



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 616 868 B1**(51) Int. Cl.  
C07D 305/14 (2006.01)(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number:	<b>E001513</b>	(73) Patendiomanik:	<b>INDENA S.p.A. Viale Ortles, 12 20139 Milano, IT</b>
(11) Patendikirjelduse tõlke number:	<b>EE-EP 1 616 868</b>	(72) Leiutise autorid:	<b>Gabetta, Bruno Viale Ortles, 12, 20139 Milano, IT Zini, Gianfranco Viale Ortles, 12, 20139 Milano, IT</b>
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev:	<b>13.07.2004</b>	(74) Patendivolinik:	<b>Enn Urgas Patendibüroo Turvaja OÜ Liivalaia 22, 10118 Tallinn, EE</b>
(96) Euroopa patendi-taotluse number:	<b>04016493.1</b>		
(97) Euroopa patendi väljaand-misest teatamise kuupäev:	<b>12.09.2007</b>		
(97) Euroopa patendi number:	<b>EP 1 616 868</b>		
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev:	<b>06.11.2007</b>		
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev:	<b>17.12.2007</b>		

(54) Meethodid paklitakseeli saamiseks *Taxus* perekonna taimedest

## MEETOD PAKLITAKSEELI SAAMISEKS *TAXUS* PEREKONNA TAIMEDEST

### Leiutise valdkond

Käesolev leiutis käsitleb üldiselt meetodeid paklitakseeli saamiseks paklitakseeli  
5 sisaldavatest taimedest. Täpsemalt on leiutis suunatud paklitakseeli ekstraheerimisele  
*Taxaceae* sugukonna taimedest, mille hulgas on taimed perekonnast *Taxus*, nagu *Taxus*  
*media*, ning see sisaldab kolonnkromatograafia abil teostatud etappe, millele järgneb  
paklitakseeli kristalliseerimine.

### Leiutise tagapõhi

10 Paklitakseel on kasvjavastane ühend, mida on esmaselt saadud *Taxus brevifolia*  
(*Pacific yew* - lühiokkiline jugapuu) koorest. 1960-ndatel aastatel alustas Riiklik  
Vähiinstituut (*National Cancer Institute*) kasvjavastase või antineoplastilise toimega  
taimsete ekstraktide uuringuid. Selgus, et toorekstrakt *Taxus brevifolia* koorest  
inhibeeris erinevaid kasvajaid. 1971. aastal eraldati paklitakseel ning seda kirjeldati  
15 M.C. Wani *et al.* poolt (*J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325, (1971), kes määrasid paklitakseeli  
struktuuri keemiliste meetodite ja röntgenkiirte kristallograafilise analüüsi abil. 1979.  
aastal demonstreerisid Schiff ja kaastöötajad paklitakseeli uudset toimemehhanismi. See  
mehhanism hõlmab sidumist mikrotoobulustega ja nende depolümeeriseerimise vältimist  
tingimustes, kus depolümeeriseerimine tavaliselt aset leiab. Tänapäeval kasutatakse  
20 paklitakseeli munasarja-, rinna- ja mitteväikserakulise kopsuvähi raviks.

Kuigi paklitakseel on looduslik toode, mida esmaselt ekstraheeriti lühiokkalise jugapuu  
(*Taxus brevifolia*) koorest, leidub seda ka teistes *Taxaceae* sugukonna liikides, kaasa  
arvatud *T. canadensis* ja *T. yunnanensis*. Paklitakseeli leidub samuti teiste jugapuu  
liikide maapealsetes osades ja juurtes, kaasa arvatud harilik jugapuu (*T. baccata*,  
25 *European yew*), mille okkad sisaldavad paklitakseeli ja selle analooge, himaalaja ja hiina  
jugapuud (*T. wallichiana* ja *T. chinensis*) ning iluaianduses kultiveeritavad jugapuud. On  
leidud, et paklitakseeli sisaldavad järgmised jugapuu kultivarid: *T.x media* „*Henr*“, *T.x*  
*media* „*Runyan*“, *T. cuspidata*, *T.x media* „*Hallora*“, *T.x media* „*Hatfield*“, *T.x media*  
„*Hicksii*“, *T.x media* „*Tauntonii*“, *T.x media* „*Dark Green Spreader*“, *T.x media*

„*Wardii*“, *T.x media* „*Brownii*“, *T.x media* „*Densiformis*“, *T.x media* „*Nigra*“, *T.x cuspidata* „*Brevifolia*“ ja *T. cuspidata* „*Spreader*“.

Kõik need liigid sisaldavad paklitakseeli väga väikestes kogustes. Näiteks sisaldab puuliikide *T. brevifolia* ja *T. yunnanensis* koor paklitakseeli vaid 0,02% ning põõsasliigi  
5 *T. media Hicksii* okkad ja juured sisaldavad paklitakseeli vahemikus umbes 0,005% kuni 0,1%.

Seepärast on oluline välja töötada efektiivne meetod, mis võimaldaks ekstraheerida taimsest materjalist kõrge puhtusega paklitakseeli. Käesolev leiutis käsitleb meetodit kõrge puhtusastmega paklitakseeli ekstraheerimiseks taimsest materjalist kromatograafia  
10 abil, millele järgneb paklitakseeli kristalliseerimine.

### Leiutise kokkuvõte

Käesolev leiutis käsitleb meetodeid kõrge puhtusastmega paklitakseeli saamiseks paklitakseeli sisaldavatest taimedest. Nende meetodite eeliseks on paklitakseeli stabiilsuse kindlustamine, mis võimaldab kasutada erinevaid jugapuu kultivare või nende  
15 osi, sõltumata paklitakseeli sisaldusest, ning maksimaalselt ära kasutada biomassis olevat paklitakseeli. Käesolevas leiutises kirjeldatud meetoditel on võrreldes teistega mitmeid eeliseid. Näiteks on teada, et paklitakseelil võib esineda degradeerumisreaktsioone, nagu epimerisatsioon 7. positsioonis, deatsetülatsioon 10.  
20 positsioonis ja kõrvalahela eraldumine 13. positsioonis. Need degradeerumisreaktsioonid, mis mõjutavad nii eraldatud paklitakseeli kvaliteeti kui ka saagist, käivituvad soojuse mõjul, eriti keskkonnas, mis sisaldab suuri alkohoolsete solventide koguseid. Käesolevas leiutises kirjeldatud meetodites kasutatakse alkoholi piiratud kogustes ning lahjendatult ja üldiselt ei kasutata ekstraheerimisprotsessi ajal soojendamist. Seepärast suurendavad kirjeldatud meetodid paklitakseeli stabiilsust.

25 Veel enam, siinkirjeldatud meetodite puhul võib algmaterjalina kasutada erinevaid taimeosi. Täpsemalt võivad käesolevas leiutises kasutatavateks algmaterjalideks olla paklitakseeli sisaldava taime lehed, tüved, oksad, koor, juured eraldi või seguna. Algmaterjal võib olla valitud sõltumata taimeosade osakaalust, jugapuu kultivari liigist või paklitakseeli sisaldusest. Käesoleva leiutise meetodid võimaldavad saavutada sama

protsessi efektiivsuse ning kindlustavad kõrge paklitakseelt kvaliteedi. Samuti tagavad siinkirjeldatud meetodid paklitakseeli suure saagise.

- Need meetodid hõlmavad paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimisel taimsest materjalist. Paklitakseel eraldatakse paklitakseeli ekstraktist kolonnkromatograafiasüsteemide abil, kusjuures iga kolonnkromatograafiasüsteem koosneb statsionaarsest faasist ja elueerimissolvendist; ning paklitakseel kristalliseeritakse vähemalt ühest kromatografeerimise lõppetapis saadud fraktsioonist. Mõnedes teostusvariantides kristalliseeritakse paklitakseel kõigist kromatograafia lõppetappidest saadud fraktsioonidest. Saadud paklitakseeli kristalle võib kuivatada.
- 10 Vastavalt ülalkirjeldatule võib lähtematerjaliks kasutada mitmesuguseid biomasse. Kui biomassina kasutatakse *Taxus media* taimi tervikuna, sisaldab taimne materjal tüüpiliselt alates 40 kuni 60 massiprotsenti maapealseid osi ning 60 kuni 40 massiprotsenti juuri. Lisaks võib erinevates süsteemides kasutada erinevaid statsionaarseid faase ja elueerimissolvente.
- 15 Käesoleva leiutis meetodi kohaselt ekstraheeritakse paklitakseel taimest paklitakseeli ekstrakti kujul. Paklitakseeli võib ekstraheerida taimsest materjalist kasutades sellist solventi nagu vee ja orgaanilise lahusti kombinatsioon. Paklitakseeli eraldamiseks paklitakseeli ekstraktist kasutatakse kolonnkromatograafiasüsteeme ning peale igat kromatograafilist lahutamist saadakse vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon ja
- 20 vajadusel kasutatakse alandatud rõhku vähemalt ühe fraktsiooni puhul elueerimissolvendi eraldamiseks. Kui peale igat eraldamist on kogutud üle ühe fraktsiooni, siis võib vähemalt mõned paklitakseeli sisaldavad fraktsioonid enne elueerimissolvendi eemaldamist ühendada. Lisaks sellele võib kristalliseerumine toimuda 24 tunni jooksul ja toatemperatuuril. Käesolev leiutis käsitleb veel ka meetodit
- 25 paklitakseeli ekstraheerimiseks *Taxus media* taimest, ekstraheerides taimset materjali toatemperatuuril vesilahusega, mis sisaldab umbes 40 kuni 60 mahuprotsenti atsetooni.

Ühes teostusvariandis hõlmavad käesoleva leiutise meetodid paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimise teel taimsest materjalist ja seejärel paklitakseeli eraldamist paklitakseeli ekstraktist, kasutades esimest kolonnkromatograafiasüsteemi, mis koosneb esimesest statsionaarsest faasist ja esimesest elueerimissolvendist, vähemalt ühe paklitakseeli sisaldava fraktsiooni saamiseks. Seejärel eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades teist kolonn-

kromatograafiasüsteemi, mis koosneb teisest statsionaarsest faasist ja teisest elueerimissolvendist, vähemalt ühe paklitakseeli sisaldava fraktsiooni saamiseks. Seejärel eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades kolmandat kolonnkromatograafiasüsteemi, mis koosneb kolmandast statsionaarsest faasist ja kolmandast elueerimissolvendist, vähemalt ühe paklitakseeli sisaldava fraktsiooni saamiseks. Edasi eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades neljandat kolonnkromatograafiasüsteemi, mis koosneb neljandast statsionaarsest faasist ja neljandast elueerimissolvendist, et eemaldada tsefalomanniin ja saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon. Seejärel kristalliseeritakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades paklitakseeli kristallide saamiseks kristalliseerivat solvendi.

Teises teostusvariandis hõlmavad käesoleva leiutise meetodid paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimisel taimsest materjalist. Seejärel eraldatakse paklitakseel paklitakseeli ekstraktist, kasutades esimest kolonnkromatograafiasüsteemi, mis koosneb esimesest statsionaarsest faasist ja esimesest elueerimissolvendist, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon ja eemaldada esimese jäägi saamiseks vähemalt ühest fraktsioonist esimene elueerimissolvent. Seejärel eraldatakse paklitakseel esimesest jäägist, kasutades teist kolonnkromatograafiasüsteemi, mis koosneb teisest statsionaarsest faasist ja teisest elueerimissolvendist, et saada esimesest jäägist vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ning eemaldatakse teise jäägi saamiseks vähemalt ühest fraktsioonist teine elueerimissolvent. Järgnevalt eraldatakse paklitakseel teisest jäägist, kasutades kolmandat kolonnkromatograafiasüsteemi, mis sisaldab kolmandat statsionaarset faasi ja kolmandat elueerimissolvendi, et saada teisest jäägist vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon; ning kolmas elueerimissolvent eemaldatakse vähemalt ühest fraktsioonist, saades kolmanda jäägi. Seejärel eraldatakse paklitakseel kolmandast jäägist, kasutades neljandat kolonnkromatograafiasüsteemi, mis koosneb neljandast statsionaarsest faasist ja neljandast elueerimissolvendist, et saada kolmandast jäägist vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon; ning neljas elueerimissolvent eemaldatakse kolmandast jäägist, saades neljanda jäägi. Seejärel kristalliseeritakse paklitakseel neljandast jäägist, kasutades paklitakseeli kristallide saamiseks kristalliseerivat solvendi.

Veel ühes teostusvariandis hõlmavad käesoleva leiutise meetodid *Taxus media*'st saadava taimse materjali ekstrakti valmistamist, ekstraheerides taimset materjali

- toatemperatuuril vesilahusega, milles on umbes 40 kuni 60 mahuprotsenti atsetooni, ja paklitakseeli ekstrakti valmistamist, ekstraheerides paklitakseeli taimse materjali ekstraktist. Seejärel eraldatakse paklitakseel ekstraktist, kasutades esimest kromatograafiasüsteemi, milles on statsionaarseks faasiks silikageel ning
- 5 elueerimissolvendiks dikloormetaan puhtal kujul või dikloormetaani ja metanooli seguna, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon. Vähemalt ühest fraktsioonist eemaldatakse alandatud rõhul diklorometaan ja/või metanool. Seejärel eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades teist kolonnkromatograafiasüsteemi, milles statsionaarseks faasiks on neutraalne
- 10 alumiiniumoksiid ja elueerimissolvendiks atsetoon, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ning seejärel eemaldatakse alarõhu tingimustes vähemalt ühest fraktsioonist atsetoon. Seejärel eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades kolmandat kolonnkromatograafiasüsteemi, milles statsionaarseks faasiks on silikageel ja elueerimissolvendiks segu n-heksaanist ja atsetoonist, et saada vähemalt üks
- 15 paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ning seejärel eraldatakse alandatud rõhul vähemalt ühest fraktsioonist n-heksaan ja atsetoon. Järgnevalt eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades neljandat kolonnkromatograafiasüsteemi, milles statsionaarseks faasiks on silikageel ja elueerimissolvendiks t-butüülatsetaat, et eemaldada vähemalt tsefoalomanniin ja saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav
- 20 fraktsioon, ning seejärel eemaldatakse alandatud rõhul vähemalt ühest fraktsioonist t-butüülatsetaat. Paklitakseeli kristallide saamiseks kristalliseeritakse vähemalt üks fraktsioon 24 tunni jooksul toatemperatuuril, kasutades kristalliseeriva solvendina tsükloheksaani ja atsetooni segu. Pärast seda kuivatatakse paklitakseeli kristalle vaakumis 48 tunni jooksul.
- 25 Veel ühes teostusvariandis hõlmavad käesoleva leiutise meetodid taimsest materjalist ekstrakti valmistamist *Taxus media*'st, ekstraheerides taimset materjali toatemperatuuril vesilahusega, milles on umbes 40 kuni 60 mahuprotsenti atsetooni, ja seejärel paklitakseeli ekstrakti valmistamist, ekstraheerides paklitakseeli taimse materjali ekstraktist. Seejärel eraldatakse paklitakseel ekstraktist, kasutades esimest
- 30 kromatograafiasüsteemi, milles on statsionaarseks faasiks silikageel ning elueerimissolvent sisaldab dikloormetaani ja metanooli, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ning seejärel töödeldakse alandatud rõhul vähemalt ühte fraktsiooni, et saada jääk, mis lahustatakse atsetoonis atsetooni-jäägi

kompositsiooni saamiseks. Järgnevalt eraldatakse paklitakseel atsetooni-jäägi kompositsioonist, kasutades teist kolonnkromatograafiasüsteemi, milles statsionaarseks faasiks on neutraalne alumiiniumoksiid ja elueerimissolvendiks atsetoon, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon. Vähemalt ühest fraktsioonist eemaldatakse alandatud rõhul atsetoon. Seejärel eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades kolmandat kolonnkromatograafiasüsteemi, milles statsionaarseks faasiks on silikageel ja elueerimissolvent koosneb n-heksaanist ja atsetoonist, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ning seejärel eemaldatakse alandatud rõhul vähemalt ühest fraktsioonist n-heksaan ja atsetoon.

10 Paklitakseel eemaldatakse vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades neljandat kolonnkromatograafiasüsteemi, milles statsionaarseks faasiks on silikageel ja elueerimissolvendiks t-butüülatsetaat, et eemaldada vähemalt tsefallomaniin ja et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja vähemalt ühest fraktsioonist eemaldatakse alandatud rõhul t-butüülatsetaat. Paklitakseeli kristallide saamiseks

15 kristalliseeritakse vähemalt ühte fraktsiooni 24 tunni jooksul toatemperatuuril, kasutades kristalliseeriva solvendina tsükloheksaani ja atsetooni segu. Seejärel kuivatatakse paklitakseeli kristalle 48 tundi vaakumis.

Veel ühes teostusvariandis hõlmavad käesoleva leiutise meetodid taimse materjali ekstrakti valmistamist *Taxus media*'st, ekstraheerides taimset materjali toatemperatuuril vesilahusega, milles on umbes 40 kuni 60 mahuprotsenti atsetooni ja seejärel paklitakseeli ekstrakti valmistamist, ekstraheerides paklitakseeli taimse materjali ekstraktist. Seejärel eraldatakse paklitakseel ekstraktist, kasutades esimest kromatograafiasüsteemi, milles on statsionaarseks faasiks neutraalne alumiiniumoksiid ning elueerimissolvent sisaldab diklorometaani ja metanooli, et saada vähemalt üks

25 paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja eemaldatakse alandatud rõhul vähemalt ühest fraktsioonist diklorometaan ja metanool. Paklitakseel eraldatakse vähemalt ühest ekstraktist, kasutades teist kolonnkromatograafiasüsteemi, milles on statsionaarseks faasiks silikageel ning elueerimissolvent sisaldab dikloormetaani ja metanooli, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ning vähemalt üht fraktsiooni

30 töödeldakse alandatud rõhul, et saada jääk, mis lahustatakse atsetoonis atsetooni-jäägi kompositsiooni saamiseks. Seejärel eraldatakse paklitakseel atsetooni-jäägi kompositsioonist, kasutades kolmandat kolonnkromatograafiasüsteemi, milles statsionaarseks faasiks on silikageel ja elueerimissolvent sisaldab n-heksaani ja

atsetooni, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon; ning vähemalt ühest fraktsioonist eemaldatakse alandatud rõhul n-heksaan ja atsetoon. Järgnevalt eraldatakse paklitakseel vähemalt ühest fraktsioonist, kasutades neljandat kolonnkromatograafia-süsteemi, milles statsionaarseks faasiks on silikageel ja elueerimissolvent sisaldab t-butüülatsetaati, et eemaldada vähemalt tsefalomanniin ja saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja vähemalt ühest fraktsioonist eemaldatakse alandatud rõhul t-butüülatsetaat. Pärast seda kristalliseeritakse paklitakseeli kristallide saamiseks vähemalt ühte fraktsiooni 24 tundi toatemperatuuril, kasutades kristalliseeriva solvendina tsükloheksaani ja atsetooni segu. Seejärel kuivatatakse paklitakseeli kristalle 48 tunni jooksul vaakumis.

### Joonise lühikirjeldus

Joonis 1 on voodiagramm, mis kirjeldab üldjoontes käesoleva leiutise meetodite ühte teostusvarianti.

### Leiutise detailne kirjeldus

Käesoleva leiutise meetodid hõlmavad meetodit paklitakseeli saamiseks paklitakseeli sisaldavatest taimedest. Joonisel 1 on esitatud voodiagramm, mis kirjeldab käesoleva leiutise meetodite teostusvariantide etappe. **Etapp A** hõlmab paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimise teel paklitakseeli sisaldavast taimsest materjalist. Seejärel eraldatakse **etappides B–E** paklitakseel teistest paklitakseeli ekstraktis sisalduvatest komponentidest, kasutades kolonnkromatograafilist eraldamissüsteemi. Iga etapp, mis on märgistatud **(i)**-ga, hõlmab paklitakseeli eraldamist paklitakseeli ekstaktist või kromatograafilisest fraktsioonist kolonnkromatograafia-süsteemi abil, mis koosneb statsionaarsest faasist ja elueerimissolvendist, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon. Iga **(ii)**-ga märgistatud etapp hõlmab elueerimissolvendi eemaldamist vähemalt ühest eelneva kromatograafiaetapi käigus saadud fraktsioonist. Eelistatud teostusvariandis töödeldakse elueerimissolvendi eemaldamiseks vähemalt ühte fraktsiooni alandatud rõhul. Märgistused **(a)** ja **(b)** joonisel 1 tähistavad alternatiivseid eraldamisvõimalusi. Näiteks kui iga eraldusetapi puhul järgitakse rada **(a)**, ei eemaldata vähemalt ühest paklitakseeli fraktsioonist elueerimissolventi. Vastupidiselt, kui iga eraldusetapi puhul järgitakse rada **(b)**, eemaldatakse elueerimissolvent vähemalt ühest paklitakseeli fraktsioonist. Teatud



teostusvariantides võib mõnede eraldusetappide puhul järgida rada (a) ning teiste eraldusetappide puhul võib järgida rada (b). Näiteks **etapis B** võib raja (b) teostamisel eraldada elueerimissolvendi **etapis B** saadud fraktsioonist, samas kui **etapis C** raja (a) korral suunatakse fraktsioon otse eraldamisele **etapis D**, ilma elueerimissolvendi **etapis C** eemaldamata. **Etapp F** hõlmab vähemalt ühe viimases kromatograafiaetapis saadud fraktsiooni kristalliseerimist. Spetsiifilises teostusvariandis kristalliseeritakse **etapis F** vähemalt üks **etapis E(ii)** saadud fraktsioon. Kuigi joonisel 1 on näidatud vaid neli kromatograafiaetappi, võib enne kristalliseerimist olla veel täiendavaid kromatograafiaetappe. Kristalliseerimisetapile võib järgneda kuivatamisetapp.

## 10 Taimne materjal

Käesoleva leiutise kohane, etapis A kasutamiseks ettenähtud algmaterjal on paklitakseeli sisaldav taimne materjal. Sobiv taimne materjal saadakse *Taxaceae* sugukonna taimede osadest, s.o *Taxus* taimedest. Eelistatult valmistatakse taimne materjal *Taxus media* liigist. Sobivate *Taxus media* teisendite hulks kuuluvad *T.x media* „Hill“, *T.x media* „Henryi“, *T.x media* „Runyan“, *T. cuspidata*, *T.x media* „Halloran“, *T.x media* „Hatfield“, *T.x media* „Hicksii“, *T.x media* „Tauntonii“, *T.x media* „Dark Green Spreader“, *T.x media* „Wardii“, *T.x media* „Brownii“, *T.x media* „Densiformis“, *T.x media* „Nigra“, *T.x cuspidata* „Brevifolia“, ja *T.x cuspidata* „Spreader.“ Veel võib taimne materjal olla valmistatud *Taxus* liikide erinevatest osadest, nagu värsked või kuivatatud juured, lehed, oksad, seemned, koor, tüved, või nende segust. Eelistatavalt on taimne materjal valmistatud umbes 40 kuni 60 massiprotsendi ulatuses maapealsetest osadest ning umbes 60 kuni 40 massiprotsendi ulatuses juurtest. Taimne materjal saadakse paklitakseeli sisaldavast taimeosast näiteks ekstraheerimise, purustamise või lõikumise teel. Spetsiifilises teostusvariandis peenestatakse ekstraheerimiseks ettenähtud taimne materjal, kasutades lõiketeradega jahvatusliini, mis on varustatud näiteks 10 mm läbimõõduga võrguga. Ühes teostusvariandis ekstraheeritakse taimne materjal, kasutades vähemalt ühte ekstraheerimissolvendi. Sobivate solventide hulka kuuluvad vesilahused nagu orgaaniliste ainete vesilahused, nt atsetooni vesilahus. Soovitavalt kasutatakse segu, milles on umbes 40 kuni 60 mahuprotsenti atsetooni ja umbes 60 kuni 40 mahuprotsenti vett. Atsetooni vesilahus võib hoida ära paklitakseeli lagunemist. Eelistatavalt toimub ekstraheerimine toatemperatuuril. Ekstraheerimine toatemperatuuril võimaldab ära hoida paklitakseeli lagunemist.

### **Paklitakseeli ja teiste samaliigiliste ühendite ekstraheerimine**

Enne esimest kromatograafiaetappi, nt **etappi B**, valmistatakse paklitakseeli ekstrakt vastavalt **etapis A** kirjeldatule. Ühes teostusvariandis valmistatakse paklitakseeli ekstrakt taimsest materjalist paklitakseeli ekstraheerimisel solvendiga. Ühes spetsiifilises teostusvariandis valmistatakse paklitakseeli ekstrakt taimset materjali atsetooni ja vee ekstrakti töötlemisel. Sobivate ekstraheerimissolventide hulka kuuluvad mittepiiravalt alifaatsed estrid nagu etüülatsetaat, või klooritud solvendid nagu kloroform või diklorometaan. Eelistatud ekstraheerimissolvendiks on diklorometaan. Spetsiifilises teostusvariandis kontsentreeritakse vee ja atsetooni ekstrakt vaakumis enne paklitakseeli ekstraheerimist ühega ülalnimetatud solventidest, et eemaldada atsetoon. Kontsentraati võib seejärel solvendiga lahjendada. Selleks lahjendussolvendiks võib olla metüülalkohol või muu vees lahustuv alkoholsolvent nagu etüül- või propüülalkohol. Seejärel ekstraheeritakse paklitakseel lahjendatud kontsentraadist, kasutades ekstraheerimissolventi nagu diklorometaan ja teised ülalpool nimetatud ekstraheerimissolvendid. Moodustub paklitakseeli ekstrakt.

Ühes teostusvariandis kontsentreeritakse paklitakseeli ekstrakt solventide eemaldamiseks vaakumis. Kontsentreeritud paklitakseeli ekstrakt sisaldab paklitakseeli ja sellega samaliigilisi ühendeid, klorofülle, rasvu, lingaane, flavonoide, fenoole ja erinevaid polaarseid lisandeid. Samaliigiliste ühendite hulka kuuluvad näiteks tsefalomanniin, N-debensoüül-N-heksanüülpaklitakseel, N-debensoüül-N-heksaoüül-N-metüülpaklitakseel, N-debensoüül-N-fenüülatsetaatüülpaklitakseel, N-debensoüül-N-tsinnamoüülpaklitakseel ja 2-debensoüül-2-tiglyülpaklitakseel. Kõigiga neist võivad kaasneda veel vastavalt 7-epi-, 10-deatsetüül- ja 7-0-ksülosüül derivaadid. Samuti esinevad vastavad viimased paklitakseeli derivaadid. Neid mitte-paklitakseeli komponente või lisandeid võib eemaldada, kasutades allpool kirjeldatud kromatograafilisi menetlusi.

### **Paklitakseeli puhastamine kromatograafia abil**

Paklitakseel eraldatakse paklitakseeli ekstraktist, kasutades vähemalt 4 kolonnkromatograafiaetappi, mis on joonisel 1 tähistatud **etappidena B–E**. Etapid **B(i)–E(i)** hõlmavad kromatograafiasüsteemi kasutamist, mis koosneb statsionaarsest faasist ja elueerimissolvendist. Iga süsteemi puhul võib kasutada sama seadet erineva statsionaarse

faasi ja elueerimissolvendiga. Sobivad statsionaarsed faasid hõlmavad pittepiiravalt neutraalset alumiiniumoksiidi ja silikageeli. Võimalikud elueerimissolvendid hõlmavad mittepiiravalt atsetooni, diklorometaani, metanooli, n-heksaani, t-butüülatsetaati, kloroformi ja etüülatsetaati.

- 5 Iga kromatograafiaetapp hõlmab kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, millesse kuulub statsionaarne faas ja elueerimissolvent ja solvent, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon. Vähemalt üks fraktsioon võib sisaldada mitut ühest kromatograafiaetapist saadud fraktsiooni. Näiteks võib ühest kromatograafiaetapist saada mitu fraktsiooni. Seejärel need fraktsioonid ühendatakse ning järgmine
- 10 kromatograafiaetapp teostatakse ühendatud fraktsioonidega.

Ühes teostusvariandis eemaldatakse elueerimissolvent vähemalt ühest fraktsioonist. Elueerimissolvendi eemaldamiseks töödeldakse **etappides B(ii)–E(ii)** alandatud rõhul vähemalt ühte fraktsiooni. Solvendi eemaldamine võib kujutada ka osa solvendi eemaldamist, ei ole vajalik kogu solvendi eemaldamine vähemalt ühest fraktsioonist.

- 15 Ühes teostusvariandis lahutatakse esimeses kromatograafiaetapis, **etapis B(i)**, paklitakseelist üldjuhul rasvad, klorofüllid, madalmolekulaarsed fenoolsed ühendid ning väga polaarsed lisandid. Teises kromatograafiaetapis, **etapis C(i)**, lahutatakse paklitakseelist tavaliselt täiendavad lisandid, täpsemalt flavonoidid ja lignaanid. Kolmandas kromatograafiaetapis, **etapis D(i)**, eraldatakse tavaliselt paklitakseelist teised
- 20 taksaanid. Need taksaanid hõlmavad ülalnimetatud taksaani derivaate, täpsemalt tsefalomanniini ja teiste, ülalpool kirjeldatud taksaanide väikesi koguseid. Neljandas kromatograafiaetapis, **etapis E(i)**, eraldatakse paklitakseelist temaga samaliigiline tsefalomanniin. Tsefalomanniini eemaldamiseks sobivate statsionaarsete faaside hulka kuulub silikageel. Kasutatavate elueerimissolventide näideteks on t-butüülatsetaat, i-
- 25 butüülatsetaat, n-butüülmetanaat, i-butüülmetanaat, t-butüülmetanaat ja s-butüülmetanaat. Vt US patenti 6 333 419, mille sisu on siia täielikult kaasatud viidete kaudu.

- Ühes teostusvariandis hõlmab kolonnkromatograafiasüsteem statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina metüleenkloriidi ning seejärel metüleenkloriidi ja metanooli segu mahuvahekorras 99:1 või 98:2. Teises teostusvariandis hõlmab teine
- 30 kolonnkromatograafiasüsteem statsionaarse faasina neutraalset alumiiniumoksiidi ja elueerimissolvendina atsetooni. Veel ühes teostusvariandis hõlmab kolmas

kolonnkromatograafiasüsteem statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina n-heksaani ja atsetooni segu mahuvahekorras 4:1. Veel ühes teostusvariandis hõlmab kolonnkromatograafiasüsteem statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina t-butüülatsetaati.

- 5 Vajadusel on võimalik eemaldada lisandeid suvalises järjekorras. Näiteks fenoolide eemaldamine alumiiniumoksiidiga võib olla teostatud enne klorofüllide ja rasvade eemaldamist, kasutades statsionaarse faasina silikageeli.

### **Paklitakseeli kristalliseerimine**

- Pärast viimast kromatograafiaetappi kristalliseeritakse vähemalt üks selles etapis saadud
- 10 fraktsioon **etapis F**, kasutades paklitakseeli kristallide saamiseks kristalliseerivat solventi. Sobivate kristalliseerivate solventide hulka kuuluvad tsükloheksaan, atsetoon, n-heksaan, i-heksaan, n-heptaan, t-butüülatsetaat ja nende segud. Eelistatavalt kasutatakse tsükloheksaani ja atsetooni segu vahekorras 1:1. Ühes teostusvariandis toimub kristalliseerumine toatemperatuuril. Üldiselt toimub kristalliseerumine 24 tunni
- 15 jooksul. Siiski võib kristalliseerumine toimuda ka mingi muu ajavahemiku jooksul. Peale kristalliseerimist kuivatatakse paklitakseeli kristallid vaakumis, näiteks temperatuurivahemikus 50 °C kuni 60 °C. Eelistatavalt kuivatatakse kristalle umbes 48 tunni jooksul.

### Näide 1

- 20 Üks tonn kuivatatud ja jahvatatud taimset materjali, mis saadi taimest *T. media Hicksii* ja mis koosnes umbes 500 kg juurtest ja umbes 500 kg lehtedest ning võrsetest, ekstraheeriti toatemperatuuril 15000 l 50% atsetooni vesilahusega. Ekstrakt kontsentreeriti vaakumis mahuni umbes 300 l. Siis lisati 150 l metanooli ja ekstraheeriti viis korda 200 l diklorometaaniga. Kogutud orgaanilised kihid kontsentreeriti vaakumis
- 25 kuni pehme jäägi saamiseni, mis lahustati uuesti diklorometaanis ning kolonnkromatografeeriti 180 kg silikageelil. Umbes 2700 l diklorometaani elueeriti läbi kolonni ning visati ära.

- Seejärel elueeriti paklitakseel diklorometaani-metanooli seguga mahuvahekorras 99:1. Saadud lahus aurutati vaakumis kuni pehme jäägi saamiseni. Jääk lahustati 8 l atsetoonis
- 30 ning saadi atsetooni-jääk, mis juhiti läbi 30 kg neutraalset alumiiniumoksiidi sisaldava

kolonni, elueerides sama solvendiga. Paklitakseeli sisaldavad fraktsioonid ühendati ja kontsentreeriti vaakumis kuni mahuni 8 l.

Atsetooni lahus viidi kolonni, mis sisaldas 180 kg silikageeli ning n-heksaani-atsetooni segu vahekorras 4:1. Sellise eluendiga elueerimine puhastas paklitakseeli enamikust teistest taksaanitest, välja arvatud tsefalomanniin. Paklitakseeli sisaldavad fraktsioonid ühendati ning kontsentreeriti vaakumis mahuni 5 l.

Seejärel lahus kromatografeeriti 180 kg silikageeli ja t-butüülatsetaadi keskkonnas, elueerides selle solvendiga. Paklitakseeli sisaldavad fraktsioonid ühendati ja aurutati vaakumis kuni pehme jäägi saamiseni. Hilisem kolonnide elueerimine t-butüülatsetaadiga eemaldas vähemalt tsefalomanniini. Paklitakseeli sisaldav pehme jääk (umbes 300 g) lahustati 2 l atsetoonis, lahjendati 1,2 l tsükloheksaaniga ja jäeti kristalliseeruma. Pärast filtrimist ja kuivamist 50 °C juures 48 tunni jooksul saadi 255 g paklitakseeli puhtusastmega üle 99%.

#### Näide 2

Sada kilogrammi kuivatatud ja peenestatud *Taxus media* „dark green spreader“ taimest saadud taimset materjali, milles oli umbes 40 kg juuri ja 60 kg lehti ja võrseid, ekstraheeriti toatemperatuuril 1500 liitri 50% atsetooni vesilahusega. Ekstrakt kontsentreeriti vaakumis kuni mahuni 30 l. Seejärel lisati 15 l metanooli ning ekstraheeriti viis korda 20 l diklorometaaniga. Diklorometaani ekstraktid ühendati ja kontsentreeriti vaakumis mahuni 15 l.

Lisati metanool (150 ml) ja saadud lahus juhiti läbi kolonni, mis sisaldas 13 kg neutraalset alumiiniumoksiidi koos diklorometaani-metanooli seguga mahuvahekorras 99:1. Paklitakseeli sisaldavad fraktsioonid koguti kokku ja kontsentreeriti vaakumis mahuni 5 l.

Kontsentreeritud lahus viidi kolonni, mis sisaldas 9 kg silikageeli, ja elueeriti diklorometaani-metanooli seguga mahuvahekorras 99:1. Pärast polaarsete lisandite elueerimist koguti 220 l paklitakseeli sisaldavaid fraktsioone, ühendati ning aurutati vaakumis pehmet jäägi saamiseks (190 g).

Jääk lahustati 400 ml atsetoonis, et moodustuks atsetooni-jääk, mis omakorda kolonnkromatografeeriti 9 kg silikageelil, elueerides n-heksaani-atsetooni 4:1 seguga. Paklitakseeli sisaldavad fraktsioonid koguti kokku ja puhastati uuesti kolonnkromatograafia abil silikageelil, elueerides t-butüülatsetaadiga vastavalt näites 2 5 kirjeldatule. Pärast kristalliseerimist segust tsükloheksaan-atsetooni 1:1 seguga ning kuivatamist 55 °C juures saadi 18,5 g paklitakseeli puhtusastmega üle 99%.

**PATENDINÕUDLUS**

1. Meetod paklitakseeli saamiseks paklitakseeli sisaldavatest taimedest hõlmab:

- (a) paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimise teel taimsest materjalist;
- 5 (b) paklitakseeli eraldamist paklitakseeli ekstraktist, kasutades esimest kolonnkromatograafiasüsteemi, mis sisaldab esimest statsionaarset faasi ja esimest elueerimissolventi, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon;
- (c) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (b) saadud fraktsioonist, kasutades teist kolonnkromatograafiasüsteemi, mis sisaldab teist statsionaarset  
10 faasi ja teist elueerimissolventi, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon;
- (d) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (c) saadud fraktsioonist, kasutades kolmandat kolonnkromatograafiasüsteemi, mis sisaldab kolmandat statsionaarset faasi ja kolmandat elueerimissolventi, et saada vähemalt üks  
15 paklitakseeli sisaldav fraktsioon;
- (e) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (d) saadud fraktsioonist, kasutades neljandat kolonnkromatograafiasüsteemi, mis sisaldab neljandat statsionaarset faasi ja neljandat elueerimissolventi, et eemaldada vähemalt tsefalomanniin ning saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon; ja
- 20 (f) vähemalt ühes etapis (e) saadud fraktsioonis sisalduva paklitakseeli kristalliseerimist, kasutades paklitakseeli kristallide saamiseks kristalliseerimissolventi.

2. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis hõlmab täiendavalt etapis (f) saadud paklitakseeli kristallide kuivatamist.

25 3. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures taimne materjal saadakse taimeosadest.

4. Meetod vastavalt nõudluspunktile 3, kusjuures taimse materjali ekstrakt on valmistatud ekstraheerimise teel taimsest materjalist, mis sisaldab 40 kuni 60 massiprotsenti maapealseid osi ning 60 kuni 40 massiprotsenti juuri.
5. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures taimne materjal hõlmab taimedest  
5 *Taxus media*, *T.x media* „Henryi“, *T.x media* „Runyan“, *T. cuspidata*, *T.x media* „Halloran“, *T.x media* „Hatfield“, *T.x media* „Hicksii“, *T.x media* „Tauntonii“, *T.x media* „Dark Green Spreader“, *T.x media* „Wardii“, *T.x media* „Brownii“, *T.x media* „Densiformis“, *T.x media* „Nigra“, *T.x cuspidata* „Brevifolia“ või *T. cuspidata* „Spreader“ saadud taimset materjali.
- 10 6. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures teiseks statsionaarseks faasiks on neutraalne alumiiniumoksiid.
7. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures esimeseks, kolmandaks või neljandaks statsionaarseks faasiks on silikageel.
8. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures esimene, teine või kolmas  
15 elueerimissolvent hõlmab atsetooni, diklorometaani, metanooli, n-heksaani, t-butüül-atsetaati, kloroformi või etüülatsetaati.
9. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures esimene elueerimissolvent hõlmab diklorometaani ja metanooli.
10. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures teiseks elueerimissolvendiks on  
20 atsetoon.
11. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures kolmas elueerimissolvent hõlmab h-heksaani ja atsetooni.
12. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures neljas elueerimissolvent hõlmab t-butüülatsetaati, i-butüülatsetaati, n-butüülmetanaati, i-butüülmetanaati, t-butüülmetanaati või s-butüülmetanaati.  
25
13. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures kristalliseeriv solvent hõlmab tsükloheksaani ja atsetooni.
14. Meetod paklitakseeli saamiseks paklitakseeli sisaldavatest taimedest, mis hõlmab:



(a) paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimise teel taimsest materjalist;

(b) paklitakseeli eraldamist paklitakseeli ekstraktist, mis hõlmab:

5 (i) esimese kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab esimest statsionaarset faasi ja esimest elueerimissolventi, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja

(ii) esimese elueerimissolvendi eemaldamist vähemalt ühest etapis (b)(i) saadud fraktsioonist, et moodustuks esimene jääk;

(c) paklitakseeli eraldamist esimesest, etapis (b)(ii) saadud jäägist, mis hõlmab:

10 (i) teise kolonnkromatograafia süsteemi kasutamist, mis sisaldab teist statsionaarset faasi ja teist elueerimissolventi, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon esimesest jäägist, ja

(ii) teise elueerimissolvendi eemaldamist vähemalt ühest etapis (c)(i) saadud fraktsioonist, et moodustuks teine jääk;

15 (d) paklitakseeli eraldamist teisest, etapis (c)(ii) saadud jäägist, mis hõlmab:

(i) kolmanda kolonnkromatograafia süsteemi kasutamist, mis sisaldab kolmandat statsionaarset faasi ja kolmandat elueerimissolventi, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon teisest jäägist, ja

20 (ii) kolmanda elueerimissolvendi eemaldamist vähemalt ühest etapis (d)(i) saadud fraktsioonist, et moodustuks kolmas jääk;

(e) paklitakseeli eraldamine kolmandast, etapis (d)(ii) saadud jäägist, mis hõlmab:

(i) neljanda kolonnkromatograafia süsteemi kasutamist, mis sisaldab neljandat statsionaarset faasi ja neljandat elueerimissolventi, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon kolmandast jäägist, ja

25 (ii) neljanda elueerimissolvendi eemaldamist vähemalt ühest etapis (e)(i) saadud fraktsioonist, et moodustuks neljas jääk; ja

(f) paklitakseeli kristalliseerimist neljandast, etapis (e)(ii) saadud jäägist, kasutades paklitakseeli kristallide saamiseks kristalliseerivat solventi.

15. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures etapis (e) eemaldatakse kolmandast jäägist vähemalt tsefalomanniin.
- 5 16. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures esimese elueerimissolvendi eemaldamiseks kasutatakse vähemalt ühe etapis (b)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhku.
17. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures teise elueerimissolvendi eemaldamiseks kasutatakse vähemalt ühe etapis (c)(i) saadud fraktsiooni puhul  
10 alandatud rõhku.
18. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures kolmanda elueerimissolvendi eemaldamiseks kasutatakse vähemalt ühe etapis (d)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhku.
19. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures neljanda elueerimissolvendi  
15 eemaldamiseks kasutatakse vähemalt ühe etapis (e)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhku.
20. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, mis hõlmab täiendavalt etapis (f) saadud paklitakseeli kristallide kuivatamist.
21. Meetod vastavalt nõudluspunktile 20, kusjuures paklitakseeli kristalle kuivatatakse  
20 vaakumis.
22. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures paklitakseel ekstraheeritakse taimsest materjalist, kasutades esimest vesilahust.
23. Meetod vastavalt nõudluspunktile 22, kusjuures esimene vesilahus sisaldab vett ja atsetooni.
- 25 24. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures etapp (a) toimub toatemperatuuril.

25. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures etapis (b)(i) saadakse rohkem kui üks fraktsioon ja vähemalt mõned neist fraktsioonidest ühendatakse enne esimese elueerimissolvendi eemaldamist etapis (b)(ii).
26. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures etapis (c)(i) saadakse enam kui üks fraktsioon ja vähemalt mõned neist fraktsioonidest ühendatakse enne teise elueerimissolvendi eemaldamist etapis (c)(ii).
27. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures etapis (d)(i) saadakse rohkem kui üks fraktsioon ja vähemalt mõned neist fraktsioonidest ühendatakse enne kolmanda elueerimissolvendi eemaldamist etapis (d)(ii).
- 10 28. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures etapis (e)(i) saadakse rohkem kui üks fraktsioon ja vähemalt mõned neist fraktsioonidest ühendatakse enne neljanda elueerimissolvendi eemaldamist etapis (e)(ii).
29. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuure kristalliseerimisetapp (f) toimub 24 tunni jooksul.
- 15 30. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuure kristalliseerimine etapis (f) toimub toatemperatuuril.
31. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures taimne materjal saadakse taimeosadest.
32. Meetod vastavalt nõudluspunktile 31, kusjuures taimse materjali ekstrakt on 20 valmistatud ekstraheerimise teel taimsest materjalist, mis sisaldab 40 kuni 60 massiprotsenti maapealseid osi ning 60 kuni 40 massiprotsenti juuri.
33. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures taimne materjal hõlmab taimset materjali, mis on saadud *Taxus media*, *T.x media* „Henryi“, *T.x media* „Runyan“, *T. cuspidata*, *T.x media* „Halloran“, *T.x media* „Hatfield“, *T.x media* „Hicksii“, *T.x media* „Tauntonii“, *T.x media* „Dark Green Spreader“, *T.x media* „Wardii“, *T.x media* „Brownii“, *T.x media* „Densiformis“, *T.x media* „Nigra“, *T.x cuspidata* „Brevifolia“, või *T. cuspidata* „Spreader“ taimedest.
- 25

34. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures teiseks statsionaarseks faasiks on neutraalne alumiiniumoksiid.
35. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures esimeseks, kolmandaks või neljandaks statsionaarseks faasiks on silikageel.
- 5 36. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures esimene, teine või kolmas elueerimissolvent hõlmab atsetooni, diklorometaani, metanooli, n-heksaani, t-butüül-atsetaati, kloroformi või etüül-atsetaati.
37. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures esimene elueerimissolvent hõlmab diklorometaani ja metanooli.
- 10 38. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures teiseks elueerimissolvendiks on atsetoon.
39. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures kolmas elueerimissolvent hõlmab n-heksaani ja atsetooni.
40. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures neljas elueerimissolvent hõlmab  
15 t-butüül-atsetaati, i-butüül-atsetaati, n-butüülmetanaati, i-butüülmetanaati, t-butüülmetanaati või s-butüülmetanaati.
41. Meetod vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures kristalliseeriv lahusti hõlmab tsükloheksaani ja atsetooni.
42. Meetod paklitakseeli saamiseks taimest *Taxus media*, mis hõlmab:
- 20 (a) taimse materjali ekstrakti valmistamist *Taxus media* taimse materjali ekstraheerimisel toatemperatuuril vesilahusega, mis sisaldab 40 kuni 60 mahuprotsenti atsetooni;
- (b) paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimisel taimsest materjalist valmistatud ekstraktist, mis on saadud etapis (a);
- 25 (c) paklitakseeli eraldamist paklitakseeli ekstraktist, mis hõlmab:

- (i) esimese kromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina diklorometaani puhtal kujul või diklorometaani ja metanooli segu, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja
- 5 (ii) vähemalt ühte etapis (c)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist diklorometaani ja/või metanooli eemaldamiseks;
- (d) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (c)(ii) saadud fraktsioonist, mis hõlmab:
- 10 (i) teise kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina neutraalset alumiiniumoksiidi ja elueerimissolvendina atsetooni, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja
- (ii) vähemalt ühe etapis (d)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist atsetooni eemaldamiseks;
- 15 (e) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (d)(ii) saadud fraktsioonist, mis hõlmab:
- (i) kolmanda kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina n-heksaani ja atsetooni segu, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja
- 20 (ii) vähemalt ühe etapis (e)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist n-heksaani ja atsetooni eemaldamiseks;
- (f) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (e)(ii) saadud fraktsioonist, mis hõlmab:
- 25 (i) neljanda kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina t-butüülatsetaati, et eemaldada vähemalt tsefalonanniin ja saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja
- (ii) vähemalt ühe etapis (f)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist t-butüülatsetaadi eemaldamiseks;

(g) vähemalt ühe etapis (f)(ii) saadud fraktsiooni kristalliseerimist 24 tunni jooksul toatemperatuuril, kasutades kristalliseeriva solvendina tsükloheksaani ja atsetooni segu, et saada paklitakseeli kristalle; ja

5 (h) etapis (g) saadud paklitakseeli kristallide kuivatamist vaakumis 48 tunni jooksul.

43. Meetod vastavalt nõudluspunktile 42, kusjuures paklitakseeli ekstrakti valmistamine etapis (b) hõlmab:

(a) taimse materjali ekstrakti kontsentreerimist alandatud rõhul atsetooni eemaldamiseks, et tekiks kontsentraat;

10 (b) kontsentraadi lahjendamist metüülalkoholiga;

(c) kontsentraadi ekstraheerimist diklorometaaniga, et moodustuks diklorometaani ekstrakt; ja

(d) diklorometaani ekstrakti kontsentreerimist alandatud rõhul, et moodustuks paklitakseeli ekstrakt.

15 44. Meetod paklitakseeli saamiseks taimest *Taxus media*, mis hõlmab:

(a) taimse materjali ekstrakti valmistamist *Taxus media* taimse materjali ekstraheerimisel toatemperatuuril vesilahusega, mis sisaldab 40 kuni 60 mahuprotsenti atsetooni;

20 (b) paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstraheerimisel etapis (a) saadud taimse materjali ekstraktist;

(c) paklitakseeli eraldamist paklitakseeli ekstraktist, mis hõlmab:

(i) esimese kromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina diklorometaani ja metanooli segu, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon,

25 (ii) vähemalt ühe etapis (c)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist, et saada jääki, ja

(iii) etapis (c)(ii) saadud jäägi lahustamist atsetoonis, et saada atsetooni-jäägi kompositsiooni;

(d) paklitakseeli eraldamist etapis (c)(iii) saadud atsetooni-jäägi kompositsioonist, mis hõlmab:

5 (i) teise kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina neutraalset alumiiniumoksiidi ja elueerimissolvendina atsetooni, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja

(ii) vähemalt ühe etapis (d)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist atsetooni eemaldamiseks;

10 (e) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (d)(ii) saadud fraktsioonist, mis hõlmab:

(i) kolmanda kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina n-heksaani ja atsetooni segu, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja

15 (ii) vähemalt ühe etapis (e)(i) saadud fraktsiooni töötlemist alandatud rõhul n-heksaani ja atsetooni eemaldamiseks;

(f) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (e)(ii) saadud fraktsioonist, mis hõlmab:

20 (i) neljanda kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina t-butüülatsetaati, et eemaldada vähemalt tsefalomanniin ja saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja

(ii) vähemalt ühe etapis (f)(i) saadud fraktsiooni töötlemist alandatud rõhul t-butüülatsetaadi eemaldamiseks;

25 (g) vähemalt ühe etapis (f)(ii) saadud fraktsiooni kristalliseerimist 24 tunni jooksul toatemperatuuril, kasutades kristalliseeriva solvendina tsükloheksaani ja atsetooni segu, et saada paklitakseeli kristalle; ja

(h) etapis (g) saadud paklitakseeli kristallide kuivatamist vaakumis 48 tunni jooksul.

45. Meetod vastavalt nõudluspunktile 44, kus *Taxus media* hõlmab vormi *T. media Hicksii*.

5 46. Meetod paklitakseeli saamiseks taimest *Taxus media*, mis hõlmab:

(a) taimse materjali ekstrakti valmistamist *Taxus media* taimse materjali ekstraheerimisel toatemperatuuril vesilahusega, mis sisaldab 40 kuni 60 mahu-  
protsenti atsetooni;

10 (b) paklitakseeli ekstrakti valmistamist paklitakseeli ekstaheerimisel etapis (a) saadud taimsest materjali ekstraktist;

(c) paklitakseeli eraldamist paklitakseeli ekstraktist, mis hõlmab:

(i) esimese kromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina neutraalset alumiiniumoksiidi ja elueerimissolvendina diklorometaani ja metanooli segu, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja

15 (ii) vähemalt ühe etapis (c)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist diklorometaani ja metanooli eemaldamiseks;

(d) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (c)(ii) saadud fraktsioonist, mis hõlmab:

20 (i) teise kromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina diklorometaani ja metanooli segu, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon,

(ii) vähemalt ühe etapis (d)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist, et saada jääk, ja

25 (iii) etapis (d)(ii) saadud jäägi lahustamist atsetoonis, et saada atsetooni-jäägi kompositsioon;



(e) paklitakseeli eraldamist etapis (d)(iii) saadud atsetooni-jäägi kompositsioonist, mis hõlmab:

5 (i) kolmanda kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina n-heksaani ja atsetooni segu, et saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja

(ii) vähemalt ühe etapis (e)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist n-heksaani ja atsetooni eemaldamiseks;

(f) paklitakseeli eraldamist vähemalt ühest etapis (e)(ii) saadud fraktsioonist, mis hõlmab:

10 (i) neljanda kolonnkromatograafiasüsteemi kasutamist, mis sisaldab statsionaarse faasina silikageeli ja elueerimissolvendina t-butüülatsetaati, et eemaldada vähemalt tsefalomanniin ja saada vähemalt üks paklitakseeli sisaldav fraktsioon, ja

15 (ii) vähemalt ühe etapis (f)(i) saadud fraktsiooni puhul alandatud rõhu kasutamist t-butüülatsetaadi eemaldamiseks;

(g) vähemalt ühe etapis (f)(ii) saadud fraktsiooni kristalliseerimist 24 tunni jooksul toatemperatuuril, kasutades kristalliseeriva solvendina tsükloheksaani ja atsetooni segu, et saada paklitakseeli kristalle; ja

20 (h) etapis (g) saadud paklitakseeli kristallide kuivatamist vaakumis 48 tunni jooksul.

47. Meetod vastavalt nõudluspunktile 46, kusjuures *Taxus media* hõlmab vormi *T. media* „dark green spreader“.

## JOONIS 1

Meetodid paklitakseeli saamiseks paklitakseeli sisaldavatest taimedest