



(72) BUI-KHAC, TRUNG, CA

(72) DUPUIS, NICOLAS, CA

(71) CHAICHEM PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL, CA

(51) Int.Cl.⁶ C07D 305/14

(54) **PROCEDE DE RECUPERATION DE PACITAXELINE A PARTIR
DE SOURCES NATURELLES**

(54) **PROCESS FOR RECOVERING PACITAXELINE FROM
NATURAL SOURCES**

(57) Procédé permettant de récupérer, avec des rendements élevés, la Pacitaxeline® à partir d'une source naturelle est caractérisé en ce que: - dans une première étape, la source naturelle contenant du Pacitaxeline® est séchée et broyée, puis l'huile résultant du broyage est récupérée par extraction et enrichie a des teneurs en Pacitaxeline® comprises entre 3 à 5%, l'enrichissement incluant une étape de décoloration partielle par précipitation soit en milieu basique soit en milieu acide; - dans une deuxième étape, le précipité récupéré est solubilisé en présence d'un solvant apolaire, puis la solution ainsi formée est percolorée à l'aide d'hexane; - dans une troisième étape, la solution obtenue par percoloration est séparée en une phase huileuse et en une phase hexane, chaque phase est soumise à un traitement d'enrichissement en Pacitaxeline®, la phase huileuse étant enrichie jusqu'à une teneur en Pacitaxeline® comprise entre 25 et 30% et la phase hexane est enrichie jusqu'à des teneurs en Pacitaxeline® comprises entre 15 et 20%, de plus, au cours de l'enrichissement de la phase huileuse, les contaminants sont extraits, - dans une quatrième étape, les phases huileuses et hexanes enrichies sont mélangées et la solution ainsi obtenue est soumise à un traitement d'enrichissement jusqu'à des teneurs de 50 à 60% en Pacitaxeline®, cette étape d'enrichissement comprenant une étape de précipitation en milieu acide dans le cas où la décoloration partielle de la première étape a été réalisée en milieu basique ou une étape de précipitation en milieu basique dans le cas où la décoloration partielle de la première étape a été réalisée en milieu acide, et - dans une cinquième étape, la solution enrichie obtenue dans la quatrième étape est enrichie par chromatographie jusqu'à une teneur de 98-99% en Pacitaxeline®.

ABRÉGÉ DESCRIPTIF

Procédé permettant de récupérer, avec des rendements élevés, la Pacitaxeline® à partir d'une source naturelle est caractérisé en ce que :

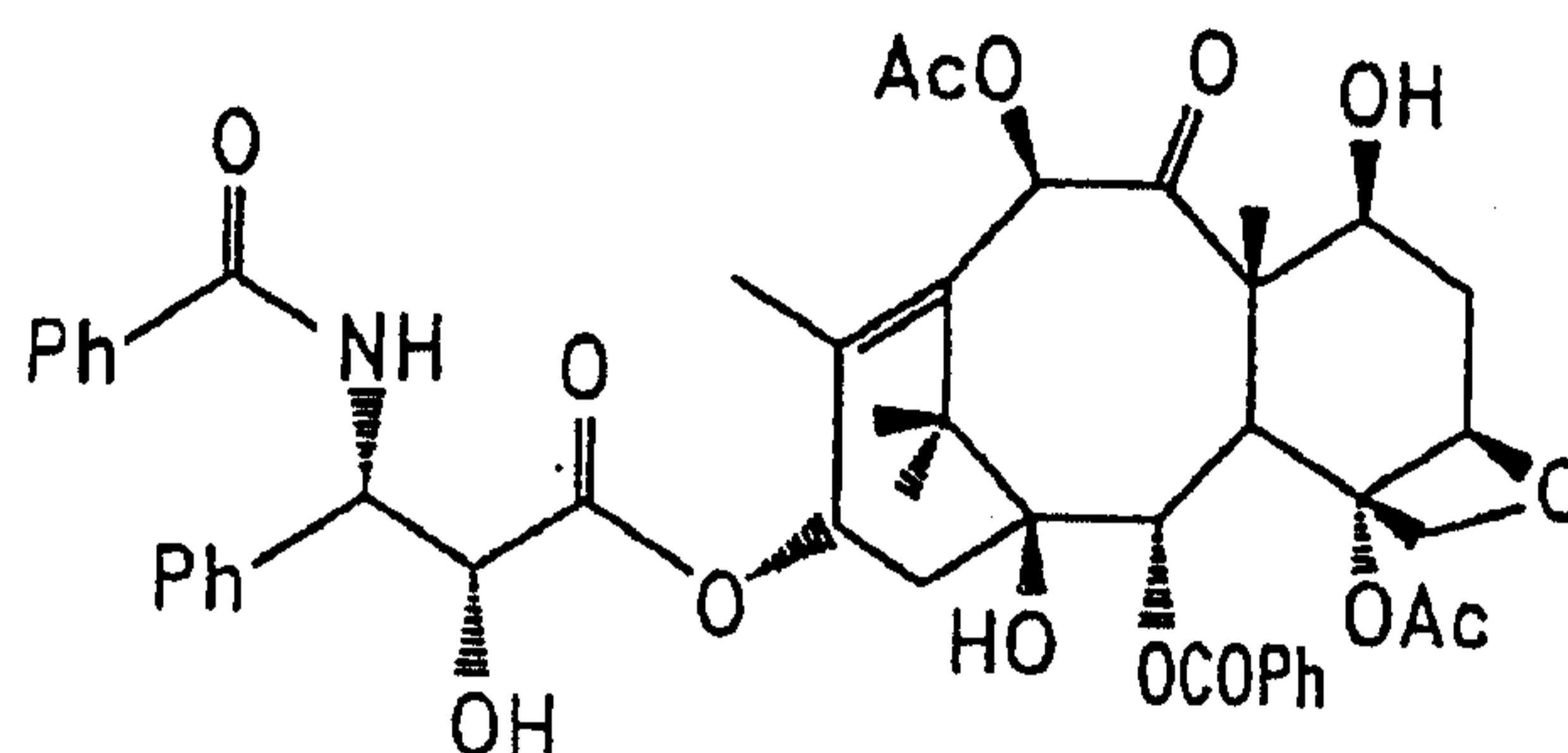
- dans une première étape, la source naturelle contenant du Pacitaxeline® est séchée et broyée, puis l'huile résultant du broyage est récupérée par extraction et enrichie à des teneurs en Pacitaxeline® comprises entre 3 à 5%, l'enrichissement incluant une étape de décoloration partielle par précipitation soit en milieu basique soit en milieu acide;
- dans une deuxième étape, le précipité récupéré est solubilisé en présence d'un solvant apolaire, puis la solution ainsi formée est percolorée à l'aide d'hexane;
- dans une troisième étape, la solution obtenue par percoloration est séparée en une phase huileuse et en une phase hexane, chaque phase est soumise à un traitement d'enrichissement en Pacitaxeline®, la phase huileuse étant enrichie jusqu'à une teneur en Pacitaxeline® comprise entre 25 et 30% et la phase hexane est enrichie jusqu'à des teneurs en Pacitaxeline® comprises entre 15 et 20%, de plus, au cours de l'enrichissement de la phase huileuse, les contaminants sont extraits,
- dans une quatrième étape, les phases huileuses et hexanes enrichies sont mélangées et la solution ainsi obtenue est soumise à un traitement d'enrichissement jusqu'à des teneurs de 50 à 60% en Pacitaxeline®, cette étape d'enrichissement comprenant une étape de précipitation en milieu acide dans le cas où la décoloration partielle de la première étape a été réalisée en milieu basique ou une étape de précipitation en milieu basique dans le cas où la décoloration partielle de la première étape a été réalisée en milieu acide, et
- dans une cinquième étape, la solution enrichie obtenue dans la quatrième étape est enrichie par chromatographie jusqu'à une teneur de 98-99% en Pacitaxeline®.

PROCÉDÉ DE RÉCUPÉRATION DE PACITAXELINE® À PARTIR DE SOURCES NATURELLES

1. PROBLÈME TECHNIQUE À RÉSOUDRE

La Pacitaxeline® est un agent anticancéreux très efficace. Le facteur qui a limité le développement de ce médicament végétal est sa faible teneur dans les espèces végétales qui en contiennent comme les ifs, mais aussi les faibles rendements des procédés d'extraction connus.

Des synthèses chimiques ont été proposées et ont permis l'obtention de Pacitaxeline® (aussi appelé Taxol ou Paclitaxel), de formule chimique :



La complexité des synthèses chimiques mises en œuvre et leur rendement modéré génèrent des coûts très élevés.

2. AVANTAGES RECHERCHÉS

Il existait un besoin pour un procédé permettant l'extraction et la purification de Pacitaxeline® avec des rendements élevés en raison d'une quantité limitée de ressources naturelles susceptibles de fournir le principe actif recherché et en raison des contraintes environnementales.

3. DESCRIPTION DE L'INVENTION

L'objet de la présente invention est donc un procédé permettant la récupération de Pacitaxeline® à partir de sources naturelles.

Selon une première variante, le procédé de l'invention permettant de récupérer, avec des rendements élevés, la Pacitaxeline® à partir d'une source naturelle est caractérisé en ce que :

- dans une première étape, la source naturelle contenant du Pacitaxeline® est séchée et broyée, puis l'huile résultant du broyage est récupérée par extraction et enrichie à des teneurs en Pacitaxeline® comprises entre 3 à 5%, l'enrichissement incluant une étape de décoloration partielle par précipitation soit en milieu basique soit en milieu acide;
- dans une deuxième étape, le précipité récupéré est solubilisé en présence d'un solvant apolaire, puis la solution ainsi formée est percolorée à l'aide d'hexane;
- dans une troisième étape, la solution obtenue par percoloration est séparée en une phase huileuse et en une phase hexane, chaque phase est soumise à un traitement d'enrichissement en Pacitaxeline®, la phase huileuse étant enrichie jusqu'à une teneur en Pacitaxeline® comprise entre 25 et 30% et la phase hexane est enrichie jusqu'à des teneurs en Pacitaxeline® comprises entre 15 et 20%, de plus, au cours de l'enrichissement de la phase huileuse, les contaminants sont extraits,
- dans une quatrième étape, les phases huileuses et hexanes enrichies sont mélangées et la solution ainsi obtenue est soumise à un traitement d'enrichissement jusqu'à des teneurs de 50 à 60% en Pacitaxeline®, cette étape d'enrichissement comprenant une étape de précipitation en milieu acide dans le cas où la décoloration partielle de la première étape a été réalisée en milieu basique ou une étape de précipitation en milieu basique dans le cas où la décoloration partielle de la première étape a été réalisée en milieu acide, et

- dans une cinquième étape, la solution enrichie obtenue dans la quatrième étape est enrichie par chromatographie jusqu'à une teneur de 98-99% en Pacitaxeline®.

Le procédé en question est illustré dans le flowchart désigné par Figure I.

Une deuxième variante de l'invention est constituée par le procédé décrit par le schéma réactionnel décrit dans la Figure II.

Ce procédé est constitué de 14 étapes successives. La présente invention est définie de façon plus détaillée dans les exemples qui suivent. Ces exemples ainsi que les schémas réactionnels sont donnés à titre illustratif de l'invention et ils ne sauraient être interprétés comme limitant la portée de la présente invention.

EXEMPLE :

L'exemple ci-dessous ne se limite pas à une seule famille des ifs. Les extraits du Pacitaxeline® peuvent être préparés à partir de *Taxus hrevifolia*, *Taxus canadensis*, *Taxus baccata*, *Taxus walichiana*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus hicksii*, *Taxus densiformis*, *Taxus gem*, *Taxus wardii*, *Taxus cuspidata*, *Taxus capitata* et *Taxus brownii*. Les écorces, les branches et les aiguilles de toutes ces espèces peuvent être utilisées comme sources d'extraction du Pacitaxeline®.

Présentement, quelques procédés d'extraction du Pacitaxeline® ont été décrits (Wani et al. J. Am. Chem. Soc. 93 (9) : 2325-2327, 1971). La méthode d'isolation de Pacitaxeline® la plus utilisée est la chromatographie sur gel de silice. L'élution de différents composants de l'extrait de Pacitaxeline® se fait par un mélange de solvants organiques; et la purification du Pacitaxeline® se fait également avec quelques étapes de cristallisation en présence d'un ou de plusieurs solvants organiques.

L'exemple ci-contre décrit la nouvelle méthode d'isolation et de purification du Pacitaxeline® à partir des aiguilles et des branches de *Taxus canadensis*.

ÉTAPE 1 :

Les aiguilles et les branches de *Taxus canadensis* sont lavées et séchées entre 20-60°C pendant 16 à 24 heures, ensuite elles sont réduites en poudre fine par le broyeur. Les poudres sont conditionnées dans des sacs en coton et bien attachés. Ces sacs sont immergés dans le méthanol pendant 24 heures entre 20-25°C. La phase organique est récupérée, un autre volume de méthanol est ajouté et l'infusion continue encore 24 heures, l'extraction peut se répéter 2 ou 3 fois. Les phases organiques sont groupées, filtrées ou centrifugées à 0-2°C, 5000 rpm pendant 30 minutes pour éliminer les particules insolubles et ensuite évaporées ou distillées sous pression réduite à une température entre 40-45°C jusqu'à l'obtention d'un liquide très épais. Ce liquide très épais est le concentré ou l'huile de Pacitaxeline®.

ÉTAPE 2 :

75 g d'huile de Pacitaxeline® sont dissous dans 300 ml de chlorure de méthylène sous agitation magnétique. L'utilisation d'un bain ultrasonique facilite la dissolution de l'huile de Pacitaxeline®. Le mélange est ensuite filtré ou centrifugé à 0-2°C, 10 000 rpm pendant 30 minutes. Le mélange est récupéré et les particules insolubles sont éliminées. Une analyse du mélange par HPLC munie d'une colonne Nova-Pak C18 (4 µm, 3,9 X 150 mm, Waters) indique la teneur du Pacitaxeline® de 3-3,5%.

ÉTAPE 3 : LAVAGE OU PARTITION

Le mélange contenant du Pacitaxeline® est transvasé dans une ampoule à décanter de 2 litres, on ajoute un volume d'eau purifiée et on agite vigoureusement pendant quelques minutes. On laisse décanter le mélange pendant 10 à 30 minutes, ensuite on ajoute 1 volume de méthanol par volume de

chlorure de méthylène pour séparer les phases. La phase aqueuse est relarguée par du chlorure de sodium pour bien séparer cette phase de la phase organique. On répète le lavage ou la partition du mélange une deuxième fois.

ÉTAPE 4 :

La phase organique est récupérée et évaporée à sec sous pression réduite à 40-45°C. L'analyse de résidu par HPLC indique la teneur en Pacitaxeline® de 10,5%.

ÉTAPE 5 : 1^{ère} PRÉCIPITATION

Le résidu sec est dissous dans 200 ml méthanol et ajouté goutte à goutte sous agitation à 20-25°C dans une solution NaOH 10-100 mM, préférablement entre 20-50 mM. Le volume du solvant par rapport au volume NaOH est de 1 pour 20, préférablement 1 pour 10. Le précipité se forme instantanément et récupéré par centrifugation à 10 000 rpm entre 2-20°C pendant 30 minutes. Poids du précipité : 36,50 g.

ÉTAPE 6 : 1^{ère} DÉCOLORATION PARTIELLE OU PERCOLORATION

Le précipité est solubilisé dans environ 150-200 ml d'acétone et le mélange est versé dans une ampoule à décanter. On ajoute 1 volume égal d'hexane et on mélange bien les deux phases, ensuite on ajoute un deuxième volume d'hexane et on continue à ajouter de l'hexane (un volume d'hexane à la fois) jusqu'à l'obtention d'une phase huileuse. Une agitation rigoureuse est nécessaire entre chaque ajout d'hexane. La phase huileuse est plus lourde que la phase d'hexane et se dépose au fond de l'ampoule à décanter. La phase huileuse est récupérée et la phase d'hexane très colorée éliminée. Une analyse de la phase huileuse par HPLC munie d'une colonne Nova-Pack C18 (4 µm, 3,9 x 150 mm, Waters) indique la teneur en Pacitaxeline® de 19-20%.

ÉTAPE 7 : 2^e DÉCOLORATION PARTIELLE OU PERCOLORATION

La phase huileuse est diluée avec de l'acétone à un volume environ 150-200 ml. On répète la même opération que l'étape précédente. La deuxième décoloration est généralement faite avec 3 volumes d'hexane. La phase huileuse est récupérée et la phase d'hexane est écartée.

ÉTAPE 8 : 2^e PRÉCIPITATION

La phase huileuse est évaporée à sec et le résidu est resolubilisé dans du méthanol à un volume final de 200 ml. On ajoute goutte à goutte le mélange dans une solution HCl 10 —100 mM sous agitation, préférablement entre 20-50 mM. Le volume du solvant par rapport au volume HCl est de 1 pour 20, préférablement 1 pour 10. Le précipité se forme instantanément et est récupéré par centrifugation à 10 000 rpm entre 2-20°C pendant 30 minutes. Poids du précipité : 17,50 g. Une analyse du précipité par HPLC munie d'une colonne Nova-Pak C18 (4 µm, 3,9 x 150 mm, Waters) indique la teneur en Pacitaxeline® de 40-50%.

Étape 9 : 1^{ère} PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

Le précipité est solubilisé avec un mélange contenant 98% CH₂Cl₂ et 2% isopropanol. Le volume du mélange utilisé est environ de 30 à 50 ml. La phase organique est filtrée ou centrifugée à 10 000 rpm, entre 0-2°C pendant 15 minutes. La phase organique est récupérée et mise en contact avec le gel de silice (32-75 µm ou 200-450 mesh), le gel est séché sous ventilation à température ambiante.

La colonne en verre d'une dimension de 30 cm de long et de 7,6 cm de diamètre intérieur est chargée du gel de silice jusqu'à une hauteur de 22 cm. Un mélange de solvant de 98% CH₂Cl₂ et 2% isopropanol est utilisé pour équilibrer le gel. Le débit constant de 50 ml/min. avec une pression de 40 psi est réglé par un système de délivrance de solvant (Dynamax, SC-I, Solvent delivery system).

Le gel contenant du Pacitaxeline® est déposé sur la surface du gel de la colonne et l'élution débute à 50 ml/min. Le volume pour chaque fraction est environ 1000 ml, et le volume de solvant utilisé est de 8000 ml. Toutes les fractions sont concentrées et analysées par HPLC, l'analyse indique la présence de Pacitaxeline® dans la fraction IV avec une teneur de 35%, 53% dans la fraction V et 39% dans la fraction VI.

ÉTAPE 10 : 1^{ère} CRISTALLISATION

Les fractions contenant du Pacitaxeline® sont groupées ensemble et évaporées à sec. Le résidu est dissous dans 10 ml acétone. Le solvant est ajouté dans 50 ml hexane, le mélange devient trouble avec l'apparition des cristaux. On laisse reposer le mélange de solvant toute la nuit à une température entre 2-8°C, la formation des cristaux continue durant la nuit. Les cristaux sont récupérés par filtration sous vide et rincés avec de l'hexane. L'analyse par HPLC indique la teneur en Pacitaxeline® de 70%.

ÉTAPE 11 : 2^e PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

Les cristaux sont dissous avec 10 à 15 ml du mélange contenant 98% CH₂Cl₂ et 2% isopropanol et mis en contact avec le gel de silice (32-75 µm ou 200-450 mesh), le gel est séché sous ventilation à température ambiante.

La colonne en verre d'une dimension de 30 cm de long et de 2,6 cm de diamètre intérieur est chargée du gel de silice jusqu'à une hauteur de 22 cm. Un mélange de solvant de 98% CH₂Cl₂ et 2% isopropanol est utilisé pour équilibrer le gel. Le débit constant de 10 ml/min. avec une pression de 40 psi est réglé par un système de délivrance de solvant (Dynamax, SD-1, Solvent delivery system).

Le gel contenant du Pacitaxeline® est déposé sur la surface du gel de la colonne et l'élution débute à 10 ml/min. Le volume pour chaque fraction est environ 120 ml, et le volume du solvant utilisé est de 1000 ml. Toutes les fractions sont concentrées et analysées par HPLC, l'analyse indique la présence de

Pacitaxeline® dans la fraction IV avec une teneur de Pacitaxeline® de 70%, 83% dans la fraction V et 82% dans la fraction VI.

ÉTAPE 12 : 2^e CRISTALLISATION

Les fractions contenant du Pacitaxeline® sont groupées ensemble et évaporées à sec. Le résidu est dissous dans 10 ml acétone. Le solvant est ajouté dans 50 ml hexane, le mélange devient trouble avec l'apparition des cristaux. On laisse reposer le mélange de solvant toute la nuit à une température entre 2-8°C, la formation des cristaux continue durant la nuit. Les cristaux sont récupérés par filtration sous vide et lavés avec un mélange de 80% hexane et 20% acétone. L'analyse par HPLC indique la teneur en Pacitaxeline® de 94-95%.

ÉTAPE 13 : 3^e PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE

Les cristaux sont dissous 10 à 12 ml du mélange contenant 98% CH₂Cl₂ et 2% isopropanol et mis en contact avec le gel de silice (32-75 µm ou 200-450 mesh), le gel est séché sous ventilation à température ambiante.

La colonne en verre d'une dimension de 30 cm de long et de 2,6 cm de diamètre intérieur est chargée du gel de silice jusqu'à une hauteur de 20 cm. Un mélange de solvant de 98% CH₂Cl₂ et 2% isopropanol est utilisé pour équilibrer le gel. Le débit constant de 10 ml/min. avec une pression de 40 psi est réglé par un système de délivrance de solvant (Dynamax, SI-1, Solvent delivery system).

Le gel contenant du Pacitaxeline® est déposé sur la surface du gel de la colonne et l'élution débute à 10 ml/min. Le volume pour chaque fraction est environ 120 ml, et le volume du solvant utilisé est de 500 ml. Toutes les fractions sont concentrées et analysées par HPLC, l'analyse indique la présence de Pacitaxeline® dans la fraction II avec une teneur de Pacitaxeline® de 90%, 95% dans la fraction III et VI.

ÉTAPE 14 : 3^e CRISTALLISATION

Les fractions contenant du Pacitaxeline® à une teneur de 95% sont groupées ensemble et évaporées à sec. Le résidu est dissous dans 10 ml acétone. Le solvant est ajouté dans 50 ml hexane, le mélange devient trouble avec l'apparition des cristaux. On laisse reposer le mélange de solvant toute la nuit à une température entre 2-8°C, la formation des cristaux continue durant la nuit. Les cristaux sont récupérés par filtration sous vide et lavés avec un mélange de 80% hexane et 20% acétone. L'analyse par HPLC indique la teneur en Pacitaxeline® de 98-99%.

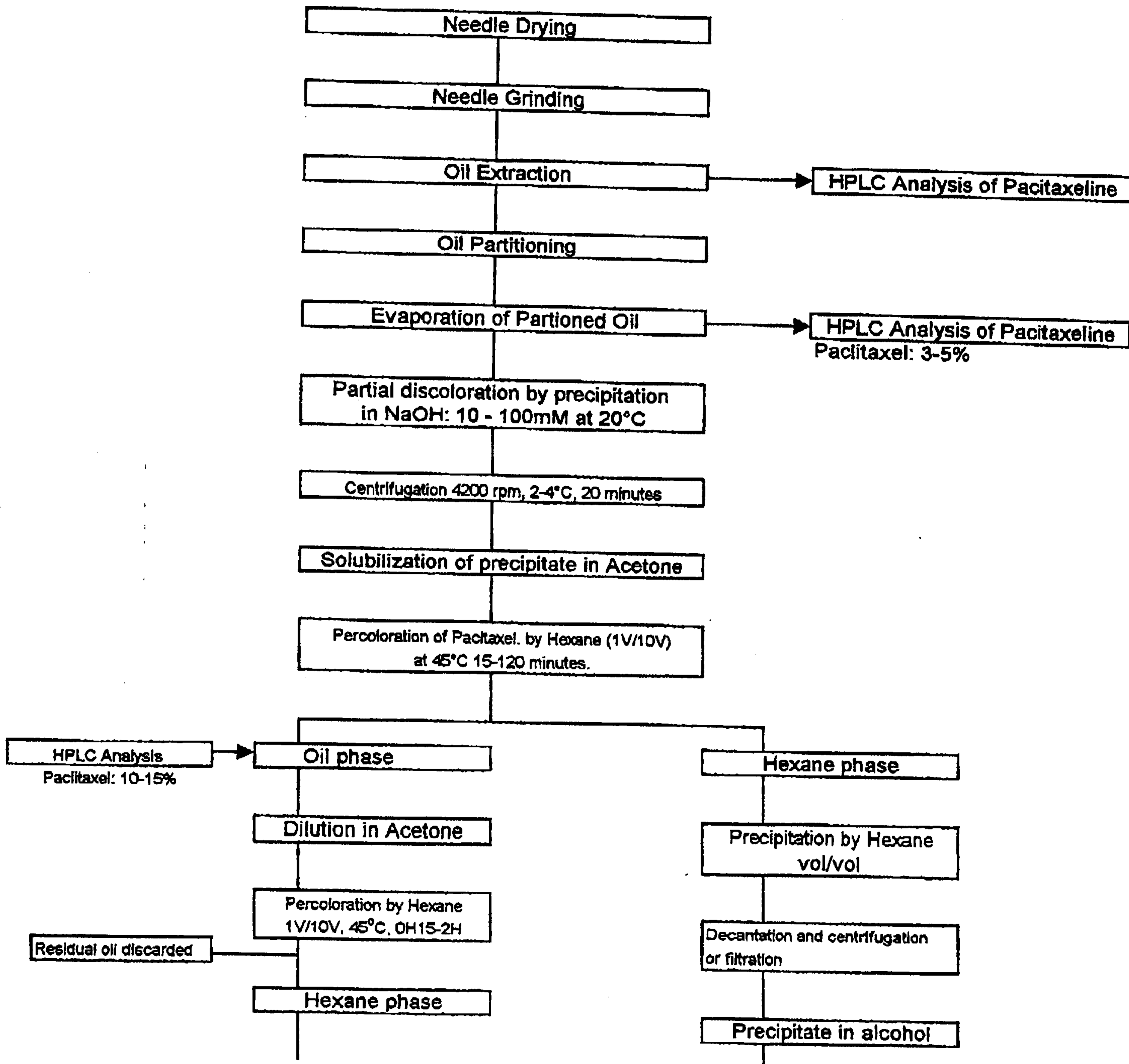
À noter le rendement très élevé obtenu, supérieur à 95% en poids de Pacitaxeline® récupéré par rapport au poids de Pacitaxeline® présent dans la source naturelle traitée.

Les procédés selon l'invention sont en outre caractérisés par le fait que les installations chromatographiques utilisées sont d'une capacité limitée du fait qu'elles sont alimentées par une solution enrichie contenant déjà des teneurs en Pacitaxeline® supérieures à 35% et de préférence comprise entre 40 et 50% en poids par rapport au poids total de la solution traitée.

FIGURE I

PACITAXELINE FLOW CHART

New version



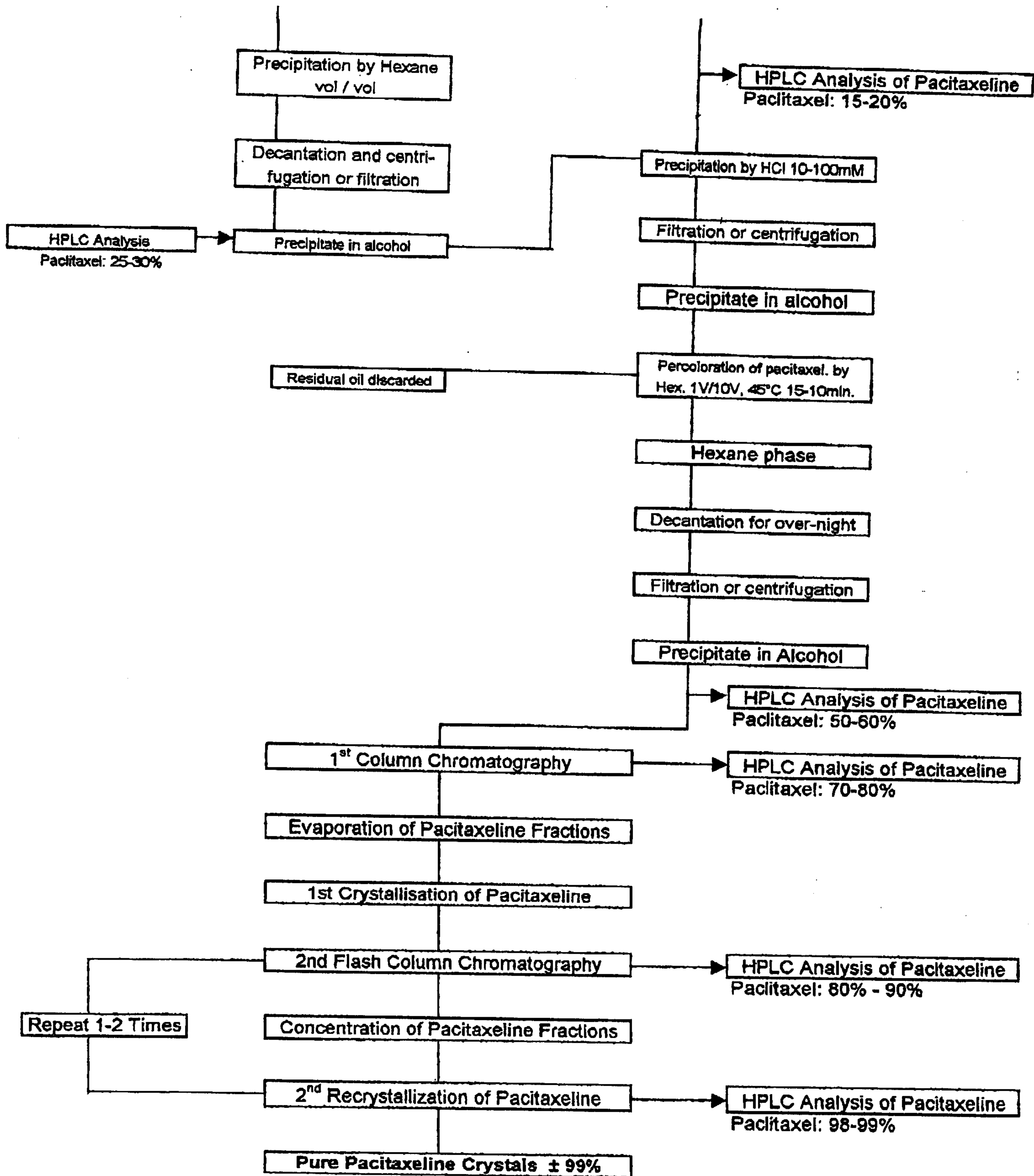
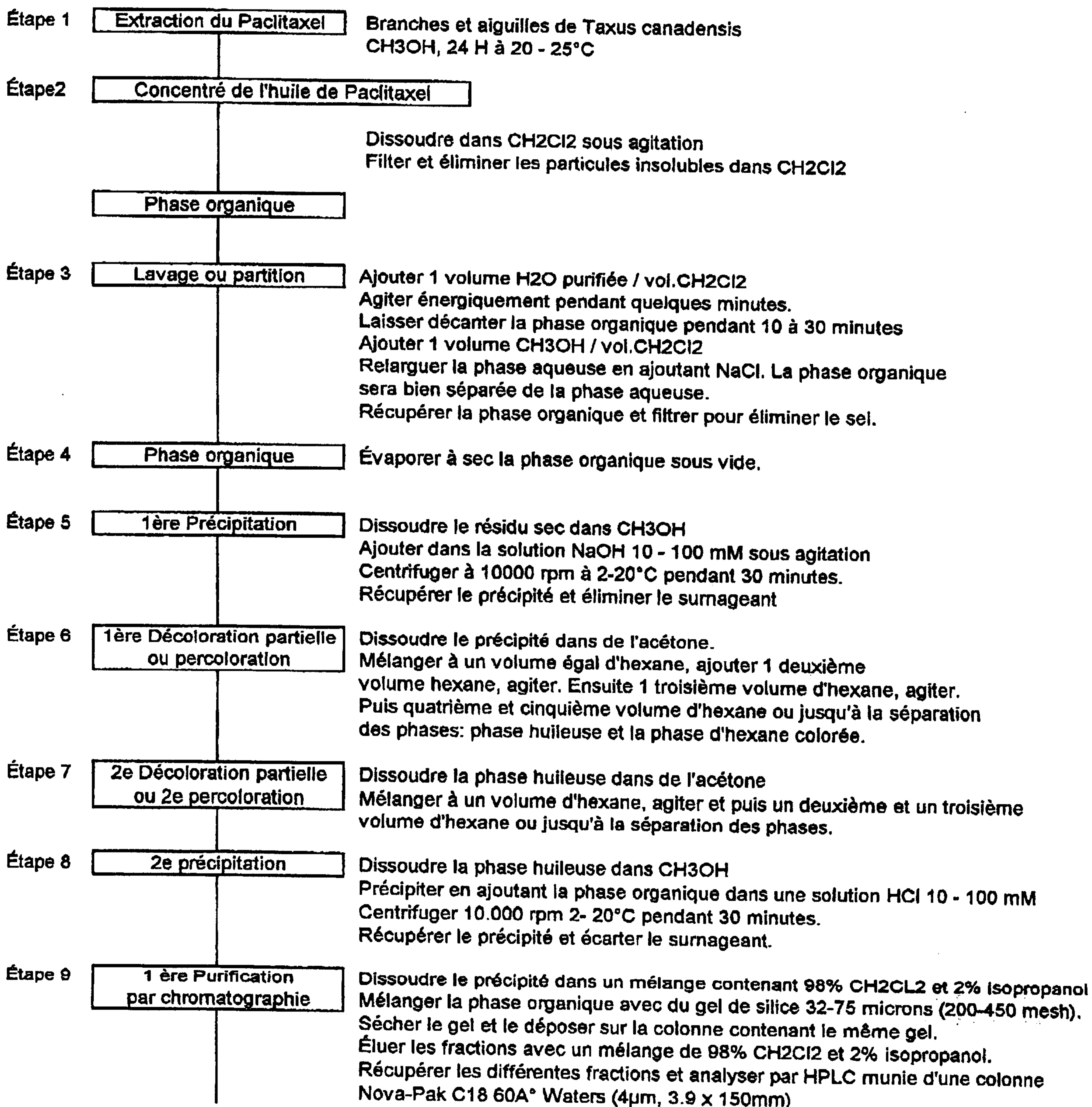
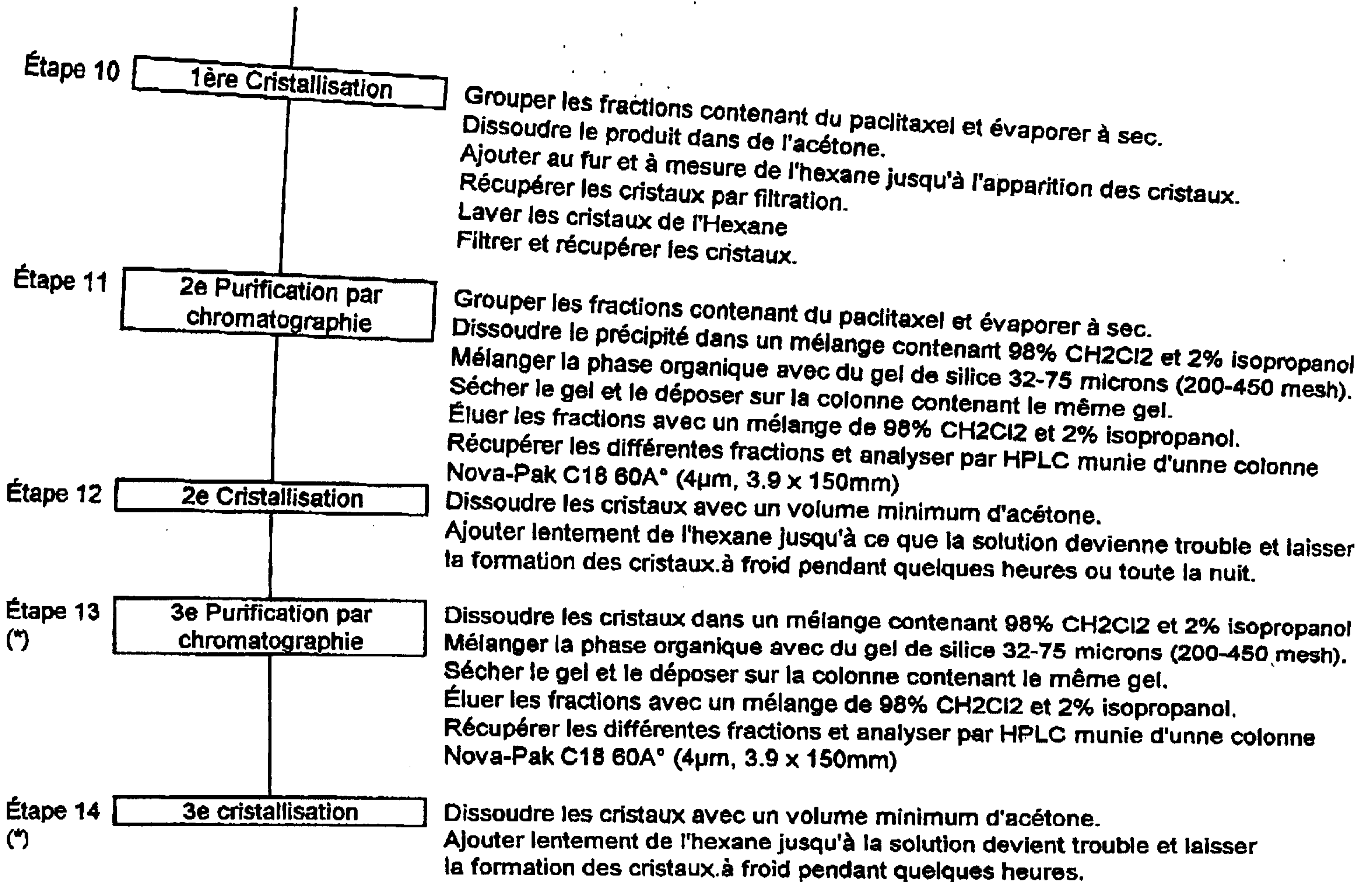


FIGURE II

Flow chart of Paclitaxel Purification





Les étapes 13 et 14 (*) sont des étapes estimées.