

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 329**

51 Int. Cl.:

**C07D 305/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2004 E 04757522 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2111397**

54 Título: **Purificación de taxanos y mezclas de taxanos usando resinas unidas por polietilenimina**

30 Prioridad:

**17.03.2003 US 455377 P**  
**21.03.2003 US 456478 P**  
**18.09.2003 US 664539**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.06.2013**

73 Titular/es:

**PHYTON HOLDINGS, LLC (100.0%)**  
**2711 Centerville Road, Suite 400**  
**Wilmington, Delaware 19808 , US**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, JAMES, H.;**  
**SAMBANDAM, T., G.;**  
**HAND, BARRY, J.;**  
**HOWE, CHRISTOPHER, D.;**  
**FRANKE, ROLAND, R.;**  
**BUCHER, BRIAN, A.;**  
**JUCHUM, JOHN, S.;**  
**GALLAGHER, REX, T.;**  
**PLANTE, MARC, A.;**  
**DESIMONE, EDWARD, M., III. y**  
**YANG, DONG, S.**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 408 329 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

### PURIFICACIÓN DE TAXANOS Y MEZCLAS DE TAXANOS USANDO RESINAS UNIDAS POR POLIETILENIMINA

#### Campo de la invención

5 [0001] La presente invención hace referencia a un proceso para separar o aislar uno o más compuestos de taxanos a partir de materiales que contienen taxanos, y a las composiciones o compuestos que resultan del mismo. La presente invención también hace referencia a un proceso para purificar un extracto de biomasa que comprende uno o más taxanos. En un modo de realización, el proceso supone usar uno o más

10 materiales que contienen amino adjuntos a una matriz (p. ej., matriz sólida), que incluye, sin carácter limitativo, resinas cromatográficas de sílice unidas por polietilenimina (resinas PBS, siglas por el inglés *Polyethyleneimine-Bonded Silica*). Estas resinas facilitan la purificación de taxanos de forma rentable y pura. En un modo de realización, la resina cromatográfica comprende un polímero de polietilenimina

15 (“PEI”) no funcionalizado y/o no derivatizado unido a sílice de varios tamaños de partícula o tamaños de poro. En otro modo de realización, la polietilenimina está desnaturalizada para formar sílice unido por dietilaminometilo (“DEAM”). En otro modo de realización alternativo de la presente invención, puede usarse tanto DEAM como PEI en cromatografía en fase normal bajo pH ácido.

20

#### Antecedentes de la invención

[0002] La presente invención conlleva aislar o separar paclitaxel u otros taxanos de materiales que contienen uno o más taxanos usando un material que contiene amino apoyado por una matriz sólida tal como resinas PBS. La presente invención también

25 conlleva purificar un extracto de biomasa que contiene taxanos.

[0003] Se sabe que varios taxanos, p. ej., paclitaxel, pueden purificarse usando técnicas cromatográficas. Se ha demostrado en la literatura que los medios cromatográficos tal como resinas de sílice unidas por alquilo, sílice, alúmina como C18 y C8, y resinas poliestireno divinilbenceno son útiles para este fin. Sin embargo,

30 dependiendo de la naturaleza del proceso de purificación, todos estos medios tienen limitaciones.

[0004] Se ha hallado que el material que contiene amino adjunto a una matriz (p. ej., resinas PBS) puede proporcionar una resolución y selectividad superior por encima de otras resinas cromatográficas convencionales usadas para aislar y purificar taxanos.

35 Por lo tanto, los materiales que contienen amino adjuntos a una matriz (p. ej., resinas

PBS) pueden utilizarse para llevar a cabo las separaciones de forma más eficaz que otras resinas en el área de la purificación de taxanos. Por ejemplo, en la literatura, la separación de paclitaxel (taxol A) y cefalomanina (taxol B) se ha descrito como un proceso difícil. La separación de estos compuestos se facilita en gran medida usando una o más resinas PBS, como aquí se describe. Además, ya que las resinas PBS pueden utilizarse usando solventes orgánicos, la resina puede cargarse más fácilmente y las muestras pueden aplicarse con una carga mayor que las resinas en fase inversa como C18, C8 y poliestireno divinilbenceno.

**[0005]** Las resinas PBS se usan principalmente en aplicaciones de cromatografía de intercambio iónico. Pocos taxanos contienen un grupo ionizable como los grupos amino o ácidos carboxílicos y por lo tanto, el modo de interacción no es intercambio iónico tradicional. Inesperadamente, el uso de resinas PBS proporciona una resolución y selectividad superior al aislar o purificar taxanos. En la presente invención, las resinas PBS funcionan mejor cuando se usan pequeñas cantidades de un modificador ácido o sal en la fase móvil.

**[0006]** Además, hemos hallado que los grupos amino del polímero PBI pueden funcionalizarse por alquilación, arilación o acilación. Hemos hallado también que la resina PBS puede usarse para llevar a cabo separaciones preparatorias y analíticas de compuestos de taxanos. Las separaciones preparatorias pueden llevarse a cabo por lotes, de forma semicontinua o continua. El tratamiento semicontinuo puede ser por medio de cromatografía de lecho móvil simulado (SMB).

**[0007]** US200301899 describe un proceso para purificar taxanos para biomasa de tejo usando una resina macropolímera no iónica. US5969165 describe un proceso para purificar taxanos empleando una resina de intercambio iónico.

**[0008]** US5281727 describe el uso de una columna de absorción de intercambio iónico para la división y recuperación de taxanos.

**[0009]** Dauch-Ruang Wu *et al.* J. Chromatography A 702, (1), 1995, 233-241 describe métodos para la purificación de taxanos usando sílice simple, sílice unido por alquilo polifluorado ramificado, sílice unido por alquilofenilo y sílice unido por pentafluorofenilo.

### **Resumen de la invención**

**[0010]** La presente invención conlleva aislar o separar paclitaxel u otros taxanos de materiales que contienen uno o más taxanos usando un material que contiene amino adjunto (p. ej., unido) a una matriz sólida, incluyendo sin carácter limitativo, una matriz de polietilenimina capaz de aislar o separar taxanos, tal como polietilenimina unido a

sílice. Otros materiales adecuados que contienen amino adjuntos a una matriz (p. ej., matriz sólida) pueden incluir esos materiales revelados en las patentes estadounidenses nº 5.085.779 y 5.092.992. Ambas patentes se incorporan aquí para referencia en su totalidad.

- 5 **[0011]** En un modo de realización alternativo, la presente invención está orientada al uso de resinas PEIS para ayudar en la separación o purificación de varios taxanos, incluyendo paclitaxel, de composiciones que contienen taxanos. Se cree que el uso de estas resinas con este fin es tanto novedoso como superior a la técnica anterior. Las resinas preferidas incluyen PEI y DEAM.
- 10 **[0012]** En un modo de realización alternativo, la presente invención indica un método para aislar uno o más taxanos y análogos del mismo, a partir de una mezcla de taxanos. La mezcla de taxanos puede incluir un extracto de biomasa o puede obtenerse a partir de procesos semisintéticos o sintéticos totales. El método comprende los siguientes pasos:
- 15 (a) tratar la mezcla de taxanos con material que contiene amino adjunto a una matriz (p. ej., resina PBS);  
 (b) eluir uno o más taxanos y sus análogos de resinas cromatográficas; y  
 (c) recuperar uno o más taxanos y sus análogos en una o más fracciones del eluato.
- 20 **[0013]** En otro modo de realización alternativo, la presente invención indica un método para purificar y/o aumentar la concentración de taxanos en un material que contiene taxanos, tal como un extracto de *Taxus*, o una mezcla de taxanos obtenidos a partir de procesos semisintéticos o sintéticos totales, derivados de material vegetal elegidos del grupo de plantas conocido como Tejo. El método comprende los
- 25 siguientes pasos:
- (a) tratar el material que comprende taxanos y sus análogos naturales con material que contiene amino adjunto a una matriz (p. ej. resina PBS);  
 (b) eluir los taxanos y sus análogos a partir de la resina cromatográfica; y  
 (c) recuperar el taxano y sus análogos en una o más fracciones del eluato.
- 30 **[0014]** La presente invención y sus ventajas se entenderán a continuación por referencia a la siguiente descripción detallada y a los dibujos adjuntos.

### **Breve descripción de los dibujos**

#### **[0015]**

- 35 La **figura 1** muestra un esquema de reacción química ejemplar usando una resina

cromatográfica de la presente invención.

La **figura 2** muestra un esquema de reacción química ejemplar usando una resina cromatográfica de la presente invención.

La **figura 3** muestra la separación de taxol A de taxol B, C y otras impurezas usando una resina PEI de la presente invención.

La **figura 4** muestra la separación de taxol A semisintético de otros subproductos de taxanos usando una resina DEAM de la presente invención.

La **figura 5** muestra moléculas no limitantes de taxanos.

La **figura 6** muestra compuestos ejemplares no limitantes (“taxanos primarios”).

Las **figuras 7-9** muestran moléculas de taxanos ejemplares no limitantes.

La **figura 10** muestra una comparación de los tiempos de retención y los estándares de taxano en varios medios.

### Descripción detallada de la invención

15 **[0016]** Tal como se usa aquí, un “grupo alcoxi” se refiere a un hidrocarburo saturado cíclico, ramificado o lineal unido a un átomo de oxígeno. Preferiblemente, un grupo alcoxi tiene entre uno y seis átomos de carbono. Un grupo alcoxi también se refiere a grupos alcoxi sustituidos, que pueden incluir sustituyentes como grupos alcanoiloxi, grupos alquenilo, grupos alquilo, grupos alquilsililo, grupos alquilosulfonilo, grupos alquilsulfoxi, grupos alquiltio, grupos alquinilo, grupos amino tal como grupos mono y dialquilamino y grupos mono y diarilamino, grupos amida, grupos arilo, grupos arilalquilo, grupos carboxi, grupos carboxialcoxi, grupos carboxiamida, grupos carboxilato, grupos haloalquilo, halógenos, grupos hidroxilo, grupos nitrilo, grupos nitro, grupos fosfato, grupos siloxi, grupos sulfato, grupos sulfonamida, grupos sulfoniloxi y combinaciones de estos. Los ejemplos preferidos de los grupos alcoxi incluyen, entre otros, metoxi, etoxi, propoxi, ciclopropoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, ciclobutoxi, pentoxi, isopentoxi, *neo*-pentoxi, ciclopentoxi, hexoxi y ciclohexoxi.

30 **[0017]** Tal como se usa aquí, un “grupo alquilo” se refiere a un hidrocarburo saturado cíclico, ramificado o lineal. Preferiblemente, un grupo alquilo tiene entre uno y seis átomos de carbono. Un grupo alquilo también se refiere a grupos alquilo sustituidos, que pueden incluir sustituyentes como grupos alcanoiloxi, grupos alquenilo, grupos alquilo, grupos alquilsililo, grupos alquilosulfonilo, grupos alquilsulfoxi, grupos alquiltio, grupos alquinilo, grupos amino tal como grupos mono y dialquilamino y grupos mono y diarilamino, grupos amida, grupos arilo, grupos arilalquilo, grupos carboxi, grupos

carboxialcoxi, grupos carboxiamida, grupos carboxilato, grupos haloalquilo, halógenos, grupos hidroxilo, grupos nitrilo, grupos nitro, grupos fosfato, grupos siloxi, grupos sulfato, grupos sulfonamida, grupos sulfoniloxi y combinaciones de estos. Los sustituyentes preferidos son grupos alcoxi, grupos amino tal como grupos dialquilamino, grupos diarilamino, grupos que contienen ácido carboxílico, grupos haloalquilo, halógenos, grupos hidroxilo, grupos nitrilo, grupos nitro y grupos ácido sulfúrico. Ejemplos de los grupos alquilo preferidos incluyen, sin carácter limitativo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, ciclobutilo, pentilo, 1-etilpropilo, ciclopentilo, hexilo y ciclohexilo.

5 **[0018]** Tal como se usa aquí, un “grupo arilo” se refiere a un grupo fenilo o grupo naftilo, que se sustituye de forma opcional. Ejemplos de sustituyentes de grupos arilo incluyen, sin carácter limitativo, grupos alcanoiloxi, grupos alquenilo, grupos alcoxi, grupos alquilsililo, grupos alquilosulfonilo, grupos alquilsulfoxi, grupos alquiltio, grupos alquinilo, grupos amino tal como grupos mono y dialquilamino y grupos mono y diarilamino, grupos amida, grupos arilo, grupos arilalquilo, grupos carboxi, grupos carboxialcoxi, grupos carboxiamida, grupos carboxilato, grupos haloalquilo, halógenos, grupos hidroxilo, grupos nitrilo, grupos nitro, grupos fosfato, grupos siloxi, grupos sulfato, grupos sulfonamida, grupos sulfoniloxi y combinaciones de estos. Los sustituyentes preferidos son los grupos alcoxi, grupos alquilo, grupos amino tal como grupos dialquilamino, grupos diarilamino, grupos que contienen ácido carboxílico, grupos haloalquilo, halógenos, grupos hidroxilo, grupos nitrilo, grupos nitro y grupos ácido de ácido sulfónico.

10 15 20

**[0019]** Tal como se usa aquí, un “grupo arilalquilo” se refiere a un grupo arilo unido a un grupo alquilo. Un ejemplo de un grupo arilalquilo es un grupo bencilo.

25 **[0020]** Tal como se usa aquí, una “estructura básica baccatina III” se refiere a un compuesto que tiene la fórmula mostrada en la **figura 6**, donde cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>13</sub> independientemente es hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo acilo, un grupo arilo, un grupo arilalquilo, un grupo vinilo, un grupo éter, un grupo éster, un grupo glucósido, un grupo oxo o un grupo hidroxilo protector. Incluido dentro de la definición de una estructura básica baccatina III se encuentra baccatina III, que tiene la fórmula que se muestra en la **figura 7**, y 10-desacetilbaccatina III, que tiene la fórmula que se muestra en la **figura 8**, donde Ac es un grupo acetilo o acetato (CH<sub>3</sub>C(O)-), y Bz es un grupo benzoilo (PhC(O)- o C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C(O)-).

30

**[0021]** Tal como se usa aquí, un “grupo éster” se refiere a un sustituyente cíclico, ramificado o lineal que tiene una funcionalidad de éster, es decir, -C(O)-OR. Ejemplos

35

de grupos éster incluyen grupos acilos tal como actilo y benzoilo, que están ligados a un grupo hidroxilo.

**[0022]** Tal como se usa aquí, un “grupo éter” se refiere a un sustituyente cíclico, ramificado o lineal que tiene una funcionalidad de éter, es decir, -C-O-C-. Un ejemplo de un grupo éter incluye, sin carácter limitativo, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC(CH<sub>2</sub>OH)H-.

**[0023]** Tal como se usa aquí, un “grupo glucósido” o un “grupo glicosil” se refiere a cualquiera de un número de derivados de azúcar que contienen un grupo no azúcar unido a un átomo de oxígeno o nitrógeno y que en hidrólisis produce un azúcar como glucosa. Un ejemplo de un grupo glucósido preferido es xilosilo.

**[0024]** Tal como se usa aquí, un “halógeno” se refiere a flúor, cloro, bromo y/o yodo.

**[0025]** Tal como se usa aquí, un “grupo heterocíclico” es un compuesto cíclico aromático, saturado o insaturado que contiene al menos un átomo que no sea carbono, p. ej., oxígeno, nitrógeno o azufre, en un anillo. Ejemplos de grupos heterocíclico incluyen furilos tal como 2-furano, morfolino, piperadino, piperazino, N-metilpiperazino, pirrolilo, piridilo y tiofeno.

**[0026]** Tal y como se usa aquí, “un grupo oxo-” se refiere a un sustituyente derivado de la oxidación de un grupo glucósido tal como xilosido como se describe en la patente estadounidense nº 5.356.928.

**[0027]** Tal como se usa aquí, “taxano o molécula de taxano” incluye una molécula que opcionalmente contiene una estructura básica baccatina III con un grupo (2R,3S)-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH(Rx)CH(OH)C(O)- que forma un éster con el grupo hidroxilo situado en la posición C-13 de la estructura básica baccatina III. El grupo representado por Rx puede ser un grupo amino, una sal de un grupo amino (p. ej., una sal amónica), un grupo amino que está protegido con un grupo amino protector, o un sustituyente que puede convertirse en un grupo amino. También se incluyen en la definición de molécula de taxano varios isómeros, homólogos y análogos de la estructura básica baccatina III y del grupo (2R,3S)-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH(Rx)CH(OH)C(O)-. También, se contempla una estructura 10-desacetilbaccatina III dentro del ámbito de una molécula de taxano. Incluido dentro de la definición de un taxano o molécula de taxano se incluyen, sin carácter limitativo, taxanos primarios, por ejemplo taxol A (paclitaxel), taxol B (cefalomanina), taxol C, taxol D, taxol E, taxol F y taxol G. Asimismo, la definición de un taxano o una molécula de taxano incluye docetaxel (TAXOTERE®). (Ver, p. ej. las figuras 5-6).

**[0028]** Tal como se usa aquí, un “grupo vinilo” se refiere a un sustituyente ramificado o lineal que tiene un enlace doble de carbono-carbono. Ejemplos de grupos vinilo

incluyen, sin carácter limitativo, 1-metilo-1-propenilo( $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-$ ) y 2-metilo-1-propenilo( $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}-$ ).

**[0029]** Tejo es un nombre atribuido a un número de árboles que pertenecen a la especie *Taxus*; donde *Taxus* es el género simple en la familia Taxaceae. Al principio se aisló de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) recogido del estado de Washington, empezando en 1962, posteriormente el taxol se presentó como ocurrente en otras dos especies *Taxus*, incluyendo *Taxus baccata* (tejo europeo) y *Taxus cuspidate* (tejo japonés), en 1971. Después de investigaciones intensas, se informó de que también tenía lugar el taxol en un número de otras especies *Taxus* y variedades cultivadas. Estas incluyen, sin carácter limitativo: *Taxus globosa* (tejo mexicano), *Taxus floridana* (tejo de Florida), *Taxus canadensis* (tejo canadiense), *Taxus wallichiana* (Tejo himalayo), *Taxus yunnanensis*, *Taxus chinensis* y también un número de híbridos ornamentales, tales como variedades cultivadas *Taxus media*, p. ej.: *T.media* 'Densiformis', *T.media* 'Hicksii', *T.media* 'Brownii', *T.media* 'Dark Green Spreader', *T.media* 'Runyan', *T.miedia* 'Wardii', *T.media* 'Tautonii', *T.euspidata* 'Capitata', etc. En la presente invención, el extracto de *Taxus* o una mezcla de reacción semisintética puede derivarse de cualquier especie *Taxus*, incluyendo sin carácter limitativo las especies y variedades cultivadas descritas anteriormente. Otras especies *Taxus* para su uso en la presente invención se identifican en: Chadwick, L.C. and Keen, R.A. mayo 1986, "A study of the Genus *Taxus*", *Res. Bull.* 1086, Ohio Agricultural Research and Development Center; Appendino, G. 1995, "The Phytochemistry of the Yew Tree": *Phytochemistry, Natural Products Reports* 12(4): 349-360; Convention On International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: Eleventh meeting of the Plants Committee, LangKawi (Malaysia), 3-7 septiembre 2001, Document PC11 DOC. 22-p.1, Estados Unidos de América; y Greer, Schutski, R.E., Fernandez, A. and Hancock, T.F. oct./dic. 1993. "Electrophoretic Characterization of *Taxus* Cultivars": *HortTechnology*, 3(4): 430-433. Cada una de estas referencias se incorpora aquí para referencia en su totalidad.

**[0030]** Se ha hallado ahora que sorprendentemente los compuestos de taxanos, incluyendo paclitaxel y análogos de paclitaxol y congéneres de los mismos pueden aislarse y purificarse de especies *Taxus* de forma provechosa por una columna de cromatografía normal en fase líquida rellena con una resina PBS. Por este método, un gran número de análogos de paclitaxel puede aislarse de extractos de biomasa naturales, y obtenerse materiales a partir de procesos semisintéticos y sintéticos totales.

**[0031]** El material inicial para esta invención puede ser un material vegetal seleccionado de entre el grupo de plantas comúnmente referidas como árboles tejo. Las plantas más adecuadas de este grupo son especies de *Taxus*. Entre las especies *Taxus*, se prefieren especialmente las variedades cultivadas *Taxus x media*. Por ejemplo, las variedades cultivadas incluyen, sin carácter limitativo, *T.media* 'Hicksii' o *T.media* 'Dark Green Spreader'. Aunque es más adecuado usar determinadas partes del tejo en esta invención, el taxol y sus análogos naturales pueden extraerse de toda la planta o de partes separadas como la madera, tallos, raíces, hojas (agujas), semillas o cualquier combinación de los mismos. El material que ha de extraerse puede ser fresco o seco. Se usan preferiblemente la corteza o las agujas. Además, el método de esta invención puede usarse para purificar taxanos a partir de células vegetales cultivadas o sobrenadantes de cultivo obtenido usando tecnología de cultivo *in vitro*. Adicionalmente, el método puede usarse para la separación y purificación de taxanos de mezclas tratadas con técnicas cromatográficas, o mezclas que no han sido tratadas con tales técnicas. El método puede también usarse para la separación y purificación de taxanos obtenidos a partir de proceimientos de semisíntesis o síntesis total.

**[0032]** En un aspecto de esta invención, un material que contiene amino adjunto a una matriz (p. ej., sílice) se usa para separar o aislar uno o más compuestos de taxanos de mezclas que contienen taxanos. Tales sustancias que han de separarse o purificarse incluyen, sin carácter limitativo, taxol A, B, C, D, E, F, G, Docetaxel, Nonataxel. Ejemplos de dichos materiales que contienen amino adjuntos a una matriz incluyen, sin carácter limitativo, resinas PBS. Estas resinas se usan normalmente en aplicaciones de intercambio iónico y por lo tanto no se esperaría que fueran útiles para separar moléculas neutrales, como los taxanos que generalmente contienen grupos no ionizables. La selectividad y resolución de la separación de las mezclas de taxanos se mejoran de forma sorprendente usando, por ejemplo, resinas PBS. Las resinas PBS, por ejemplo, se cargan más fácilmente a niveles más altos que, por ejemplo, las resinas de fase inversa como C18, C8 o poliestireno divinilbenceno. Las resinas PBS, por ejemplo, también se usan de forma provechosa con solventes orgánicos.

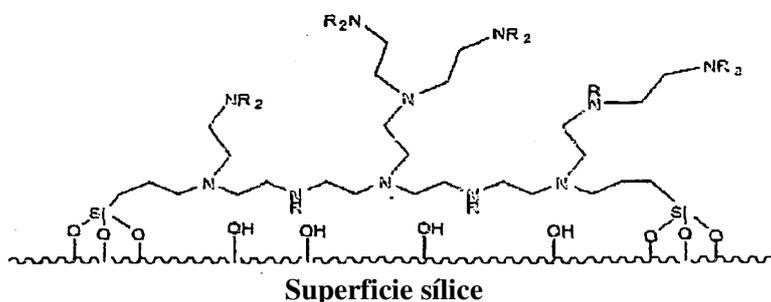
**[0033]** Las resinas PBS pueden derivarse del polímero polietilenimina unido a sílice de varios tamaños de poro y/o tamaños de partícula. El sílice tiene un tamaño de poro medio que varía de 60-300 unidades angstrom. Preferiblemente, el sílice tiene un tamaño de poro medio de aproximadamente 100 a 300 unidades angstrom, más preferiblemente aproximadamente 120 unidades angstrom. Además, el sílice puede tener un tamaño de partícula medio que varía de aproximadamente 0,25 a

aproximadamente 500 micrómetros. Preferiblemente, el sílice tiene un tamaño de partícula medio de aproximadamente 10-120 micrómetros, más preferiblemente aproximadamente de 20 a 60, más preferiblemente aún de aproximadamente 40.

**[0034]** Una resina PBS adecuada de la presente invención puede incluir DEAM. Esta resina puede comprarse de J.T. Baker, nº de registro CAS códigos de producto: 7317, 7471, 7472, 7473, bajo el nombre "BAKERBOND® DEAM Chromatography Packing". Otra resina PBS adecuada puede incluir PEI. Esta resina también puede adquirirse de J.T. Baker, nº de registro CAS: 126850-07-5, códigos de producto: 7134, 7180, 7264, 7368, 7476 y 8179, bajo el nombre de "Polyethyleneimine Bonded Silica Gel".

**[0035]** En otro modo de realización alternativo de la presente invención, el material que contiene amino adjuntas a una matriz (p. ej. resina PBS) puede no derivatizarse, como, por ejemplo, PEI. Las resinas cromatográficas de la presente invención pueden incluir, sin carácter limitativo, resinas PBS derivatizadas en las que los grupos amino primarios y/o secundarios de la fracción de polietilenimina se hacen reaccionar con la fracción reactiva. Las resinas PBS de la presente invención pueden representarse con la fórmula generalizada:

### Estructura generalizada de resinas PBS



PEI: R = H  
DEAM: R = CH<sub>3</sub>

**[0036]** La estructura anterior es solo a título ilustrativo y no limitativo. La estructura de la resina PBS puede tomar otros patrones de ramificación o comprender un único o múltiples sitios de acoplamiento a la superficie de las partículas de sílice. Además, los grupos R pueden incluir, sin carácter limitativo, un grupo H, grupo metilo, grupo acilo, grupo alquilo, grupo arilo, grupo arilalquilo, grupo sulfonilo, o cualquier combinación de los mismos.

**[0037]** Los grupos amino del polímero PEI pueden funcionalizarse por alquilación, arilación o acilación u otros medios. Funcionalizar el grupo amino puede llevar a una resina con una selectividad, resolución u otras propiedades deseadas aumentadas. Por ejemplo, DEAM es un ejemplo específico de un PEI funcionalizado.

**[0038]** Las resinas de la presente invención pueden usarse para aislar o purificar taxanos de una mezcla de taxanos, incluyendo, sin carácter limitativo, un extracto de biomasa, tal como un extracto de *Taxus*. En otro modo de realización alternativo, la presente invención puede usarse para aislar o purificar taxanos de mezclas de taxanos (p. ej., extractos de biomasa) producidos por partición, centrifugación, filtración, precipitación del solvente o cualquier combinación de los mismos. Las resinas de la presente invención también pueden usarse para aislar y/o purificar taxanos de una mezcla que contiene taxanos derivada naturalmente, en la que los taxanos no se forman a partir de un proceso sintético o semisintético. Además, las resinas de la presente invención pueden usarse para aislar o purificar taxanos de mezclas que comprenden taxanos obtenidos a partir de procesos semisintéticos o sintéticos totales.

**[0039]** Se sabe que varias formas de cromatografía como sílice, alúmina, C8, C18, poliestireno divinilbenceno y otros son útiles para purificar taxol A y otros taxanos de extractos de *Taxus*. Se puede complementar la cromatografía con otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como la partición y cristalización del solvente. Las resinas PBS pueden usarse junto con estas otras técnicas para simplificar la purificación del taxol A y otros taxanos de extractos de *Taxus*. Por ejemplo, hemos hallado que las resinas PBS pueden ser especialmente eficaces a la hora de separar taxol A de taxol B, taxanos N-metilo, cinamatos de taxanos y otros. Las resinas PBS también pueden usarse para separar un grupo relacionado de taxanos, tal como taxanos primarios (ver **figura 6**) de otros taxanos hallados en extractos de *Taxus*. Las resinas PBS pueden usarse para separar taxanos de elementos indeseables, aumentando así la concentración de taxanos en la mezcla.

**[0040]** En un modo de realización alternativo, el material inicial puede comprender un material vegetal elegido de entre el grupo de entre el grupo de plantas comúnmente referidas como Tejo. Las plantas más adecuadas de este grupo son las especies *Taxus*. El material inicial para su uso en la presente invención puede incluir, sin carácter limitativo: (1) cualquier material que comprende uno o más taxanos preparados a partir de procedimientos que no sean procedimientos de semisíntesis o síntesis total; (2) cualquier material que comprende uno o más taxanos preparados a partir de cromatografía; (3) cualquier material que comprende uno o más taxanos no preparados a partir de cromatografía; (4) cualquier material que comprende uno o más taxanos preparados por partición, centrifugación, filtración, precipitación de solvente o cualquier combinación de los mismos; (5) cualquier material que comprende uno o más taxanos a partir de plantas *Taxus*; (6) cualquier material que comprende uno o

más taxanos a partir de una o más plantas *Taxus* en el que los taxanos no se derivan únicamente de *Taxus brevifolia*. El material inicial puede incluir cualquier material que comprende uno o más taxanos preparados por cualquier combinación de los parámetros mencionados anteriormente. Los métodos para preparar materiales que  
5 contienen taxanos (p. ej., extractos de biomasa o mezclas de reacción semisintéticas o sintéticas totales) se conocen en la técnica.

**[0041]** En otro modo de realización alternativo, la presente invención indica un método para aislar uno o más taxanos a partir de una mezcla que contiene taxanos, método que comprende los siguientes pasos: (a) tratar la mezcla con una resina PBS;  
10 en el que uno o más taxanos se derivan de una o más plantas *Taxus*, donde ese uno o más taxanos no se derivan únicamente de *Taxus brevifolia*; (b) eluir ese uno o más taxanos de la resina PBS con un eluyente; y (c) recuperar ese uno o más taxanos eluidos.

**[0042]** En otro modo de realización, la presente invención indica un método para  
15 aislar uno o más taxanos de una mezcla que contiene taxanos, método que comprende los siguientes pasos: (a) tratar la mezcla con una resina PBS; donde la mezcla comprende menos de un 25 % o mayor de 40 % por peso de taxanos primarios; (b) eluir ese uno o más taxanos de la resina PBS; y (c) recuperar ese uno o más taxanos eluidos.

**[0043]** En otro modo de realización, la presente invención indica un método para  
20 aislar uno o más taxanos, método que comprende los siguientes pasos: (a) tratar una mezcla que contiene taxanos con una resina PBS; donde la mezcla comprende entre aproximadamente un 25 % a 40 % por peso de taxanos primarios; donde uno o más taxanos no se derivan únicamente de *Taxus brevifolia*; (b) eluir ese uno o más taxanos  
25 de la resina PBS; y (c) recuperar ese uno o más taxanos eluidos.

**[0044]** En un modo de realización alternativo de la presente invención, el material inicial puede comprender menos de aproximadamente 25 % o más de aproximadamente 40 % por peso de taxanos primarios, incluyendo, sin carácter limitativo, taxol A, B, C, D, E, F o G. Los materiales restantes en el extracto pueden  
30 comprender otros compuestos, incluyendo, sin carácter limitativo, impurezas. Otras cantidades adecuadas de taxanos primarios en el material inicial pueden incluir desde aproximadamente 0,5 % a 1 %; 1 % a 10 %; 10 % a 15 %; 15 % a 20 %; 20 % a 25 %, 25 % a 30 % o 30 % a 35 %, o 35 % a 40 %. Otras cantidades pueden también incluir  
35 o 90 % a 100 %.

[0045] En otro modo de realización alternativo, el extracto de biomasa se deriva de una planta *Taxus*. En otro modo de realización alternativo más, el extracto de biomasa se deriva de cualquier planta *Taxus*, excluyendo *Taxus brevifolia*. En otro modo de realización alternativo más, el extracto de biomasa se deriva de cualquier planta *Taxus*, excluyendo *Taxus brevifolia* y comprende de aproximadamente 25 % a aproximadamente 40 % por peso de taxanos primarios, incluyendo, sin carácter limitativo, taxol A, B, C, D, E, F o G.

[0046] En otro modo de realización, la presente invención indica un método para purificar uno o más compuestos de taxanos a partir de un extracto de biomasa, donde el extracto de biomasa se deriva de una o más plantas *Taxus*. En un modo de realización, el extracto de biomasa es de una o más plantas *Taxus*, excluyendo *Taxus brevifolia*. En otro modo de realización, el extracto de biomasa comprende menos de un 25 % o mayor de 40 % por peso de taxanos primarios. En otro modo de realización más, el extracto de biomasa comprende de aproximadamente 25 % a aproximadamente 40 %, taxanos primarios, donde el extracto de biomasa se deriva de una o más plantas *Taxus*, excluyendo *Taxus brevifolia*.

[0047] Además, en un modo de realización alternativo, el extracto de biomasa puede comprender alcohol isobutílico en una cantidad menor que aproximadamente 50 %, 40 %, 30 % o 20 %, preferiblemente menor de 10 %, más preferiblemente menor de 5 %, más preferiblemente aún menor de 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,25 %.

[0048] El proceso de la presente invención puede aumentar la pureza del extracto de biomasa aproximadamente un 10 % a 20 %; 20 % a 30 %; 30 % a 40 %; 40 % a 50 %; 50 % a 60 %; 60 % a 70 %; 70 % a 80 %; 80 % a 90 %; 90 % a 100 %; 100 % a 110 %; 110 % a 120 %; 120 % a 130 %; 130 % a 140 %; 140 % a 150 %; 150 % a 200 %; 200 % a 250 %; 250 % a 300 %; 300 % a 350 %; 350 % a 400 %; 400 % a 450 %; 450 % a 500 %; 500 % a 550 %; 550 % a 600 %; 600 % a 650 %; 650 % a 700 %; 700 % a 750 %; 750 % a 800 %; 800 % a 850 %; 850 % a 900 %; 900 % a 950 %; 950 % a 1000 %. Tal como se usa aquí, el término pureza significa porcentaje en peso de uno o más compuestos de taxanos presentes en una forma seca del material o extracto de biomasa.

[0049] La resina de la presente invención puede usarse para purificar uno o más taxanos de una mezcla de taxanos obtenida, entera o en parte, a partir de un proceso semisintético o sintético total. En un modo de realización alternativo, la resina de la presente invención puede usarse para purificar taxol A semisintético u otros taxanos semisintéticos de una mezcla de reacción cruda. Ya que la mayoría de las reacciones

5 sintéticas generan subproductos o materiales iniciales sin reaccionar que en muchos casos están bastante relacionados estructuralmente con el producto deseado, el proceso de purificar estos productos es muy importante. Por ejemplo, se ha mostrado que las resinas PBS aumentan y amplifican la purificación de taxol A semisintético producido a partir de procesos aquí descritos de muchas impurezas relacionadas y compuestos relacionados estructuralmente como se muestra en la figura 10, por ejemplo.

10 **[0050]** En un modo de realización alternativo, la presente invención conlleva purificar uno o más compuestos de taxanos de materiales preparados a partir de procesos de semisíntesis o de síntesis total. Las figuras 1 y 2 muestran a título indicativo y no limitativo un proceso de semisíntesis utilizando las resinas de la presente invención. Los procesos se describen en el nº de serie de solicitud PCT/US03/10556 titulada “Conversion of Taxane Molecules” y el nº de serie de solicitud PCT/US03/24666 “Methods and Compositions for Converting Taxane Amides to Paclitaxel or Other  
15 Taxanes” presentada el 4 de agosto, 2003. Cada una de las solicitudes anteriormente mencionadas se incorpora aquí para referencia en su totalidad.

20 **[0051]** En un modo de realización alternativo, tales materiales comprenden menos de aproximadamente 10 % por peso de benzoilo C-2' de taxanos primarios, preferiblemente menos de aproximadamente 5 %, más preferiblemente menos de aproximadamente 3 %, más preferiblemente menos de aproximadamente 1 %. En otro modo de realización alternativo, los materiales que contienen taxanos comprenden menos de aproximadamente 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o 0,01 %. Las impurezas de taxanos incluyen, sin carácter limitativo, los benzoatos C-2' de taxol A, B, C, D, E, F o G. Las impurezas de taxanos pueden también incluir menos de  
25 aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0,5 % de los benzoatos C-2' de taxol B, C, D, E, F o G. Tal como se usa aquí, el término porcentaje en peso hace referencia al porcentaje de uno o más compuestos presentes en una forma sólida seca de tal material.

30 **[0052]** En otro modo de realización alternativo, la presente invención indica un método para aislar uno o más taxanos de material que comprende compuestos de taxanos obtenidos a partir de un proceso de semisíntesis o síntesis total, método que comprende los siguientes pasos: (a) tratar el material con una resina PBS; donde las moléculas usadas como reactivos en el proceso semisintético o sintético total no se derivan únicamente de *Taxus brevifolia*; (b) eluir ese uno o más taxanos de la resina  
35 PBS; y (c) recuperar ese uno o más taxanos eluidos.

**[0053]** En otro modo de realización, la presente invención indica un método para aislar uno o más taxanos de material que comprende compuestos de taxanos obtenido a partir de un proceso de semisíntesis o síntesis total: (a) tratar el material con una resina PBS; donde el material comprende menos de aproximadamente de 8 % a 3 % por peso de 2' benzoatos de taxol A, B, C, D, E, F o G, combinados; (b) eluir ese uno o más taxanos; y (c) recuperar ese uno o más taxanos eluidos. En otro modo de realización, la presente invención indica un método para aislar uno o más taxanos de material que comprende compuestos de taxanos obtenidos a partir de un proceso que excluye el paso de introducir un grupo benzoilato en el grupo hidroxilo C-2' de las moléculas de taxanos.

**[0054]** En otro modo de realización, la presente invención indica un método para aislar uno o más taxanos de material que comprende compuestos de taxanos a partir de un proceso de semisíntesis o síntesis total, método que comprende los siguientes pasos: (a) tratar el material con una resina PBS; donde el material comprende menos de 0,5 % por peso de 2' benzoatos de taxol B, C, D, E, F o G, combinados; (b) eluir ese uno o más taxanos; y (c) recuperar ese uno o más taxanos eluidos.

**[0055]** En otro modo de realización alternativo, la presente invención indica un método para preparar una mezcla de taxanos. El método comprende los pasos de tratar un material que comprende uno o más taxanos obtenidos por un proceso semisintético o sintético total con una resina PBS. Los taxanos u otros compuestos usados en el proceso semisintético se derivan de una o más plantas *Taxus*, o una o más plantas *Taxus* excluyendo *Taxus brevifolia*. En otro modo de realización, el material que contiene taxanos comprende menos del 3 % por peso de 2' benzoatos de taxol A, B, C, D, E, F o G. En otro modo de realización, el material que contiene taxanos comprende menos del 0,5 % de benzoatos C-2' de taxol A, B, C, D, E, F o G.

**[0056]** En otro modo de realización alternativo, los materiales que han de procesarse por la presente invención pueden comprender anhídrido benzoico, ácido benzoico y cloruro de benzoílo, preferiblemente en cantidades menores del 10 %, preferiblemente menor que 5 %, más preferiblemente menor que 1 % y más preferiblemente aún menor que 0,3 %.

**[0057]** Con respecto a los materiales obtenidos a partir de procedimientos de semisíntesis o síntesis total, cuando estos materiales se procesan mediante la presente invención, el(los) producto(s) deseado(s) que resultan de la misma pueden tener una pureza de al menos un 70 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 90 %, más preferiblemente

aún al menos aproximadamente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

**[0058]** En otro modo de realización alternativo, el material que ha de procesarse por medio de la presente invención puede comprender impurezas de taxanos que tienen un peso molecular de aproximadamente 1104 y/o un anillo de oxetano abierto con taxanos que tiene un peso molecular de aproximadamente 871, entre otros.

**[0059]** El proceso de la presente invención puede aumentar la pureza de un taxano concreto en el material aproximadamente un 10 % a 20 %; 20 %, a 30 %; 30 % a 40 %; 40 % a 50 %; 50 % a 60 %; 60 % a 70 %; 70 % a 80 %; 80 % a 90 %; 90 % a 100 %; 100 % a 110 %; 110 % a 120 %; 120 % a 130 %; 130 % a 140 %; 140 % a 150 %; 150 % a 200 %; 200 % a 250 %; 250 % a 300 %; 300 % a 350 %; 350 % a 400 %; 400 % a 450 %; 450 % a 500 %; 500 % a 550 %; 550 % a 600 %; 600 % a 650 %; 650 % a 700 %; 700 % a 750 %; 750 % a 800 %; 800 % a 850 %; 850 % a 900 %; 900 % a 950 %; 950 % a 1000 %. Tal como se usa aquí, el término pureza significa porcentaje en peso de uno o más compuestos de taxanos presentes en una forma seca del material.

**[0060]** Un modo de realización de la presente invención conlleva una separación preparativa a escala de compuestos de taxanos, incluyendo paclitaxel, usando una resina PBS. Una separación preparativa puede llevarse a cabo por lotes, de forma semicontinua o continua. Los modos semicontinuo y continuo pueden ser por medio de cromatografía de lecho móvil simulado (SMB).

**[0061]** En otro modo de realización, la presente invención incluye el uso de resinas PBS para realizar una separación por cromatografía líquida. En dicho modo de realización, se usa una pequeña cantidad de un modificador de sal o ácido en la fase móvil de la separación cromatográfica líquida. Los modificadores de sal o ácido usados en la fase móvil pueden incluir, sin carácter limitativo, ácido acético, ácido fórmico, acetato de amonio o formiato de amonio.

**[0062]** Las resinas PBS pueden operar en forma de fase normal y presentar una selectividad única para taxanos. Para tipos estándar de cromatografía, tanto en C-18 como en sílice, otros taxanos pueden eluir antes y después de paclitaxel. En cromatografía de fase normal en resinas PBS, la mayoría de taxanos similares estructuralmente eluyen antes del paclitaxel permitiendo simplicidad en las separaciones preparativas. De los taxanos más comunes, 10-desacetiltaxol eluye después de paclitaxel en resinas PBS. Fortuitamente, la retención de tiempo tan prolongada de 10-desacetiltaxol permite una fácil separación en sistemas preparativos. Esto es importante porque 10-desacetiltaxol puede ser un subproducto significativo en

preparaciones semisintéticas y también se encuentra comúnmente en extractos naturales de *Taxus* spp.

**[0063]** La figura 10 muestra una comparación de los tiempos de retención y los estándares de taxano en varios medios. En la figura 10, la nota 1 representa Phenomenez™ Synergi™ Hydro-RP, 4 mm (250 x 4,6 mm) columna HPLC: elución por gradiente acetonitrilo/agua (40 % a 60 % ACN durante 45 minutos) a 1,5 ml/min. La nota 2 representa Amicon Si-100-10sp (250 x 46 mm) columna HPLC: elución isocrática, 60 % acetato de etilo/40 % hexanos y 1,0 ml/min. La nota 3 representa J.T. Baker® Wide-Pore PEI, 5 micrómetros (250 x 4,6 mm) columna HPCC: elución isocrática, 80 % acetato de etilo/20 % hexanos (con 0,5 % ácido acético) a 1,0 ml/min. La nota 4 representa J.T. Baker® Wide Pore DEAM, 5 micrómetros (250 x 4,6 mm) columna HPCC: elución isocrática, acetato de etilo (con 0,5 % ácido acético) a 1,0 ml/min. La nota 5 representa los tiempos de retención de una única inyección de una mezcla de estándares de taxano. La nota 6 representa los tiempos de retención relativos a paclitaxel. La nota 7 representa los tiempos en una media de tres inyecciones de un único estándar de taxano.

**[0064]** Las resinas unidas por PET presentan una selectividad similar para taxanos, pero algunos taxanos aún eluyen en proximidad cercana a paclitaxel (p. ej., 10-desacetil-7-*epi*-taxol, ver **figura 10**). Las formas modificadas químicamente de PEI, tal como DEAM, mantienen el mismo patrón de selectividad y muestran una mayor separación de paclitaxel de sus taxanos eluyentes más cercanos.

**[0065]** Las resinas PBS tienen una alta afinidad por los taxanos. Como se ve en la **figura 10**, una mezcla: de aproximadamente 60 % de acetato etilo y aproximadamente 40 % hexanos es suficiente para eluir paclitaxel en un tiempo razonable del sílice. En algunas situaciones, PEI requiere una mezcla más fuerte de solventes: p. ej., aproximadamente 79,75 % acetato de etilo, 19,75 % hexanos y 0,5 % ácido acético. La afinidad de DEAM por paclitaxel era más fuerte que la de PEI, lo que requería una mezcla de aproximadamente 99,5 % acetato de etilo y aproximadamente 0,5 % ácido acético como su fase móvil. Los sistemas de solvente más fuertes usados con PEI y DEAM disuelven taxanos en mayor medida permitiendo así una mayor carga.

**[0066]** En algunas variaciones, las resinas de sílice unidas por polietilenimina se usan para separar varios taxanos, incluyendo paclitaxel, de mezclas de taxanos, tal como extractos de *Taxus*, o mezclas de reacción de taxanos semisintéticas o sintéticas totales. Las composiciones y los métodos adecuados para producir mezclas de taxanos semisintéticas que comprendan paclitaxel se describieron en la solicitud con nº

de serie 60/401.191 (la solicitud '191), presentada el 4 de agosto, 2002; PCT/US03/10557, presentada el 5 de abril, 2003; la solicitud provisional titulada "Method and Compositions for Preparing a Pharmaceutical Compound (e.g., Paclitaxel or other Taxanes) Using a Benzoylating Agent Essentially Free of Ring Chlorination", la  
5 solicitud estadounidense con nº de serie 60/444.847 presentada el 4 de febrero, 2003. Cada una de estas solicitudes se incorpora aquí para referencia en su totalidad.

**[0067]** En un modo de realización alternativo, el proceso de la presente invención comprende uno o más de los siguientes pasos: (i) rellenar una columna con toda la cantidad necesaria de resinas PBS; (ii) equilibrar la columna con un solvente orgánico,  
10 preferiblemente acetona que contenga ácido acético; (iii) cargar una mezcla de extracto de *Taxus* o una mezcla de reacción semisintética o sintética total en la columna; (iv) eluir la mezcla con un solvente orgánico, preferiblemente acetona/ácido acético; (v) recoger el eluato en una o más fracciones; (iv) confirmar la presencia del taxano deseado en esa una o más fracciones; y (iv) purificar el taxano deseado por  
15 cristalización.

**[0068]** De acuerdo con un modo de realización alternativo, el material que contiene taxanos está sujeto a una cromatografía líquida de fase normal ("NPLC") con el fin de purificar el taxol y otros taxanos contenidos en un extracto crudo o semipurificado. Se examinan normalmente varias variables para conseguir la separación y purificación por  
20 cromatografía líquida, incluyendo el relleno de columna (p. ej., fase estacionaria o absorbente), composición de un eluyente (p. ej., fase móvil), dimensión de la columna y caudal del eluyente. Estas variables son conocidas por aquellos expertos en la técnica y pueden determinarse fácilmente sin excesiva experimentación.

**[0069]** Las dimensiones de la columna cromatográfica, así como la temperatura, el  
25 caudal y el tiempo de separaciones cromatográficas no son fundamentales en la práctica de esta invención, y se basan principalmente en los requisitos para una cromatografía eficaz que son conocidos por los expertos en la técnica y pueden determinarse fácilmente sin excesiva experimentación.

**[0070]** En un modo de realización alternativo, la purificación cromatográfica de  
30 paclitaxel semisintético puede efectuarse en la resina DEAM (20 µm esférica, 100 Å) usando acetato de etilo con 0,5 % ácido acético como la fase móvil. El progreso de la separación puede controlarse por absorbancia UV a una longitud de onda absorbente adecuada, preferiblemente 254 nm y 280 nm. El pico de paclitaxel se recoge en fracciones. La porción ascendente (desde el punto de referencia hasta el vértice) del  
35 pico puede recogerse en varias fracciones, normalmente 2 o 3. Lo primero de estas

fracciones contendrá la mayor parte de las impurezas de 7-epi-taxol y 10-desacetil-7-epi-taxol. La parte restante del pico puede recogerse en una o más fracciones. Puede emplearse un gradiente escalonado de una mezcla 50:50 de metanol y acetato de etilo con 0,5 % de ácido acético para eluir 10-desacetiltaxol de la columna.

5 **[0071]** En un modo de realización alternativo, se prefiere una elución con gradiente escalonado de las impurezas restantes en lugar de usar un gradiente lineal para brevedad y facilidad de operación. Se necesita un equipo más complejo para hacer uso de un gradiente lineal. Una elución con gradiente escalonado, usando un sistema de solventes premezclado, puede conseguirse cambiando una única válvula que  
10 suministra la fase móvil a la bomba. En otro modo de realización, se prefiere retrasar la introducción de metanol en el sistema de la fase móvil porque pequeñas cantidades de metanol aceleran la elución de una impureza eluyente tardía, tal como 2-debenzoiltaxal, por ejemplo.

**[0072]** En un modo de realización alternativo, los sistemas de cromatografía líquida  
15 de la presente invención se usan preferiblemente en un modo preparativo (mayor que cantidades de 100 mg). Las columnas preparativas se mueven trazando un arco normalmente de 7 mm a 300 mm en diámetro y 10 cm a 100 cm en longitud. Aquellos expertos en la técnica de la cromatografía pueden seleccionar fácilmente una columna con unas dimensiones de lecho adecuadas a las cantidades de material que se  
20 purifica. Los caudales de la fase móvil se ajustan de acuerdo a varios factores incluyendo las dimensiones de la columna, el tamaño de la partícula y el tamaño del poro de la resina, y la resolución del pico deseada. Los caudales típicos para columnas preparativas pueden varían de entre 10 ml/minuto a 41/minuto.

**[0073]** Los tiempos requeridos para las secuencias cromatográficas varían entre  
25 aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 horas. Las temperaturas para separación cromatográfica son normalmente a temperatura ambiente, aunque pueden usarse temperaturas ligeramente más altas.

**[0074]** Cuando se realiza la separación cromatográfica de acuerdo con la presente  
invención, la columna puede hacerse funcionar en los modos de baja presión (LPLC) a  
30 media presión (MPLC), normalmente 10 a 500 psig. También puede realizarse en el modo alta presión (HPLC), normalmente 500 a 2000 psig.

**[0075]** En otro modo de realización, la mezcla del extracto de *Taxus* o la mezcla de  
reacción sintética total puede disolverse antes de la carga en la columna. Por ejemplo,  
la mezcla puede disolverse usando un solvente orgánico o por otros medios conocidos  
35 por aquellos que tienen las habilidades usuales en la técnica. Una mezcla de solvente

orgánico preferida comprende acetona/ácido acético. A continuación, puede cargarse la mezcla disuelta en la columna rellena con una cantidad adecuada de resina PBS.

**[0076]** Los solventes (eluyentes) útiles en esta invención pueden elegirse por referencia a las prácticas estándar de cromatografía. Normalmente, puede usarse  
5 como eluyente un solvente orgánico moderadamente polar como acetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano o acetonitrilo. También pueden usarse otras cetonas, éteres y ésteres que contengan 1-5 carbonos. Los modificadores al eluyente pueden incluir solventes más polares como alcoholes más bajos, ácido acético y agua si la mezcla contiene taxanos más polares, así como solventes orgánicos menos polares como  
10 alcanos o hidrocarburos halogenados si la mezcla contiene taxanos menos polares. Los porcentajes de los modificadores pueden ser 0-100 % dependiendo de la naturaleza de la mezcla que se purifica. Este porcentaje lo pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica.

**[0077]** En otro modo de realización, la mezcla de extracto de *Taxus* o la mezcla de  
15 reacción cruda puede disolverse en un solvente orgánico que comprende acetato de etilo/THF para formar una solución de taxanos. La solución de taxanos puede mezclarse con calentamiento suave, y después filtrarse al vacío para eliminar las impurezas y los restos de la misma.

**[0078]** La solución de taxanos cruda puede también diluirse en un solvente orgánico,  
20 preferiblemente una solución acetato de etilo/THF. La solución puede inyectarse y/o cargarse en una columna que contiene una cantidad adecuada de resina PBS. De antemano, la columna puede equilibrarse con un solvente orgánico, preferiblemente acetato de etilo/ácido acético. Después de que se inyecte/cargue la solución de taxanos en la columna, puede inyectarse acetato de etilo en la columna. El material  
25 eluido puede recogerse en múltiples fracciones. Puede usarse un gradiente escalonado que comprende un solvente mezclador de metanol/acetato de etilo. El taxano deseado se eluye de la columna, y después se recoge en una o más fracciones. Puede emplearse un paso de lavado.

**[0079]** En algunos casos, puede ser ventajoso emplear un sistema de solvente  
30 gradiente, ya sea de gradiente escalonado o gradiente continuo. Los límites de concentración de los gradientes se determinan por: (1) la concentración de solvente orgánico necesario para eluir taxanos del absorbente; y (2) la necesidad de que el solvente orgánico sea completamente miscible y exista en una única fase con la concentración necesaria para eluir los taxanos. Por ejemplo, inicialmente puede  
35 usarse un 100 % de acetato de etilo, y cambiar después a 1-10 % de metanol en un

paso único, múltiples pasos o con un gradiente continuo. Este sistema puede ser necesario para separar varios taxanos que se distinguen prácticamente en polaridad y determinan fácilmente aquellos expertos en la técnica.

**[0080]** La presencia de un taxano deseado en una o más fracciones puede detectarse usando técnicas analíticas conocidas en la técnica tal como cromatografía en capa fina (CCF), espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), HPLC de fase reversa y espectrometría de masas.

**[0081]** Después de que el(los) taxano(s) deseado(s) se recoja(n) de la columna, se puede además purificar usando otros métodos cromatográficos o cristalización y/o una o más recristalizaciones, dependiendo de la pureza deseada en el producto final de la molécula de taxanos o la mezcla de taxanos. La cristalización y recristalización puede llevarse a cabo usando un sistema de solventes binario o ternario, es decir, al menos un solvente solubilizante y al menos un antisolvente. Ejemplos de solventes solubilizantes incluyen, entre otros, acetona, metil tert-butil éter, cloruro de metileno, THF, metanol, etanol, alcohol isopropílico y acetonitrilo. Ejemplos de antisolventes incluyen solventes hidrocarburos como hexano y heptano, así como agua. En la mayoría de los casos, el solvente solubilizante y el antisolvente son miscibles en las relaciones usadas. Ejemplos de sistemas de solventes útiles con moléculas de taxanos incluyen, entre otros, acetona/hexano y metanol/agua.

**[0082]** Las **figuras 1** y **2** muestran un esquema de reacción ejemplar usando una resina PBS (p. ej., "DEAM") de la presente invención. Concretamente, muestra un proceso semisintético para convertir una amida de taxanos a paclitaxel u otros taxanos y purificar el taxano del producto de reacción usando una resina PBS. Los métodos para convertir una amida de taxanos a paclitaxel u otros taxanos se muestran en las aplicaciones de la patente mencionadas aquí anteriormente.

**[0083]** Tras haber descrito técnicas cromatográficas específicas y las condiciones adecuadas para esta invención, se describe a continuación un modo de realización preferido del aislamiento, separación y purificación de los derivados de taxanos de acuerdo con esta invención.

### **Ejemplos**

**[0084]** Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención con cualquier paso o ingrediente en concreto, por ejemplo

**Ejemplo 1**

[0085] Este ejemplo muestra el uso de la resina PEI en la purificación de taxol A (Paclitaxel) y taxol B (Cefalomanina) de un extracto semipurificado de *Taxus media* Densiformis. Aquí, se rellenó una columna de 75 litros con 24,5 kg de la resina PEI J.T. Baker (40 micrómetros de tamaño de partícula, 275 angstrom de tamaño de poro, J.T. Baker artículo #7264). La resina se equilibró con 2 volúmenes de columna, 150 litros de acetona que contenía 0,5 % de ácido acético con un caudal de 3,2 litros/min. A continuación, el extracto de *Taxus* semipurificado suministrado se cargó a la columna con una concentración de aproximadamente 250 mg/ml en acetona y a una velocidad de 0,5 litros/min. La concentración de taxol era 2,5 % en peso o 2,5 gramos de sólido suministrado por 100 gramos de resina PEI. El porcentaje en peso de taxol A y taxol B en el sólido suministrado era 10,8 % en peso. El suministro se eluyó con acetona que contenía 0,5 % ácido acético con un caudal de 3,2 litros/min (velocidad superficial = 4,4 cm/min). Se recogieron un total de 10 fracciones. La fracción 1 y la fracción 10 eran 75 litros cada una (1 volumen de columna) y las fracciones 2-9 eran 19 cada una (1/4 de volumen de columna). Las fracciones 2-5 del producto contenían un 87,96 % del total de taxol A y B en el suministro y el porcentaje en peso de las fracciones del producto combinadas era 58,59 % en peso. Este producto era adecuado para una purificación adicional por medio de la cristalización.

20

**Ejemplo 2**

[0086] Este ejemplo muestra el uso de la resina PEI en la purificación de taxol A (Paclitaxel), taxol B (Cefalomanina) y taxol C de impurezas encontradas en un extracto semipurificado de *Taxus brevifolia*. Aquí, el suministro sólido del extracto semipurificado de *Taxus brevifolia* se disolvió en acetona que contenía un 0,6 % de ácido acético. Esta solución se cargó en una resina PEI J.T. Baker (40 micrómetros de tamaño de partícula, 275 angstrom de tamaño de poro, J.T. Baker artículo #7264). Esta carga suministrada era 3 % o 3 gramos de sólido suministrado por 100 gramos de resina PEI. El solvente de la elución era acetona que contenía 0,6 % de ácido acético. Como los componentes suministrados se eluyeron de la columna, se recogieron muestras aproximadamente cada 1/20 de un volumen de columna. Se analizaron estas fracciones por HPLC y los datos se trazaron como se muestra en la **figura 3**. Esta secuencia muestra la separación de las impurezas de taxol A, B y C.

**Ejemplo 3**

**[0087]** Este ejemplo ilustra el uso de la resina DEAM en la purificación de taxol A (Paclitaxel) semisintético crudo. Aquí, las moléculas usadas como reactivos en el proceso semisintético o sintético total se derivaron una planta *Taxus*, excluyendo

5 *Taxus brevifolia*. En este ejemplo, el instrumento usado fue un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia NovaPrep 200 combinado con un detector de UV Hitachi L-7400 configurado a una longitud de onda de 254 nm. Ambas unidades están conectadas directamente a una interfaz de ordenador que lleva el software controlado LC ReSponder - versión 2.11.V (R & S Technology, Inc.)

10 **[0088]** La columna es una columna LC Preparativa Load & Lock 2" (R & S Technologies, Inc./Varian) que tiene las siguientes dimensiones: Diámetro interno = 5 cm; Longitud = 25 cm; Volumen = 490,87 cm<sup>3</sup>. La columna se rellena con dietilaminometilo (DEAM) unido a gel de sílice: esférico, 20 micrómetros de tamaño de partícula, 120 angstrom de tamaño medio de poro. La columna se rellena con 270 g de

15 resina comprimida a 800 psi.

**[0089]** Se preparó un total de 7,1 gramos de taxol A crudo por medio del comportamiento de conversión de amina primaria descrita en la solicitud estadounidense con nº de serie PCT/US03/10557 titulada "Conversion of Taxane Molecules". El taxol crudo se disolvió usando aproximadamente 35 ml de solvente que

20 comprende un 90 % (vol.) de acetato de etilo / 10 % (vol.) tetrahidrofurano. Se mezcló la solución con un calentamiento suave (~35-40C) durante 30 minutos. La solución limpia se filtró al vacío para eliminar cualquier partícula o fibra pequeña antes de la inyección. Después de la filtración, se transfirió la solución a un cilindro graduado y se diluyó a volumen final de 42,5 ml (6x dilución) usando la solución 90:10 acetato de

25 etilo/THF. A continuación se volvió a mezclar para asegurar uniformidad antes de tomar las muestras. La carga para esta secuencia era 2,625 % o 2,625 gramos de sólidos suministrados por 100 gramos de la resina DEAM. El caudal se estableció a 90 ml/minuto. La columna se equilibró durante un periodo de 20 minutos con la fase móvil estándar consistente en acetato de etilo + 0,5 % de ácido acético (v/v). En la marca del

30 minuto 20, se inyectó en la columna el volumen entero de la solución de muestra preparada anteriormente seguido inmediatamente por una inyección de 20 ml de acetato de etilo para despejar la línea. Se recogieron las fracciones de la siguiente manera (todos los tiempos enumerados son del punto de inyección - tiempo 0):

TABLA 2

Fracción	Abierto	Cerrado	Tiempo total	% área Pac	Masa de Pac (mg)
1.	6:15	15:00	8:45	10,73	12,2
2.	15:00	15:15	0:15	74,95	96,4
3.	15:15	16:30	1:15	95,43	995,0
4.	16:30	29:00	12:30	99,25	4284,6
5.	29:00	35:15	6:15	100,00	555,3
				TOTAL:	5943,4 mg

[0090] Se inició un gradiente escalonado de 50 % en la marca del minuto 29 (es decir, del punto de inyección-tiempo 0) consistente de un solvente de lavado para la fase móvil de 50:50 metanol / acetato de etilo. Esto se realizó durante 20 minutos en total, punto en el que la secuencia había terminado. Este paso de lavado permite una elución más rápida del compuesto 10-Desacetiltaxol A que eluye después del taxol A. La última válvula de recogida de fracción (es decir, la fracción 5) se cerró tan pronto como el detector de UV registró un rápido aumento en la absorbancia, que indica la elución del 10-Desacetiltaxol A. Todo el 10Desacetiltaxol A se elimina de la columna bajo la condición anterior en 10 minutos. Sin embargo, con el fin de asegurar que la columna ha quedado limpia de cualquier material residual y como práctica habitual, el paso de lavado siempre dura 20 minutos completos. Por lo tanto, la secuencia completa desde el punto de inyección al paso de lavado de la columna completo fue 49 minutos. En la **figura 4** se muestra un rastro del cromatograma que muestra la recogida de puntos de las fracciones 1-5.

[0091] Las fracciones 3, 4 y 5 se combinaron en la mezcla que pasa para el consiguiente trabajo de cristalización. El análisis de fracción (por HPLC) de las fracciones que pasan proporciona un total de 5,835 g de taxol A. Dividiendo por la masa total de taxol en todas las fracciones, se calcula que la recuperación sea del 98,18 %. La pureza del material crudo que va a la columna era 87,9 % peso de taxol, y tras la purificación de la columna, la pureza de las fracciones combinadas que pasan era 98,71 % area (por HPLC) del taxol A.

#### 25 Ejemplo 4

[0092] Se rellenó una columna de 44 litros con 10 kg de resina PEI J.T. Baker (40 micrómetros de tamaño de partícula, 275 angstrom de tamaño de poro). La resina se equilibró con 3 volúmenes de columna, 135 litros, de 50 % v / 50 % v de acetato de

etilo y heptano que contenía 0,5 % de ácido acético con un caudal de 1,0 litro/min. El caudal para las fracciones restantes estaba a 1,0 litro/min. El suministro semipurificado (derivado de *Taxus media* "Runyan") se cargó en la columna con una concentración de 250 mg/ml en acetato de etilo. La pureza de los taxanos primarios del suministro es 57  
5 % en peso. Primero, la primera fracción era 170 litros de 50 % v / 50 % v de acetato de etilo y heptano que contenía 0,5 % v ácido acético. En segundo lugar, se recogieron tres fracciones de 10 litros de 50 % v / 50 % v de acetato de etilo y heptano que contenía 0,5 % de ácido acético. En tercer lugar, la fracción del producto era 90 litros de 90 % v / 10 % v de acetato de etilo y metanol. En último lugar, la columna se lavó  
10 con 45 litros de 90 % v / 10 % v de acetato de etilo/metanol. El mezcla del producto contiene 93,5 % en peso de taxanos primarios. El porcentaje de recuperación de taxol A y B era 95 %.

**[0093]** A lo largo de la descripción, donde se describe que la presente invención tiene, incluye o comprende componentes específicos, o donde se describe que los procesos  
15 tienen, incluyen o comprenden pasos de proceso específicos, se contempla que la presente invención también consiste fundamentalmente en, o consiste en, los componentes o pasos de procesamiento mencionados. Además, debería entenderse que el orden de los pasos o el orden de la realización de determinadas acciones es irrelevante siempre que la invención siga siendo factible. Asimismo, dos o más pasos o  
20 acciones pueden llevarse a cabo de forma simultánea siempre que la invención siga siendo factible. Igualmente, pueden omitirse uno o más pasos o elementos de la invención reivindicada, o la invención aquí descrita adecuadamente puede realizarse en la ausencia de cualquier componente o paso que no se revela específicamente aquí, siempre que la invención siga siendo factible.

**Reivindicaciones**

1. Un método para aislar uno o más taxanos a partir de un material que comprende dicho uno o más taxanos, método que comprende los siguientes pasos:
  - (a) tratar el material con una resina cromatográfica de sílice unida por polietilenimina (resina PBS);
  - (b) eluir ese uno o más taxanos de la resina PBS con un eluyente; y
  - (c) recuperar ese uno o más taxanos eluidos.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que ese uno o más taxanos se derivan de una o más plantas *Taxus*.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material que comprende ese uno o más compuestos de taxanos se obtiene de un proceso de semisíntesis o síntesis total.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el material comprende menos de un 8 % aproximadamente por peso de benzoatos C-2' de taxol A, B, C, D, E, F o G, combinados.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el material comprende menos de un 1,0 % por peso de benzoatos C-2' de taxol B, C, D, E, F o G, combinados.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 1 para aislar taxol A a partir de una mezcla que contiene taxanos derivada naturalmente.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 1 para purificar uno o más taxanos a partir de un extracto de biomasa en el que el extracto de biomasa se prepara por medios que no sean cromatografía.
8. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de variedades cultivadas de *Taxus media*.
9. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Hicksii'.
10. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Dark Green Spreader'.
11. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus baccata*.
12. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus cuspidata*.
13. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene

taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus floridana*.

14. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus canadensis*.
15. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus wallichiana*.
16. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus yunnanensis*.
17. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus chinensis*.
18. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Densiformis'.
19. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Brownii'.
20. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Hicksii'.
21. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Runyan'.
22. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Wardii'.
23. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el material que contiene taxanos comprende un extracto de biomasa derivado de *Taxus media* 'Tautonii'.
24. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de aislarse es taxol A.
25. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de aislarse es taxol B.
26. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de aislarse es taxol C.
27. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de aislarse es taxol D.
28. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de aislarse es taxol E.
29. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de aislarse es taxol F.
30. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de

aislarse es taxol G.

31. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el taxano que ha de aislarse es docetaxel.
- 5 32. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la resina PBS tiene un tamaño de poro medio que varía desde aproximadamente 60 a aproximadamente 300 unidades angstrom.
33. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la PBS tiene un tamaño de poro medio que varía desde aproximadamente 100 a aproximadamente 200 unidades angstrom.
- 10 34. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la PBS tiene un tamaño de poro medio de aproximadamente 120 unidades angstrom.
35. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la PBS tiene un tamaño de partícula medio que varía desde aproximadamente 0,25 a aproximadamente 500 micrómetros.
- 15 36. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la resina PBS tiene un tamaño de partícula medio que varía desde aproximadamente 1 a aproximadamente 100 micrómetros.
37. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la PBS tiene un tamaño de partícula medio que varía desde aproximadamente 10 a aproximadamente 120 micrómetros.
- 20 38. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la PBS tiene un tamaño de partícula medio de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 micrómetros.
39. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la PBS tiene un tamaño de partícula medio de aproximadamente 40 micrómetros.
- 25 40. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la resina PBS es DEAM.
41. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la resina PBS es PEI.
42. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la resina PBS tiene un tamaño de poro medio que varía desde aproximadamente 60 a aproximadamente 800 unidades angstrom.
- 30 43. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que la resina PBS tiene un grupo amino primario o secundario en la fracción de polietilenimina.
44. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que los grupos amino del polímero PEI se funcionalizan.

FIGURA 1

## Comportamiento de migración de C-2'-O-Benzilo

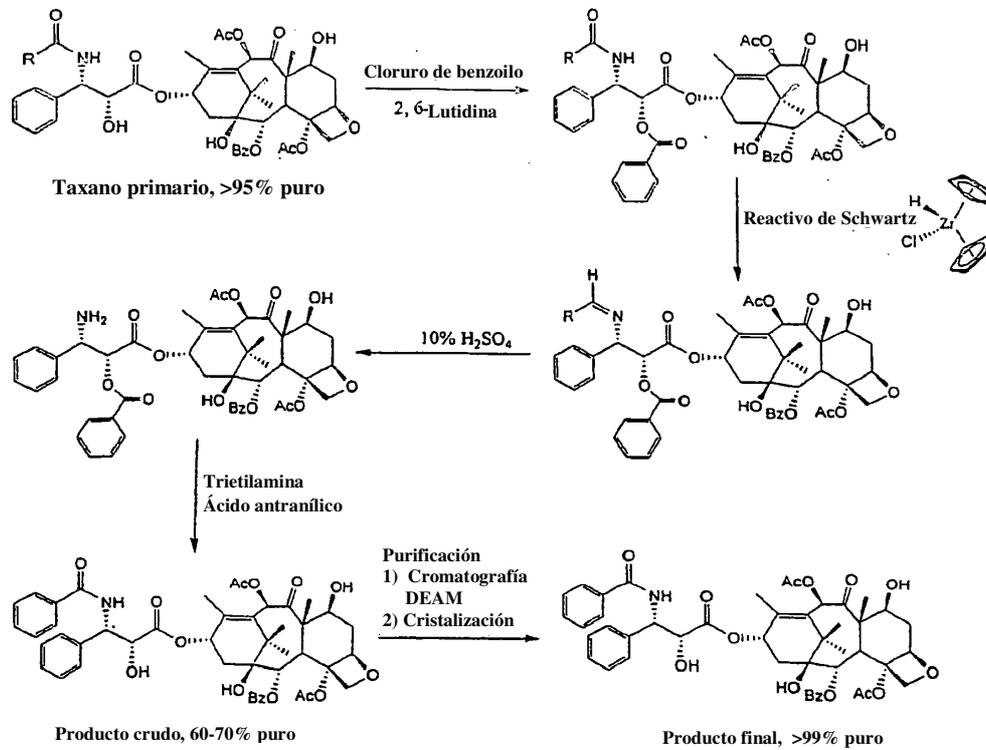
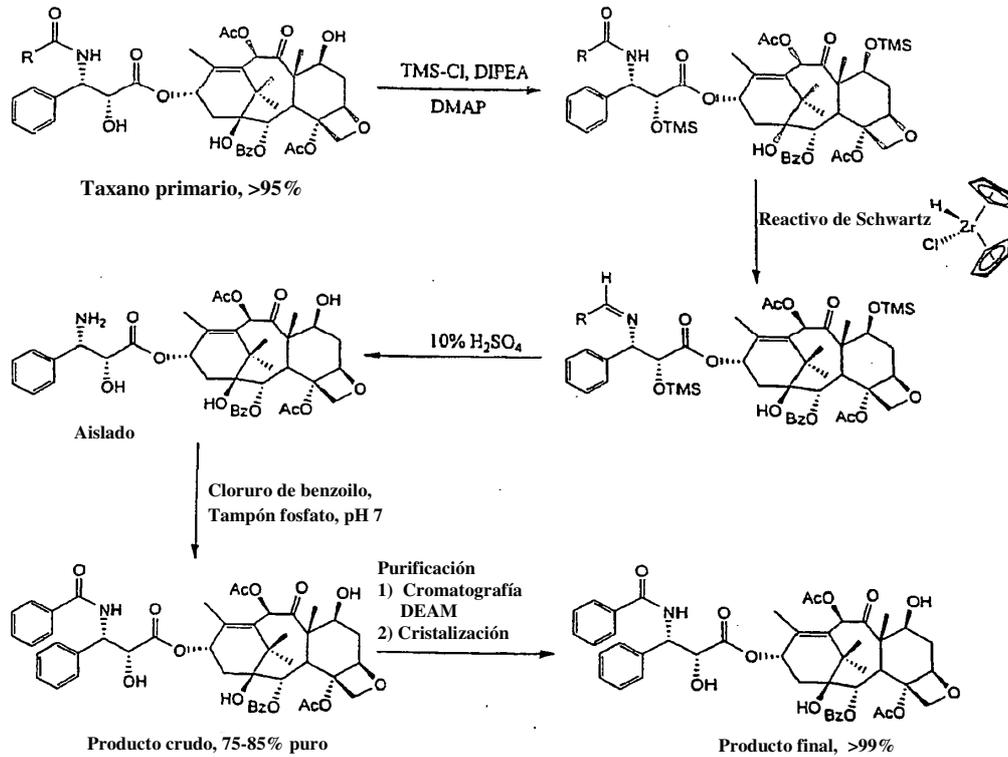


FIGURA 2

Comportamiento de conversión de amina primaria



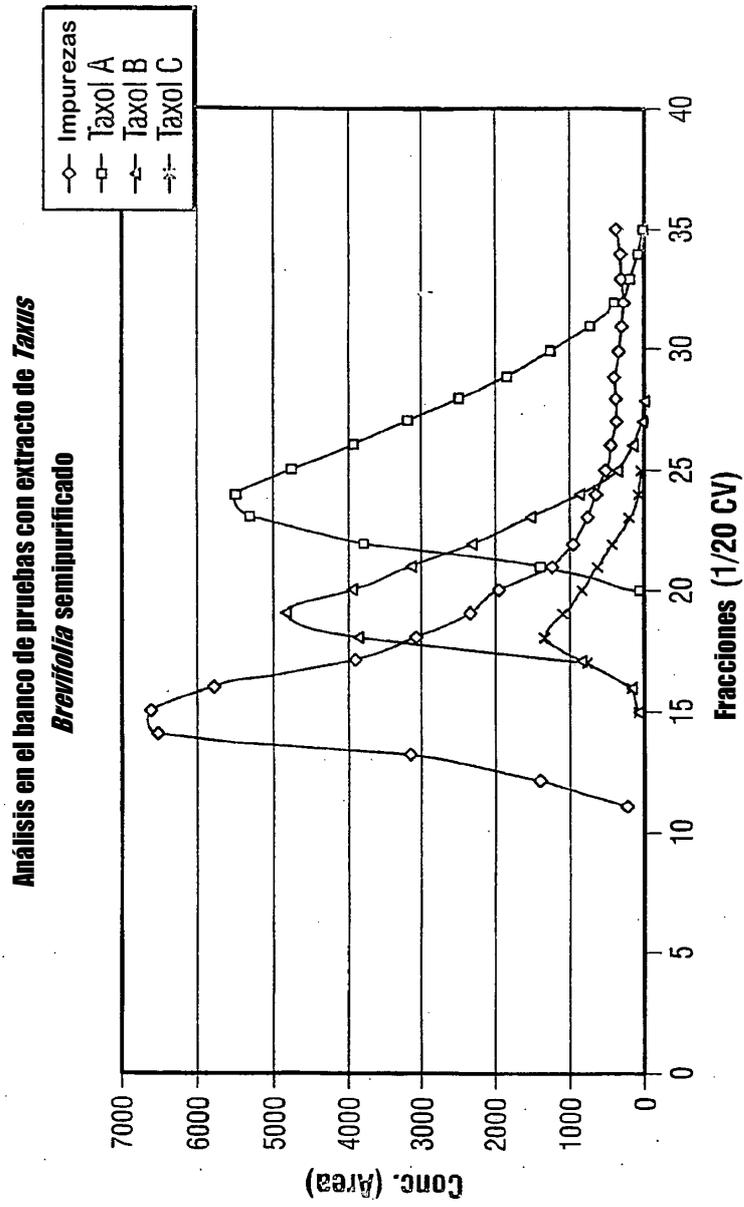


FIG. 3

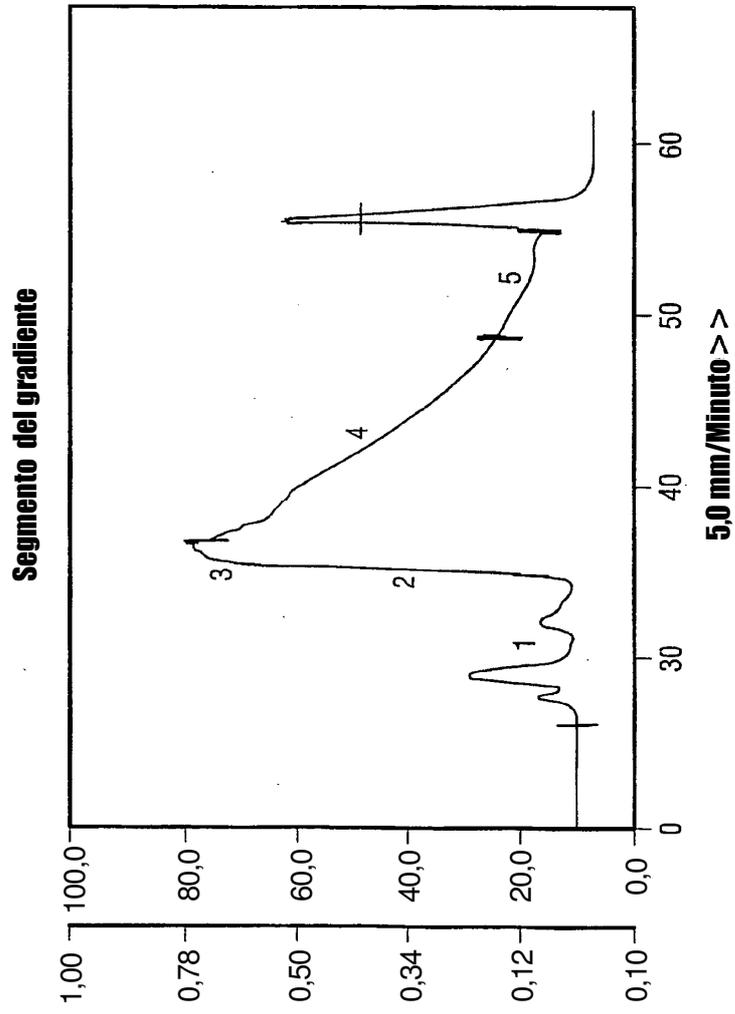


FIG. 4

**FIGURA 5**

**Moléculas de taxanos**

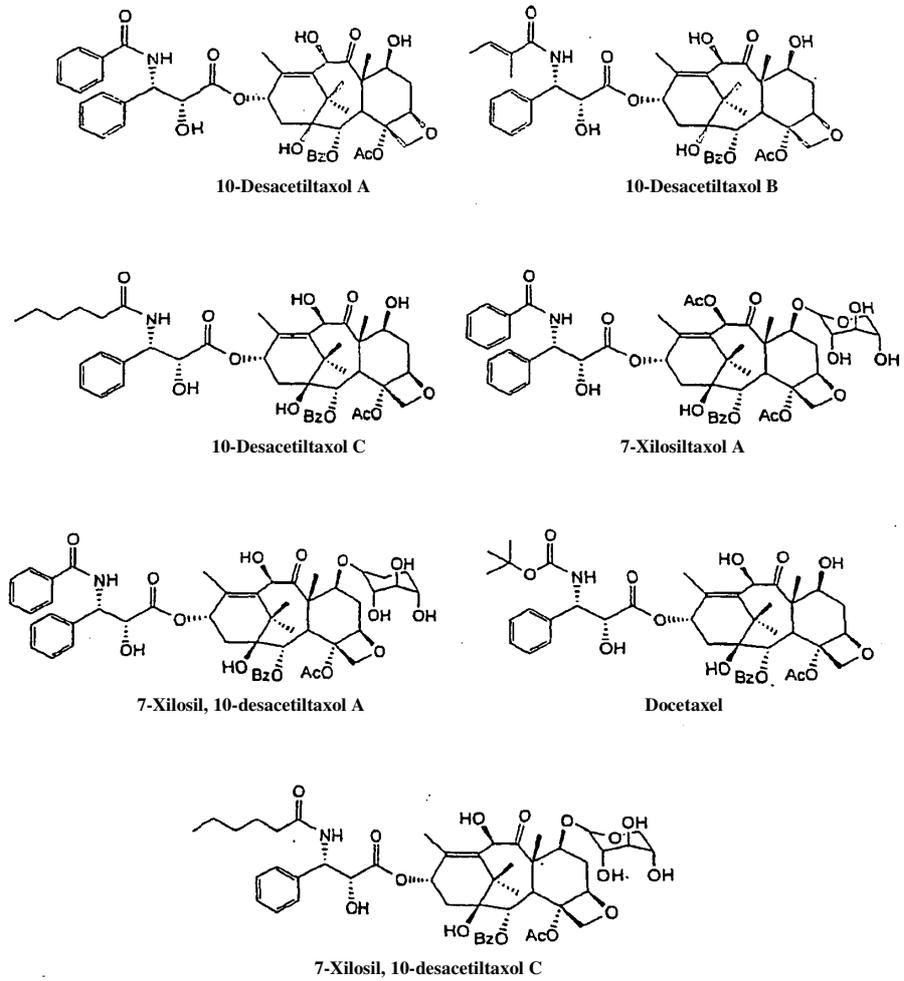
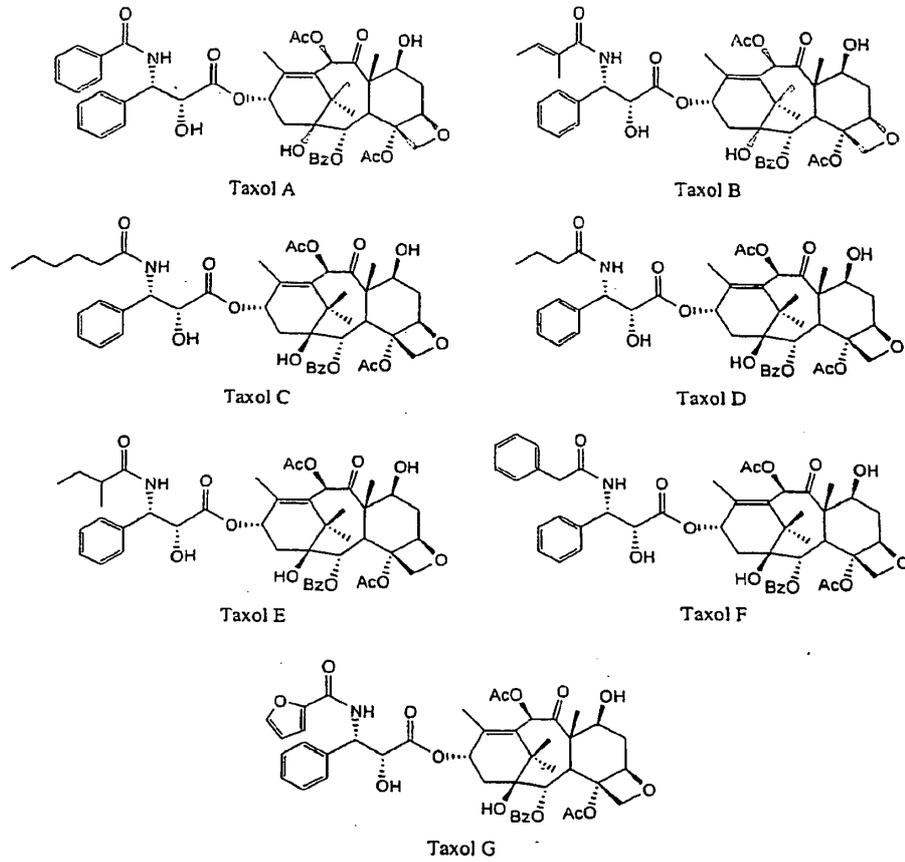
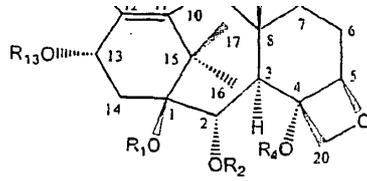


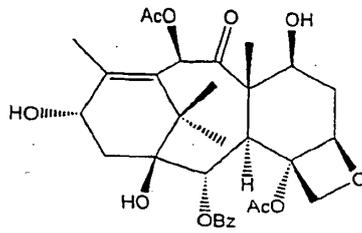
FIGURA 6

Taxanos Primarios

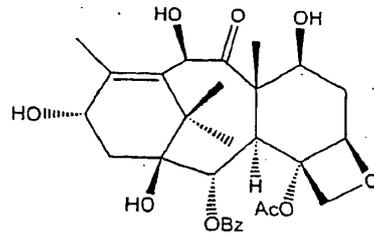




**FIGURA 8**



**FIGURA 9**



**FIGURA 10**

Comparación de los tiempos de retención de los estándares de taxano en diferentes medios

Taxano	C-18 <sup>s</sup>		Silice <sup>2</sup>		PEI <sup>3</sup>		DEAM <sup>4</sup>	
	Tr <sup>3</sup>	Tr <sup>6</sup> Rel	Tr <sup>7</sup>	Tr <sup>9</sup> Rel	Tr <sup>7</sup>	Tr <sup>6</sup> Rel	Tr <sup>7</sup>	Tr <sup>6</sup> Rel
10-Desacetil-Baccatina III	3,3	0,16	27,9	2,53	11,7	0,92	9,7	0,73
Baccatina III	6,3	0,31	11,1	1,01	5,5	0,44	5,6	0,42
10-Desacetil-Taxol	12,5	0,61	26,8	2,43	55,2	4,36	41,6	3,13
Céfalomanina	18,1	0,88	12,7	1,15	8,9	0,71	8,9	0,67
10-Desacetil-7-epi-Taxol	19,8	0,97	7,6	0,69	12,0	0,95	10,9	0,82
Paclitaxel	20,5	1,00	11,0	1,00	12,6	1,00	13,3	1,00
Taxol C	25,3	1,23	11,1	1,00	7,8	0,62	7,6	0,57
N-Metil-Taxol	25,9	1,26	14,9	1,35	6,2	0,49	5,7	0,43
7-epi-Taxol	29,4	1,43	6,2	0,56	8,1	0,64	8,3	0,62
N-Metil-Taxol	36,4	1,78	11,7	1,06	4,9	0,39	4,7	0,35
2'-Benzolo-Taxol	42,2	2,06	5,9	0,54	4,3	0,34	4,3	0,32
iso-Céfalomanina	---	---	---	---	---	---	11,9	0,90