

第 92127669 號
專利申請案

公告本

年 94 月 6 日 修正(更)正本

I284131

說明書修正參考本
94/06/03

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92127669

※申請日期：92.10.6

※IPC 分類：C07K 1/14 (2006.01)

壹、發明名稱：(中文/英文)

非結合親脂化合物被貧化的天然牝馬結合雌激素混合物的獲取方法

PROCESS FOR OBTAINING NATURAL MIXTURE OF CONJUGATED EQUINE ESTROGEN WITH
POOR NON-CONJUGATED LIPOPHILIC COMPOUNDS

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

索維伊製藥股份有限公司/SOLVAY PHARMACEUTICALS GMBH

代表人：(中文/英文)

高斯曼 馬汀/GOSMANN, MARTIN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國漢諾威·漢斯-波克樂路 20 號

Hans-Böckler-Alle 20, 30173 Hannover, Germany

國籍：(中文/英文) 德國/Germany

參、發明人：(共 4 人)

姓名：(中文/英文)

1. 鮑恩 伊凡/BÁN, IVAN

2. 喬林 克勞斯-剛德/GERLING, KLAUS-GÜNTER

3. 木勒 漢斯-喬格/MÜLLER, HANS-JÖRG

4. 瓦屈斯曼 史帝芬/WACHSMANN, STEFAN

住居所地址：(中文/英文)

1. 德國漢諾威·海威格路 10 號/Hedwigsweg 10, 30539 Hannover, Deutschland

2. 德國文森/艾樂·布魯曲路 4 號/Bruchweg 4, 29308 Winsen/Aller, Deutschland

3. 德國漢諾威·翠普路 15 號/Tripweg 15, 30627 Hannover, Deutschland

4. 德國漢諾威·海登賀佛街 75A 號/Haltenhoffstr. 75A, 30167 Hannover Deutschland

國 籍：(中文/英文)

德國/Germany

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 歐洲；2002/10/11；02022763.3

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

4. 德國漢諾威·海登賀佛街 75A 號/Haltenhoffstr. 75A, 30167 Hannover Deutschland

國 籍：(中文/英文)

德國/Germany

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 歐洲；2002/10/11；02022763.3

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及天然的牝馬結合雌激素混合物的獲取方法，該混合物中非結合親脂化合物被貧化，所述非結合親脂化合物包括非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯、非結合類固醇(尤其是雄烷-和孕烷-類固醇)以及類似的非結合化合物。

【先前技術】

雌激素在醫學中用於激素替代治療。尤其是將雌激素混合物用於治療和預防婦女在自然絕經或人為絕經後出現的更年期症狀。已經證明，天然結合雌激素混合物，例如存在於妊娠牝馬尿液中的，以下被稱為天然的牝馬結合雌激素混合物，對此特別有效且具有良好的耐受性。

溶解在妊娠牝馬尿液(=pregnant mares urine，以下簡稱為"PMU")中的固體含量自然會在較大的範圍內變動，一般為每升40-90克幹物質。PMU的固體含量中，除尿素和其他常見的尿容物之外，酚類成份含量大約為幹物質的2-5重量%。這些酚類成份中有甲酚和以HPMF著稱的二氫-3,4-雙[(3-羥基苯基)甲基]-2(3H)-呋喃酮。它們以游離或結合的形式存在。PMU中含有天然雌激素混合物，很大程度上以結合的形式例如作為硫酸半酯-鈉鹽(以下簡稱為"硫酸鹽")存在。結合雌激素的含量(以雌激素硫酸鹽計算)為幹物質的0.1-1重量%。此外在PMU固體含量中還可以存在其他親脂化合物，其含量可以在較大的範圍內變化並且不可預見。

這些親脂化合物主要來源於作為飼料被妊娠牝馬攝入的植物，主要包括各種類黃酮-、異類黃酮-、去甲類異戊二烯-衍生物和類似物質，例如7-羥基-4'-甲氧異黃酮、染料木黃酮、黃豆苷原、雞豆黃素A、Equol和香豆雌酚。這些原本

5 植物來源的親脂化合物可以在尿液中以結合或游離(非結合)的形式存在。屬於PMU固體含量中的親脂成份的，此外還有非結合類固醇衍生物，尤其是雄烷-和孕烷類固醇，還包括非結合雌激素衍生物。

含有天然結合雌激素混合物的提取物，通常是採用固

10 相提取法獲取的，或者通過各種液-液-萃取步驟獲取，所述液-液-萃取步驟是基於使用與水不相混合或僅僅少量混合的有機溶劑進行的。通常適宜的是，為使所獲取的天然結合雌激素混合物能夠作為活性物質用於制藥，必須使之符合一定的制藥學規格，例如必須符合USP(美國藥典)或歐洲

15 藥典制定的規格。如此，必須使結合雌激素基於幹物質的含量保持在一定的界值內。

美國專利N0. 2,551,205和N0. 2,429,398描述的方法用於由PMU製備一種水溶性雌激素製劑，其中首先經過活性炭或其他適宜的吸附性材料的吸附，用一種可與水相混合

20 的有機溶劑例如吡啶進行洗脫，並隨即去除溶劑而獲取一種水性濃縮物，其含有來源於初始PMU中的水溶性雌激素成份的絕大部分。在美國專利No. 2,429,398中，將濃縮物用粗苯和/或乙醚萃取進一步提純，而在美國專利No. 2,551,205中描述的是，將濃縮物酸化至pH-值為2-6，優選

- 為4-5，然後迅速用選自脂族、芳香族或脂環族的烴(例如己烷、粗苯、甲苯、環己烷)或氯化的烴(例如氯仿、二氯化乙烯、三氯化乙烯、四氯化碳、氯苯)的與水幾乎不相混合的有機溶劑進行萃取，以使無用的物質如脂肪、油、游離酚類成份和非結合類固醇通過轉移至有機相而被去除。最後通過中和作用使水相穩定。美國專利No. 2,551,205推薦，將獲取的萃取液通過隨後的萃取步驟和沈澱作用進一步提純。總之，在實施美國專利No. 2,551,205描述的方法後，所獲取的產率約為所應用的濃縮物的雌激素成份的80%。
- 10 美國專利No. 2,565,115中描述了用丙酮由PMU提取結合雌激素的方法。但是沒有陳述所獲取的雌激素餾分物的純度。

- 美國專利No. 2,696,265所描述的方法是，首先將雌激素用脂族醇或酮，例如己醇、環己醇或環己酮進行萃取。
- 15 雌激素進入有機相，隨即被進一步提純，此外還將含有雌激素的水相用鹽酸調節至pH-值為4，並用二氯化乙烯萃取。

- 美國專利No. 2,834,712公開了高純度低毒性雌激素混合物的製備方法，其原理是採用多個不同溶劑和不同pH-值設置的萃取步驟。其中需要應用大量溶劑如己烷和粗
- 20 苯。例如在某一步驟中將已經提純的濃縮物溶於水，用鹽酸調節至pH-值約為5.0，用粗苯並隨即用乙醚萃取，以去除酚類成份。

國際專利申請書WO 01/27134描述了一種由PMU萃取結合雌激素的相對簡單的方法：在添加鹽例如氯化鈉後，

將PMU用至少同等體積份的有機溶劑例如醋酸乙酯進行萃取，就此結合雌激素進入有機相。將有機相分離並乾燥，以獲取提取物。WO 01/27134沒有陳述所獲取的結合雌激素提取物的純度。

- 5 然而以上所描述的和由現有技術已知的液-液-萃取方法過程中會出現許多問題，如產生大量泡沫、產生沈澱、形成乳濁液和差的相分離。一般需要諸多萃取步驟，而導致損耗並只能部分獲取雌激素含量。而且這些萃取步驟還需要大量的部分有損健康的溶劑。此外在以上列舉的專利
- 10 文本中，既沒有陳述在所獲取的產物中非結合親脂成份(例如非結合類黃酮-、異類黃酮-、去甲類異戊二烯-衍生物和類似的非結合化合物)的含量或者是非結合類固醇(尤其是雄烷-和孕烷-類固醇)的含量，也沒有陳述這些成份的去除過程。所述由現有技術已知的方法，不是在產率方面或者
- 15 在所獲取的提取物的純度方面(基於幹物質測量所獲取的激素的總量)均不能提供滿意的結果，就是需要諸多不同方法步驟和應用大量有機溶劑，甚至部分溶劑根據毒理學觀點是不適宜的。

- 此外，由現有技術已知各種不同的固相萃取方法，可
- 20 用於獲取酚類尿容物被進一步貧化的天然的牝馬結合雌激素混合物。國際專利申請書WO 98/08526如此描述了一種方法，其通過在一種半極性，尤其是在非離子半極性聚合性吸附性樹脂上進行固相萃取，可以獲取一種酚類尿容物被貧化的、且不含甲酚和HPMF的、基本完全含有PMU中的

天然雌激素成份的混合物。國際專利申請書WO 98/08526
描述了一種類似的方法，在固相萃取時採用矽膠作為吸附
材料。還有中國專利申請書CN 1308083描述了一種應用含
氰基的極性吸附性樹脂的類似方法。所獲取的提取物適合
5 於作為起始物，用於製備所含活性物質來源於PMU的天然
結合雌激素混合物的藥物。

根據WO 98/08526或WO 98/08525的方法由PMU獲取的
結合雌激素混合物通常可達到所制定的制藥學規格的要求，
例如在基於幹物質的結合雌激素含量方面所應保證的
10 界值。但是事實表明：在所獲取的幹物質中，除含有所需
要的結合雌激素外，還可能含有非結合親脂化合物。這些
非結合親脂化合物例如有各種非結合類黃酮-、異類黃酮-、
去甲類異戊二烯-衍生物及類似的非結合化合物，例如7-羥
基-4-甲氧異黃酮、染料木黃酮、黃豆苷原、雞豆黃素A、
15 Equol和香豆雌酚，並且還包括非結合類固醇，尤其是雄烷
-和孕烷-類固醇，以及非結合雌激素，在此所列舉的並非囊
括了全部可能性。由PMU所獲取的結合雌激素混合物中存
在的非結合親脂化合物沒有統一標準，游離的和結合的親
脂化合物的含量和成份例如根據妊娠牝馬所攝食飼料的不
20 同而有所變化。

雖然天然的牝馬結合雌激素混合物的組成不會因為額外
存在非結合親脂化合物而有所改變，但是基於幹物質的
牝馬結合雌激素含量卻會因此而降低。通過針對性地去除
非結合親脂成份，可以提高所獲取的提取物中活性物質(牝

馬結合雌激素)的濃度。即使出於藥物安全性的原因，為了保證各種提取物配比成份的組成均衡，去除非結合親脂化合物是合理的，因為如此將非結合親脂化合物成份去除(其在PMU中的含量和組成因妊娠牝馬所攝入飼料種類隨季節變換而有所不同)，則由此所獲取的提取物基於幹物質均具有近似的牝馬結合雌激素含量。此外，去除非結合親脂化合物還有利於達到均衡的生理學活性譜。例如由牝馬結合雌激素的天然混合物中去除可能存在的非結合親脂化合物可以是有意義的，因為它們或許本身具有所不期望的生理作用。

【發明內容】

因此，本發明的任務是，開發出一種技術上和經濟上最優化的獲取天然的牝馬結合雌激素混合物的方法，在此，該混合物的非結合親脂化合物進一步被貧化，特別是非結合類黃酮-、異類黃酮-和去甲類異戊二烯-衍生物。本發明的任務尤其是要開發出一種隻應用少量無損健康的溶劑的方法。此外還應該開發一種隻通過少數步驟即提供牝馬結合雌激素提取物的方法，該提取物基於幹物質具有相對較高的結合雌激素含量。此外應用本發明的方法應能以簡單的方式如此處理從妊娠牝馬尿液(其中非結合親脂化合物含量是變換的，視情況會升高的)中獲取的酚類尿容物已經被貧化的結合雌激素混合物，使本發明方法所獲取的天然牝馬雌激素混合物具有滿意的活性物質含量，並能夠達到所要求的制藥學規格，尤其是在基於幹物質的結合雌

激素含量方面，應該保證在所要求的界值內。

現已發明了一種方法，以出人意料的簡單方式，即使從非結合親脂化合物含量變換的、視情況含量會升高的PMU中也能獲取牝馬結合雌激素混合物，其中所獲取的牝馬結合雌激素混合物中非結合親脂化合物(尤其是非結合類黃酮-、異類黃酮-和去甲類異戊二烯-衍生物)是進一步被貧化的。本發明方法尤其是可應用於從妊娠牝馬尿液中獲取酚類尿容物已經被貧化的結合雌激素混合物，以使該方法所獲取的牝馬結合雌激素混合物保證達到具有高產品質量和制藥學規格的要求，尤其是基於幹物質在結合雌激素的含量方面保證在界值內。

根據本發明用於獲取天然的牝馬結合雌激素混合物的方法，其特徵在於，所獲取混合物中非結合親脂化合物已經被貧化，包括非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯、非結合類固醇(尤其是雄烷-和孕烷-類固醇)以及類似的非結合化合物，該方法的特徵為，

a)將選自以下化合物組的水性起始相

(i)酚類尿容物已經被貧化的妊娠牝馬尿液的結合雌激素天然混合物的水溶液，

(ii)酚類尿容物已經被貧化的妊娠牝馬尿液的結合雌激素天然混合物的水性濃縮液，

(iii)尿液的濃縮液，和

(iv)視需要經過濾預先提純的尿濃縮液，

用足量的萃取劑進行液-液萃取(該萃取劑為適合於萃

取上述非結合親脂化合物的、與水不相混合或幾乎不相混合的有機溶劑)，並隨即將水相分離，

b)視需要將所獲取的水相重複步驟(a)，以及

c)獲得含天然結合雌激素混合物的水相，視需要將其

5 濃縮。

作為本發明方法的水性起始相，可以使用酚類尿容物已經被貧化的妊娠牝馬尿液的天然結合雌激素混合物的水溶液(i)，或酚類尿容物已經被貧化的妊娠牝馬尿液的天然結合雌激素混合物的水性濃縮液(ii)。該水溶液或水性濃縮液，可以通過例如已經在國際專利申請書WO 98/08526和WO 98/08525或中國專利申請書CN 1308083中描述的方法，以及專業人員由此根據所述發表的專利申請書常用的方法獲取。出於公開的目的，所述WO 98/08526、WO 98/08525和CN 1308083的內容也成為本發明的內容。源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水溶液或水性濃縮液，也可以是液-液-萃取的產物，正如國際專利申請書WO 01/27134描述的。根據上述專利申請書中描述的方法獲取的水溶液或水性濃縮液，可以在其應用於根據本發明方法前，按照已知的方式例如蒸餾法進一步濃縮，以獲取進一步去除了有機溶劑的濃縮液。

此外對於根據本發明方法，作為水性起始相還可以使用一種將PMU濃縮所獲取的濃縮液(iii)，或由PMU所獲取的、經過濾法或類似方法已經預先提純的濃縮液(iv)。將所收集的尿液(PMU)首先按照已知的方式去除黏液物質和

固態物質。適宜的是將固態物質和黏液物質進行沉澱，然後按照已知的分離方法，例如傾柱洗滌法、分離法和/或過濾法分離。如此可以將PMU例如置入一種已知的分離裝置例如分離器、過濾裝置或沈澱器中。作為分離裝置例如可以應用砂床，或者應用市售的分離器，例如噴嘴式分離器或箱式分離器。視需要還可以應用微量過濾裝置或超過濾裝置，在所述應用中同時還可以使過濾後的PMU很大程度上無菌和無病毒。

視需要可以在尿液或尿液濃縮液中添加貯藏劑、殺微生物劑、殺細菌劑和/或驅蠕蟲劑。

作為預先提純的尿液濃縮液(iv)，還可以應用濃縮的PMU保留液，其可以由PMU通過本身已知的膜過濾方法獲得。保留液的固體含量及其組成可分別依據其所應用的PMU和用於膜過濾的膜(例如其孔徑)，以及過濾條件的不同而有所不同。例如應用納米過濾膜時，可以幾乎無損失地濃縮PMU保留液中的雌激素含量，而同時去除至多50重量%的低分子PMU內容物。用於根據本發明方法可以使用濃縮約至1:10的比例(例如約1:7)的PMU保留液，即其容積可以濃縮至起始PMU容積的約1/10(例如約1/7)。

如果作為水性起始相所應用的濃縮液為經濃縮的PMU濃縮液，或者為例如通過膜過濾已經預先提純的PMU濃縮液，那麼，所獲取的已經根據本發明方法的非結合親脂化合物被貧化的牝馬結合雌激素混合物已經具備了足夠的純度，但仍然可能會含有顯著劑量的酚類尿容物，必須通過

進一步的方法步驟去除。所以可以用所獲取的水相，例如根據國際專利申請書 WO 98/08526 和 WO 98/08525 或中國專利申請書 CN 1308083 中描述的方法，以及專業人員由此根據發表的所述專利申請書常用的方法，獲取一種即使在
5 酚類尿容物的含量方面也能達到對於結合雌激素所要求的制藥學規格的產物。

在本發明的範圍內優選應用源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合型雌激素混合物的水溶液，或者源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結
10 合型雌激素混合物的水性濃縮液作為水性起始相。

根據本發明在方法步驟(a)中用上述水性起始相與足量萃取劑進行液-液-萃取，該萃取劑為與水不相混合或幾乎不相混合的、且適合於萃取非結合親脂化合物(特別是非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯)和非結
15 合類固醇的有機溶劑。此外該有機相應與水性起始相不混合或幾乎不混合，在此幾乎不混合是指，在水相中溶解的有機溶劑最多為6容積%。對於所述液-液-萃取可以原則上應用任何一種與水不混合的有機溶劑，只要其能將非結合親脂化合物從水相中萃取出來。對於萃取非結合親脂化
20 物，特別是非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯和非結合類固醇適宜的溶劑，例如可以是以下具有1-10個碳原子、呈直鏈的、分支的或環狀排列的有機溶劑：C₄-C₁₀醇(例如丁醇、己醇、環己醇和戊醇)、C₂-C₁₀酯化酸(例如乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙酸丙酯、乙酸異丙酯、

乙酸丁酯、乙酸戊酯、乙基甲基丙二酸酯
(Ethylmethoxymalonat)、磷酸二甲酯)、 C_3 - C_{10} 醛和 C_4 - C_{10} 酮(例
如丁酮、戊酮、己烷-2,4-二酮、己烷二醛、環己烷鏈烷醛、
甲基苯基酮(Methylphenylketon)及類似化合物)、以及所有
5 的 C_3 - C_{10} 烷氧基-化合物、 C_2 - C_{10} 醚(乙醚、甲基-叔丁醚)、
 C_3 - C_6 腈和 C_1 - C_3 鹵烷烴(二氯甲烷)，以及上述溶劑的混合
液。尤其是乙酸- C_1 - C_4 -烷酯、己醇、乙醚、二氯甲烷、甲
基-叔丁醚和上述溶劑的混合液，可以作為萃取劑用於本發
明。在此可選範圍內，乙酸- C_1 - C_4 -烷酯，尤其是乙酸乙酯
10 優選為萃取劑用於本發明。

在根據本發明用足量萃取劑實施液-液-萃取的方法步
驟(a)中，水性起始相與萃取劑的容積比例在本發明範圍內
不受限制。一般使用與水性起始相的容積相當的有機溶劑
容積，當然其中水相與有機相的比例可以在10:1和1:10的範
15 圍內。優選水性起始相與有機萃取劑的容積比例在5:1至1:3
的範圍內，尤其是在2:1至1:2範圍內的容積比例被認為是合
適的。

一個這樣的萃取過程的實施對專業人員而言是從現有
技術中已知的。通常在一種裝置內進行液-液-萃取，該裝置
20 可使水相和與水不混合的有機相持續不斷地充分混合。例
如有一種所謂的混合調控器(Mixer-Settler-Apparatur)可以
通過攪拌混合所述二種液相，適合於這樣的萃取過程的實
施。

原則上任何一種pH-值的水性起始相均可用於根據本

發明描述的液-液-萃取。在根據本發明液-液-萃取的一種特別優選的方案中，在方法步驟(a)中首先將水性起始相的pH-值調節至4-12範圍內。優選將pH-值調節至4.0-7.0範圍內，即弱酸性至中性範圍內。特別優選將pH-值調節至4.0-6.0範圍內，尤其是4.7-5.3範圍內。

在調節pH-值時，適宜的是，在一個足夠大的惰性容器中，例如在不銹鋼容器中，用攪拌器或類似攪拌裝置將預先置入的溶液充分混合，以保證pH-值的調節迅速和均勻。可應用通常的堿或酸調節pH-值。例如欲降低pH-值，則可應用通常的無機或有機酸，適宜的是稀釋酸。特別適宜降低或調節pH-值至小於7的是例如應用稀釋的硫酸，優選1N硫酸、稀釋的醋酸、稀釋的磷酸或稀釋的鹽酸，優選1N鹽酸。

本發明所描述的液-液-萃取不需要調節特定的溫度，而是可以在5°C和有機溶劑的沸點或最高95°C之間寬廣的溫度範圍內進行。優選在室溫下進行本發明液-液-萃取，因為如此，額外的能量消耗為最小。室溫通常是指周圍環境溫度，例如10°C-30°C之間的溫度。

這種液-液-萃取的時間長短在本發明範圍內不受限制，可以在5分鐘和數小時之間；時間長短與所應用的水性起始相的劑量相關。典型的是將步驟(a)的水相和有機萃取劑相互混合5-60分鐘，優選10-20分鐘，以使非結合親脂成份由水相盡可能充分地轉移到有機相。

通過充分混合進行萃取步驟之後，靜置相混合液，以

使相分離。依照所應用容積大小的不同，相分離的時間長短可以是10分鐘至數小時，優選靜置相混合液30-120分鐘。當水相和有機相彼此分離之後，將水相分離並保留以備繼續應用，棄去有機相。

- 5 視需要可以重複上述方法步驟(a)；然後根據本發明隨即進行任選步驟(b)，即用足量萃取劑與由步驟(a)所獲取的水相進行新的液-液-萃取，所述萃取劑為與水不相混合或幾乎不相混合的，適合於萃取非結合親脂化合物，特別是非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯和
- 10 非結合類固醇的有機溶劑。

萃取劑的選擇和萃取過程實施的方式，也即萃取過程所應用的裝置、時間長短和溫度，應以上述方法步驟(a)中所羅列的可能性為模板。

- 根據本發明，在方法步驟(a)和(b)這二者中，既可應用
- 15 不同的萃取劑，又可應用相同的萃取劑。優選在這二個萃取步驟中應用相同的萃取劑，尤其是在這二個萃取步驟中作為萃取劑應該應用乙酸-C₁-C₄-烷酯，尤其是乙酸乙酯。

- 在根據本發明用足量萃取劑進行液-液-萃取的步驟(b)中，由步驟(a)所獲取的、已經萃取過一次的、含有結合型
- 20 牝馬雌激素的水相與萃取劑的容積比例，在本發明範圍內不受限制。一般來說，有機溶劑容積明顯小於由步驟(a)所獲取的水相的容積，不過水相對有機相的比例可以在40:1和1:2的範圍內。優選由步驟(b)所獲取的水相對有機萃取劑的容積比例在20:1至1:1的範圍內，尤其適宜的是容積比例

在10:1至2:1的範圍內。

在步驟(b)中通過充分混合進行萃取之後，靜置混合液相，以使相分離。相分離過程的時間長短可以是10分鐘至數小時，優選靜置相混合液20-90分鐘。當水相和有機相彼此分離時，將水相分離並保留以備繼續應用，棄去有機相。

在分離有機相和水相之後，在步驟(c)中獲取含有天然結合雌激素混合物的水相。該水相含有在PMU中出現的天然結合雌激素混合物，此外還有極少量原本在PMU中或經處理的PMU濃縮液中存在的非結合親脂成份。視需要可以將水相按照已知的方式進一步濃縮，以獲取進一步去除有機溶劑的、適合於進一步處理過程的濃縮液。因此可以例如將殘存的有機溶劑從所獲取的水相中蒸餾除去。通過蒸餾還可以將水性萃取相的幹物質含量調節至具體的數值，優選幹物質含量在5-15%之間的範圍內，尤其優選幹物質含量為9%。隨即為了穩定所獲取的天然的牝馬結合雌激素混合物，還可以將水性萃取液的pH-值調節至鹼性範圍內，優選8-13的範圍內，優選9-12之間的數值範圍內。用通常適合於調節pH-值的堿(例如1n NaOH或Na₂CO₃)來調節pH-值。

根據本發明在方法步驟(c)所獲取的、視需要還需進一步處理或濃縮的水相可以作為起始材料，用於製備含牝馬結合雌激素天然混合物的藥物。視需要可以通過合適的乾燥過程例如噴霧乾燥法製備不含洗脫劑的固體混合物。如果天然結合雌激素混合物用來製備固態藥物，適宜的是，在濃縮和乾燥之前，在含有結合雌激素的水相中混合加入

固態載體物質，以這種方式獲取含有結合雌激素和載體物質的固體混合物。無論是含有雌激素混合物的水相，還是由此製備的濃縮液或經乾燥的固體產物，均可以按照已知的方式處理成固體的或液體的加侖氏製劑，如片劑、糖衣劑型、膠囊或乳劑。可以按照已知的方式，在應用通常的固體或液體載體物質如澱粉、纖維素、乳糖或滑石粉或液體石蠟和/或在應用通常的制藥學佐劑例如片劑崩解劑、增溶劑或貯藏劑的條件下，製備這些加侖氏製劑。如此可以將含有結合雌激素的產物與制藥學載體物質和佐劑按照已知的方式混合，然後將混合物轉化成合適的劑型。

根據本發明描述的液-液-萃取過程，以簡單的方法從水性起始相中去除許多非結合親脂化合物。所述水性起始相可以為源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水溶液，為源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水性濃縮液，為尿液的濃縮液，或者為一種視需要經過濾預先提純的尿濃縮液。去除的非結合親脂化合物尤其是指非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯和非結合類固醇，在此尤其是非結合雄烷-和非結合孕烷-衍生物。

與經典的液-液-萃取法相比較，在此應用較小容積的有機溶劑，因為作為水性起始相總是應用原始PMU的濃縮液。如果例如應用依據國際專利申請書WO 98/08526描述的方法所獲取的水性濃縮液作為本發明描述的液-液-萃取方法的水性起始相，則對於5000升PMU僅用約35升濃縮液和

相應小劑量的有機溶劑用於萃取過程。

如果作為應用於本發明液-液-萃取過程的水性起始相，為源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水溶液，或者為源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水性濃縮液，所獲取的活性物質提取物，即非結合親脂成份和酚類尿容物已經被貧化的天然牝馬雌激素混合物，具有明顯優化的制藥學規格，正如根據本發明所確證的那樣。特別是通過液-液-萃取過程使牝馬結合雌激素基於幹物質的比例提高了8-20%，而在萃取過程中又沒有明顯損失牝馬結合雌激素。由此證明在方法步驟(c)中所獲取的含天然牝馬雌激素混合物的水相，與現有技術相比較具有有利的組成成份和基於幹物質提高了的總激素含量。經此可獲取例如基於組成和活性物質含量明顯改善的質量產物。

非常令人驚異的是，將源自含不同變化劑量的非結合親脂成份的妊娠牝馬尿液的酚類尿容物被貧化的天然牝馬雌激素混合物的水溶液或濃縮液，進行一種自認為簡單的液-液-萃取方法，卻能如此明顯改善所獲取的活性物質提取物的質量。尤其令人驚異的是，非結合親脂化合物的份額，其取決於所應用的PMU，不僅在量上也在組成成份上都會有很大變化，卻能通過本發明方法可以如此肯定地減少，即在方法步驟(c)中作為水相可以獲取天然的牝馬結合雌激素混合物，其能達到制藥學規格的高標準規格，例如根據USP或歐洲藥典提出的要求。

另外還令人驚異的是，根據本發明的萃取方法的實施中還可以去除這樣一些非結合親脂化合物，如消泡劑，其在先前的處理步驟(例如製備濃縮液的過程)中作為佐劑添加至PMU中。

- 5 已經發現本發明方法還有一個優點：明顯簡化和方便了進一步處理所獲取的經萃取的非結合親脂化合物已經被貧化的、天然的牝馬結合雌激素混合物形式的濃縮液的過程，以及其轉化成加侖氏製劑的過程。令人驚異的特徵是：根據本發明方法所獲取的活性物質提取物具有很好的乾燥
- 10 性，並且其在乾燥後所獲取的固體物質具有非常好的流動性。因此例如根據本發明方法獲取的經萃取的濃縮物比未經萃取的溶液明顯更易於塗敷在載體物質上。活性物質濃度的調節也被簡化並且是可重複的。

- 正如以上詳細描述的，本發明方法相對於現今技術水平具有許多優點和改善。所以本發明還可以應用非結合親脂成份含量變換的PMU，例如其可以具有較高含量的游離類黃酮、游離異類黃酮、游離去甲類異戊二烯或游離類固醇衍生物，在此尤其是游離雄烷-或游離孕烷-類固醇，而不致違反應該遵守的制藥學規格。根據本發明方法可以保障
- 15 各種萃取劑配比成份的均衡組成，因為總是能夠去除在PMU中的含量和組成取決於妊娠牝馬所攝食的飼料種類而會有所變化的非結合親脂成份，並且由此使所獲取的萃取液都具有相當的基於幹物質的牝馬結合雌激素含量。此外通過使用根據本發明的方法去除非結合親脂成份，所獲取
- 20

- 的萃取液中具有較高濃度的活性物質，即牝馬結合雌激素。根據本發明方法還具有經濟節省的優點，因為明顯減少了因喪失重要活性物質而不能遵守制藥學規格的危險，例如基於幹物質的結合雌激素含量不夠的情況。此外通過
- 5 應用本發明方法可以很準確而且重複地調節所獲取的萃取液中活性物質的含量。根據本發明的方法提供了具有基於幹物質含量提高了激素含量的質量改善的活性物質成份。該活性物質成份特別適合於製備含有天然牝馬雌激素混合物作為活性物質的藥物。
- 10 以下實施例應能進一步描述本發明，而並非將其範圍僅限於此。

【實施方式】

實施例

- 以下實施例將描述由PMU獲取活性物質萃取液的一般
- 15 工作程式，所述萃取液含有PMU中所含有的天然結合雌激素混合物，並且其中非結合親脂化合物被進一步貧化，例如非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯、非結合類固醇、尤其是雄烷-和孕烷-類固醇和類似的非結合化合物。還將證明根據本發明如何由非結合親脂化合物
- 20 物份額變換或提高的PMU獲取活性物質含量高的優質萃取液。

源自妊娠牝馬尿液中的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水性濃縮液的萃取。

作為水性起始相，應用35.3kg(實施例1)或者26.7kg(實

施例2)來源於妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水性濃縮液，其採用國際專利申請書WO 98/08526中描述的方法由約5000升PMU製備的(幹物質含量(=TS)並且還借助於HPLC和GC測定結合雌激素例如雌酮硫酸鹽的含量，和非結合親脂化合物例如7-羥基-4'-甲氧異黃酮的含量，在以下實施例表中列舉了所應用的水性濃縮液的各種配比成份)。將所述水性濃縮液在不銹鋼容器中借助於攪拌器充分混合，將pH-值用1N H₂SO₄調節至約為5.0。將所獲取的溶液在混合調控器中、在水相對有機相比例為10:8的條件下加入醋酸乙酯(EA-劑量說明見以下實施例表格)並劇烈攪拌約15分鐘。然後使將混合液靜置約90分鐘用於相分離。隨即將相分離，在水相對有機相比例為10:2的條件下，將水相再次與醋酸乙酯(EA-劑量說明見以下實施例表格)並攪拌15分鐘。萃取後為使相分離，靜置混合液約30分鐘。分離有機相後將水相轉移至反應爐內。在正常壓力下由水相蒸餾去殘存的醋酸乙酯。通過蒸餾將幹物質含量調節至約9%。隨即將溶液的pH-值通過添加1N NaOH或Na₂CO₃調節至約11.0。如此所獲取的結合雌激素水性萃取相的含量借助HPLC和GC分析檢測(幹物質含量(=TS)且借助HPLC和GC測定的結合雌激素例如雌酮硫酸鹽的含量、非結合親脂化合物例如7-羥基-4'-甲氧異黃酮的含量，以下實施例表中列舉了的所使用的水性濃縮液的各種配比成份)。各種激素成份相互之間的比例，即結合雌激素混合液中雌酮硫酸鹽、馬烯雌酮硫酸鹽和17- α -DH-馬烯

雌酮硫酸鹽的相對含量，可以在各種配比成份上隨著PMU的自然變化而變化。通過針對性地相互混合各種配比成份，可以調節所需要的各種激素成份之間的比例。

	實施例1			實施例2		
	含量 [mg/g]	劑量 [g]	重量% TS	含量 [mg/g]	劑量 [g]	重量% TS
水性起始濃縮液		35.300			26.700	
幹物質(重量%)	(9.8)	3.495		(9.4)	2.510	
結合雌激素(總)	26.2	924	26.7	25.8	688	27.4
雌酮硫酸鹽	12.2	431	12.4	16.9	452	18.0
馬烯雌酮硫酸鹽	9.3	328	9.5	5.8	156	6.2
17- α -DH-馬烯雌酮硫酸鹽	4.7	166	4.8	3.0	80	3.2
7-羥基-4'-甲氧異黃酮	0.17	5.9	0.17	0.32	8.4	0.34
1.EE-萃取(醋酸乙酯)		25.400			19.400	
2.EE-萃取(醋酸乙酯)		6.400			4.900	
所獲取的水性起始濃縮液		34.000			23.500	
幹物質(重量%)	(8.9)	3.026		(8.9)	2.092	
結合雌激素(總)	26.3	896	29.6	27.9	656	31.4
雌酮硫酸鹽	12.2	420	13.9	18.5	434	20.8
馬烯雌酮硫酸鹽	9.3	317	10.5	6.3	147	7.0
17- α -DH-馬烯雌酮硫酸鹽	4.6	158	5.2	3.2	75	3.6
7-羥基-4'-甲氧異黃酮	0	0	0	0	0	0

- 如果作為水性起始相不是用來自妊娠牝馬尿液的酚類
- 5 尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水性濃縮液，而是用尿液濃縮液、視需要經過濾預先提純的尿濃縮液，或者是來自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水溶液作為水性起始相，所述萃取方法可以以類似的方式進行。

10 【圖式簡單說明】

(無)

【圖式之主要元件代表符號表】

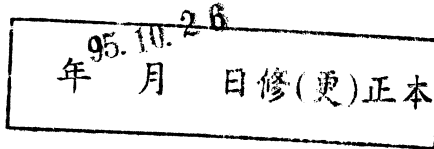
(無)

伍、中文發明摘要：

本文描述了一種通過牝馬結合雌激素混合物的液-液-萃取獲取含有天然的牝馬結合雌激素混合物的提取物的方法，所獲取的混合物中非結合親脂化合物已經被貧化，包括非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯、非結合類固醇(尤其是雄烷-和孕烷-類固醇)以及類似的非結合化合物。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to a process for obtaining an extract of a natural conjugated equine estrigen mixture using liquid-liquid extraction of a conjugated equine estrogen mixture, by which the obtained mixture is poor of non-conjugated lipophilic compounds including non-conjugated flavonoid, non-conjugated isoflavonoid, non-conjugated norisoprenoid, non-conjugated steroid, in particular androstane- and pregnane-steroid and the like.



拾、申請專利範圍：

第92127669號專利申請案申請專利範圍修正本

修正日期：95年10月

1. 一種獲取天然結合馬雌激素混合物的方法，其特徵在於，所獲取的混合物中非結合親脂化合物已經被貧化，
5 所述非結合親脂化合物包括非結合類黃酮、非結合異類黃酮、非結合去甲類異戊二烯、非結合類固醇以及類似的非結合化合物，該方法的特徵為，

a)將選自以下組群的水性起始相

- 10 (i)酚類尿容物已經被貧化的妊娠牝馬尿液的結合雌激素天然混合物的水溶液，

(ii)酚類尿容物已經被貧化的妊娠牝馬尿液的結合雌激素天然混合物的水性濃縮液，

- 15 (iii)藉由濃縮妊娠牝馬尿液而獲取的尿液濃縮液，和

(iv)藉由機械分離方法而無黏液物質和固體的尿濃縮液或藉由過濾妊娠牝馬尿液所獲取的濃縮尿保留液，

- 20 用足量的萃取劑進行液-液萃取，並隨後將水相分離，

該萃取劑為適合於萃取上述非結合親脂化合物且與水不相混合或與水僅稍微相混合的有機溶劑，而選自於由下列所組成之組群：直鏈的、分支的或環狀排列的C₄-C₁₀醇、C₂-C₁₀酯化酸、C₃-C₁₀醛、C₄-C₁₀酮、C₂-C₁₀

醚、 C_3 - C_6 腈和 C_1 - C_3 鹵烷烴，以及上述溶劑的混合液，

該水性起始相與該萃取劑的容積比例在5:1至1:3的範圍內；以及

b)視需要將所獲取的水相重複方法步驟(a)，

5 該方法步驟(a)中所獲取的水相與該萃取劑的容積比例在20:1至1:1的範圍內；以及

c)獲得含天然結合雌激素混合物的水相，視需要將其濃縮。

2. 如申請專利範圍第1項的方法，其中在方法步驟(a)中所
10 應用的水性起始相為，源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水溶液(i)，或源自妊娠牝馬尿液的酚類尿容物已經被貧化的天然結合雌激素混合物的水性濃縮液(ii)。

3. 如申請專利範圍第2項的方法，其中該酚類尿容物之貧
15 化係藉由在一種非離子性半極性吸附性樹脂或一種疏水化矽膠上進行固相萃取而獲取。

4. 如申請專利範圍第1-3項中任一項的方法，其中該萃取
20 劑係選自於由下列所組成之組群：乙酸- C_1 - C_4 -烷酯、己醇、乙醚、二氯甲烷、甲基-叔丁醚以及上述溶劑的混合液。

5. 如申請專利範圍第4項的方法，其中該萃取劑係為乙酸- C_1 - C_4 -烷酯。

6. 如申請專利範圍第5項的方法，其中該乙酸- C_1 - C_4 -烷酯為醋酸乙酯。

7. 如申請專利範圍第1-3項中任一項的方法，其中在方法步驟(a)中，將水性起始相調節至pH值為4-12之間的範圍內。
- 5 8. 如申請專利範圍第7項的方法，其中將pH值調節至4.0-7.0範圍內。
9. 如申請專利範圍第7項的方法，其中將pH值調節至4.0-6.0範圍內。
10. 如申請專利範圍第7項的方法，其中將pH值調節至4.7-5.3範圍內。
- 10 11. 如申請專利範圍第1-3項中任一項的方法，其中在方法步驟(a)中該水性起始相與該萃取劑的容積比例在2:1至1:2範圍內。
12. 如申請專利範圍第1-3項中任一項的方法，其中在方法步驟(b)中將該方法步驟(a)中所獲取的水相與該萃取劑
15 的容積比例在10:1至2:1範圍內。

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)