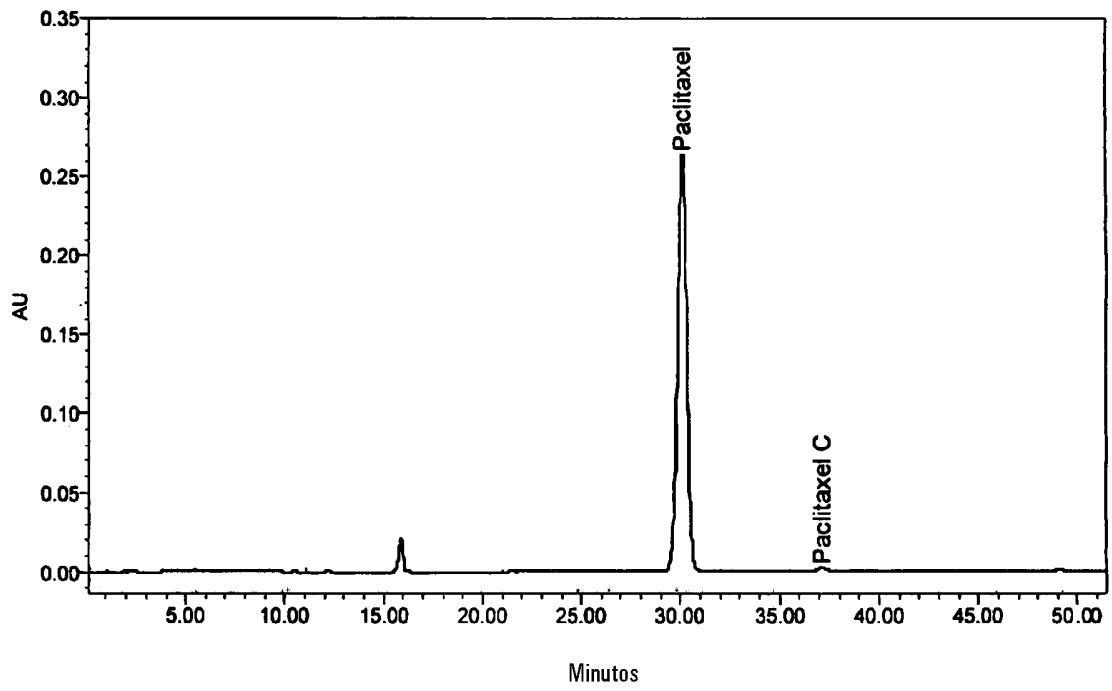


Fig. 14



RESUMO

"PROCESSO PARA ISOLAMENTO DE PACLITAXEL"

o paclitaxel é isolado por um processo incluindo cromatografia em fase normal utilizando uma fase estacionária de poliamida e uma mistura contendo uma dialquilcetona e um solvente menos polar como uma fase móvel. As dialquilcetonas adequadas incluem acetona ou metilisobutilcetona. Os co-solventes menos polares adequados incluem um hidrocarboneto alifático em (C₅-C₈), um hidrocarboneto aromático em (C₆-C₈), um éter dialquílico em (C₁-C₄) ou as suas misturas.